

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL MESTRADO

PAULA SOARES

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS OBTIDOS COM
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO À *SPODOPTERA FRUGIPERDA*
(J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

São Leopoldo
2013

PAULA SOARES

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS OBTIDOS COM
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO À *SPODOPTERA FRUGIPERDA*
(J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina

Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel

São Leopoldo

2013

S676t

Soares, Paula.

Toxicidade de extratos de plantas medicinais obtidos com dióxido de carbono supercrítico à *spodoptera frugiperda* : J.E. Smith, 1797 : lepidoptera, noctuidae / Paula Soares. – 2013.

58 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2013.

"Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina ; co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel."

1. *Jodina rhombifolia*. 2. Plantas medicinais. 3. Extração supercrítica. 4. Controle biológico. I. Título.

CDU 57

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Bibliotecário: Flávio Nunes – CRB 10/1298)

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS OBTIDOS COM
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO À *SPODOPTERA FRUGIPERDA*
(J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Fernando da Costa Medina – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Dr. Laura Massochin Nunes Pinto - Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas – Pontifícia Universidade Católica do RS

Dedico este trabalho aos meus
carinhosos pais: Rubilar e Roselaine.

AGRADECIMENTO

Se hoje este trabalho é concreto, é porque atrás de um pesquisador existem grandes mestres e pilares. Nesta pesquisa pude contar com a ajuda, auxílio e paciência de muitas pessoas importantes e outras que se tornaram importantes durante o trajeto. E a estes presto meus agradecimentos:

A minha família: Pai, Mãe e Irmão, Camila e Manu por sempre acreditarem na minha capacidade. Obrigada por todos os esforços e por me proporcionar esta oportunidade. Ao meu namorado Marcus, pela paciência e carinho. Amo vocês.

Ao meu orientador Luis Fernando da Costa Medina, pela orientação, conhecimento, por expandir os meus horizontes e os vários “spish”. Mais uma vez Obrigada!

Aos Co-Orientadores, Lidia Mariana Fiuza com quem comecei minha caminhada e ao Eduardo Cassel, que abriu as portas do Laboratório da PUCRS e por toda ajuda que prestou com a extração supercrítica. Obrigada por todo o conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Micro e Tox: pelos vários momentos de risada, descontração, aprendizagem e os vários quebra-galhos, em especial a Irene, Marianna, Cati, Shana, Gabi, Tais, Pitol, Vilmar, Diou. E também aos que não estão mais no Lab., Bárbara, Silvita, Nati e Tiago. Ao Rafael do lab. da PUCRS, sempre disposto e muito cuidadoso com os meus extratos.

As amigas de Ivoti, Amanda e Guadalupe, pelo carinho e apoio.

Aos amigos e familiares de Montenegro: Dani, Fernanda, Tia Ana, Mariana e Luana pelas várias “gauchadas”, rodeios e jantas na Hotelaria nos finais de semana que sempre me ajudaram a refrescar a cabeça.

A todos que de uma forma ou de outra, foram especiais para o meu crescimento, que fizeram e ainda fazem a diferença na minha vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Jodina rhombifolia</i>	24
Figura 2 - Diagrama de fases do dióxido de carbono.....	27
Figura 3 - Sistema de extração com fluidos supercrítico.....	29
Figura 4 - Eficiência dos extratos brutos frente a <i>S. frugiperda</i>	45
Figura 5 - Eficiência dos extratos supercritico de <i>J. rhombifolia</i> frente a <i>S. frugiperda</i>	46
Figura 6 - Eficiência dos extratos fracionados de <i>J. rhombifolia</i> frente a <i>S. frugiperda</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de pontos críticos (pressão, temperatura e densidade) para algumas substâncias	28
Tabela 2 - Plantas medicinais utilizadas nos bioensaios com lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	40
Tabela 3 - Concentração Letal dos extratos de <i>J. rhombifolia</i> obtidos por extração Supercrítica frente às lagartas de <i>S. frugiperda</i> (g/mL) (IC 95%: LI – LS).	47
Tabela 4 - Mortalidade total das frações em relação aos dias de exposição ao tratamento	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ICN	Instituto de Ciências Naturais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do RS
UNISINOS	Universidade do Vale do Rio dos Sinos
RS	Rio Grande do Sul
URSS	União das Republicas da Socialistas Soviéticas
USA	Estados Unidos da América
US\$	dólares
XX	século 20
DDT	diclorodifeniltricloroetano
CO ₂	dióxido de carbono
NH ₃	Amônia
EFS	Extração com Fluido Supercrítico
CL	Concentração Letal
CCS	Cromatografia em Coluna Seca
TC	temperatura crítica
PC	pressão crítica
DC	densidade crítica
MC	mortalidade corrigida
°C	graus celsius
mm	milímetro
%	porcentagem
m ³	metros cúbicos
kg	quilogramas
g	gramas
mL	mililitros
µL	microlitros
min	minutos

(w:v)	massa por volume
hrs	horas
UR	umidade relativa
F	fração
T	tratamento
CTR	tratamento controle
Li	limite inferior
Ls	limite superior
IC	intervalo de confiança
Bar	pressão
h	hora

RESUMO

O uso de plantas com potencial inseticida vem sendo cada vez mais freqüente uma vez que, medidas de controle que causem menor impacto são de primordial importância no controle de *Spodoptera frugiperda*, uma Lepidóptera conhecida como Lagarta-do-cartucho-do-milho e principal praga das agriculturas de milho e arroz, não somente pelos danos causados nas lavouras, mas como também pela dificuldade do seu controle, podendo levar a lavoura a uma grande perda de produtividade. As plantas inseticidas vêm estimulando o ressurgimento de extratos vegetais para o controle destes insetos e sendo empregadas por possuir vantagens quando comparados aos produtos químicos, uma vez que, são facilmente biodegradáveis e podem contribuir na produção de inseticidas botânicos. Ao contrário da utilização em lavoura de pesticidas químicos sintéticos não seletivos, este trabalho tem como principal objetivo testar o potencial das toxinas ativas das folhas de 9 plantas medicinais (*Aloe* sp., *Mikania* sp., *Casearia sylvestris*, *Syzygium cumini*, *Plectranthus neochilus*, *Jodina rhombifolia*, *Piper umbellatum*, *Artemisia camphorata* e *Phyllanthus niruri*). Os extratos foram obtidos por meio de extração convencional utilizando como solventes: água fria, água quente por decocção e etanol 70%, todos em temperatura ambiente, e extração com fluido supercrítico com dióxido de carbono a temperatura de 40° C e pressão a 100, 150 e 250 bar. O material vegetal foi coletado em São Leopoldo/RS, de Latitude: 29° 45' 39" Leste; Longitude: 51° 08' 50" Oeste, dentro do ciclo vegetativo e os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da Unisinos. Os bioensaios foram realizados utilizando lagartas de segundo ínstar colocadas sobre dieta artificial de Poitout, sendo 15 indivíduos por tratamento e um controle com água e outro com o solvente utilizado. Os resultados de mostraram significativos para *Jodina rhombifolia* que apresentou 31% de mortalidade corrigida com solvente etanol 70%. Nos extratos supercríticos os resultados se mostraram significativos para 250 bar, atingindo 97% de MC (CL₅₀ 0.00472). Os resultados dos extratos fracionados sugerem que a eficiência de *J. rhombifolia* para o controle de *S. frugiperda* esta relacionado ao efeito de sinergismo, sendo assim eficiente para o controle da praga alvo.

Palavras-chave: *Jodina rhombifolia*. Plantas medicinais. Extração supercrítica. Controle biológico.

ABSTRACT

The use of plants with insecticidal potential has been increasingly frequent. Control measures that cause less impact are of prime importance in controlling *Spodoptera frugiperda*, a lepidopteran known as fall armyworm and main pest of the agriculture of maize and rice, not only for the damage to crops, but also for the difficulty of its control, leading to a major loss in the productivity. Insecticide plants have stimulated a resurgence of the use of plant extracts for the control of these insects and are being utilized for possessing advantages when compared to chemicals, since they are easily biodegradable and can contribute to the production of botanical insecticides. Unlike the use of chemical synthetic and nonselective pesticides in agriculture, this work has as main objective to test the potential of active toxins in leaves of 9 medicinal plants (*Aloe* sp., *Mikania* sp., *Casearia sylvestris*, *Syzygium cumini*, *Plectranthus neochilus*, *Jodina rhombifolia*, *Piper umbellatum*, *Artemisia camphorata* e *Phyllanthus niruri*). The extracts were obtained by conventional extraction using the following solvents: cold water, hot water decoction and 70% ethanol, all at room temperature, and supercritical fluid extraction with carbon dioxide at the temperature of 40°C and pressure of 100, 150 and 250 bar. The plant material was collected in São Leopoldo / RS Latitude: 29° 45 '39 "East; Longitude: 51° 08' 50" West within their vegetative cycles and the experiments were performed at the Laboratory of Microbiology and Toxicology at Unisinos. Bioassays were performed using second instar larvae placed on artificial diet of Poitout, with 15 subjects per treatment. One control was performed with water and the other with the solvent used. The results showed significant for *Jodina rhombifolia*, which showed 31% corrected mortality (CM) with ethanol 70% solvent. The results of supercritical extracts were significant for 250 bar, reaching 97% CM (LC₅₀ 0.00472). The results of fractionated extracts suggest that *J. rhombifolia* efficiency for the control of *S. frugiperda* is related to the effect of synergism, thus being effective to control the target pest.

Keywords: *Jodina rhombifolia*. Medicinal plants. Supercritical extraction. Biological control.

SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	19
3.1.1 Plantas Medicinais e Inseticidas	21
3.1.2 Jodina Rhombifolia	23
3.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFS)	26
3.2.1 Histórico	26
3.2.2 Fluidos Supercrítico e suas Propriedades.....	26
3.2.3 Vantagens e Desvantagens da EFS.....	30
3.3 REFERENCIAL TEÓRICO	31
4 ARTIGO: AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS LAGARTAS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (J.E. SMITH, 1979) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)	37
4.1 INTRODUÇÃO.....	38
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.2.1 Material Vegetal.....	40
4.2.2 Extratos	40
4.2.2.1 Extratos Brutos	40
4.2.2.2 Extração Supercrítica	41
4.2.3 Insetos	41
4.2.4 Bioensaios.....	42

4.2.4.1 Toxicidade Aguda: Triagem de Plantas	42
4.2.4.2 Toxicidade Aguda dos Extratos por Fluidos Supercrítico (EFS)	42
4.2.4.3 Concentração Letal (CL) extrato a 250 bar	42
4.2.4.4 Toxicidade Aguda dos Extratos Fracionados	43
4.2.5 Fracionamento dos Extratos Supercríticos	43
4.2.5.1 Cromatografia em Coluna Seca (CCS)	43
4.2.6 Análises Estatísticas.....	44
4.3 RESULTADOS.....	44
4.4 TRIAGEM DE PLANTAS: EXTRATOS BRUTOS	44
4.4.1 Extração Supercrítica com <i>J. rhombifolia</i>	46
4.4.2 Concentração Letal dos Extratos Supercríticos de <i>J. Rhombifolia</i>.....	47
4.4.3 Fracionamento com CCS dos extratos a 250 bar de <i>J. rhombifolia</i>	48
4.5 DISCUSSÃO	49
4.6 CONCLUSÕES	51
4.7 REFERÊNCIAS.....	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	56
ANEXOS	55

1 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2012) a estimativa da área a ser cultivada com as principais culturas de grãos do país é 3,6% para a safra 2011/2012, maior que a cultivada na safra 2010/11, passando de 49,87 para 51,68 milhões de hectares, representando um aumento de 1,81 milhão de hectares. Dentre as principais culturas de verão, a primeira e a segunda safra de milho na temporada 2011/12 totalizaram aproximadamente 15,16 milhões de hectares, 9,8% maior que a cultivada na safra passada.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho. O principal destino da safra são as indústrias de rações para animais. O estudo das projeções de produção do cereal, realizado pela Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa (2012), indica aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. Em 2019/2020, a produção deverá ficar em 70,12 milhões de toneladas e o consumo em 56,20 milhões de toneladas (MAPA, 2012).

Apesar da extensa área cultivada, a produtividade das lavouras de milho no Brasil é muito baixa. Dentre os fatores responsáveis incluem-se os insetos praga (FRIZZAS, 2003). Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estima-se que enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu a liderança, representando 20% do consumo mundial de agrotóxicos e movimentando, só em 2010, cerca de U\$\$ 7,3 bilhões (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2012).

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil e, além disso, a resistência desta praga já foi relatada para diversos tipos de pesticidas e agrotóxicos utilizados em lavouras (RODRIGUEZ; OMOTO, 2001). Estima-se que as perdas por pragas e doenças na agricultura correspondem a 37% da produção, das quais cerca de 13% são devido a insetos. *S. frugiperda* é considerada inseto-praga em diversas plantas cultivadas, especialmente nas gramíneas (TAGLIARI; KNAAK; FIUZA, 2010).

A utilização de inseticidas sintéticos tem sido o principal método de controle da praga, o uso indiscriminado e incorreto tem aumentado também o número de aplicações nas safras e diminuído sua eficiência, principalmente devido ao surgimento de populações de insetos resistentes (BORGONI; VENDRAMIM, 2003). Isso tem acarretado um aumento no custo da produção, devido às aplicações mais frequentes resultando num maior prejuízo ao meio ambiente e maior dificuldade de manter a população de inimigos naturais e polinizadores (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

O emprego de substâncias inseticidas extraídas de plantas tem inúmeras vantagens, quando comparado com o uso de sintéticos como à baixa toxicidade ao meio ambiente e por serem ponto de partida para a síntese de novos produtos (HOLZ et al., 2008). A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006). O estudo de plantas com potencial atividade inseticida é importante para identificar novas moléculas ativas, que poderão ser isoladas das plantas ou sintetizadas, ou então uma molécula-protótipo para modificações estruturais visando, por exemplo, obter compostos ativos (D'INCAO, 2008).

As plantas apresentam enorme potencial na produção de compostos secundários, que provavelmente, estão relacionados com seus mecanismos de defesa. Dentre essas substâncias podem-se mencionar compostos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, dentre outros compostos. Estes compostos que conferem também propriedades medicinais às plantas, acabam por torná-las tóxicas a alguns organismos (HOLZ et al., 2009).

A extração dos compostos biologicamente ativos pode envolver o uso de grandes quantidades de solventes ambientalmente hostis e uma elevada quantidade de operações tecnológicas. Uma técnica alternativa de extração com uma melhor eficiência e seletividade, com base em solventes alternativos, evitando a degradação ou a perda de substâncias sensíveis e diminuição da alta energia e de mão de obra empregadas de processos convencionais, é altamente desejada. A aplicação da Extração por Fluidos Supercrítico (EFS) para o isolamento de compostos biológicos ativos a partir de plantas tem sido extensivamente estudada e tem aumentado o interesse dos pesquisadores nos

últimos anos devido a limitações legais dos resíduos e de solventes (PAVAVELA et al., 2008; BRUN, 2010).

Segundo a EMBRAPA Milho e Sorgo (CRUZ, 2002), o Manejo Integrado de Pragas é o sistema que no contexto associa o ambiente a dinâmica populacional da espécie, utilizando técnicas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível e mantendo a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico.

Baseado na crescente preocupação dos produtores frente aos prejuízos que *S. frugiperda* pode causar em lavouras de milho e a perda de produção, ocasionando assim um aumento excessivo no valor de mercado deste produto, objetivou-se este trabalho, visando à busca por produtos naturais, retirados dos extratos vegetais de plantas medicinais coletadas no município de São Leopoldo/RS, que tenham potencial toxicidade ao inseto-alvo. De forma que sejam de baixo custo para o produtor, causem menor impacto ao meio ambiente e que sejam eficientes no Manejo Integrado de Pragas das lavouras de milho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda de plantas medicinais frente às lagartas de *Spodoptera frugiperda*, a partir de extratos obtidos por extração convencional e por extração com dióxido de carbono em estado supercrítico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) determinar a toxicidade aguda de dez plantas consideradas medicinais na cultura popular do Sul do Brasil, através de métodos de extração convencionais, às lagartas *S. frugiperda*;
- b) determinar a toxicidade aguda da planta que apresentou maior eficiência, através de método de extração por fluidos supercrítico;
- c) determinar a Concentração Letal para 50, 70 e 90% dos organismos expostos (CL) ao extrato supercrítico potencialmente ativo contra o inseto-praga alvo;
- d) avaliar o efeito sinérgico ou antagônico dos extratos fracionados com cromatografia de coluna seca.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SPODOPTERA FRUGIPERDA

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) é um inseto fitófago conhecido popularmente como lagarta-do-cartucho ou lagarta-dos-milharais. Esta mariposa (Lepidoptera) pertencente à família dos Noctuidae pode ocorrer durante todos os estágios de crescimento da cultura e devido aos danos que causa na fase de lagarta, é considerada uma das principais pragas de lavouras. Sua distribuição geográfica a identifica como nativa das regiões subtropicais e tropicais do Hemisfério Oeste dos Estados Unidos, Caribe e da América Central ao sul do Brasil (BELAY et al., 2009; DEQUECH; SILVA; FIUZA, 2005).

As mariposas de *S. frufiperda* põem de 1.500 a 2.000 ovos na parte superior das folhas da planta do milho. Após 3 dias, eclodem as lagartas, que passam a alimentar-se raspando as folhas mais novas da planta de milho (*Zea mays*) e destruindo-as completamente. A duração do período larval é de 12 a 30 dias e sua coloração varia de cinza-escuro a marrom. Podem-se encontrar lagartas de instares diferentes num mesmo cartucho, separadas pelas lâminas das folhas, apesar do canibalismo ser muito comum nesta espécie. Ao final do período larval, as lagartas penetram no solo e se transformam em pupas de coloração marrom avermelhada, medindo cerca de 15 mm de comprimento. O período pupal é de 8 dias no verão, e 25 dias no inverno. A mariposa mede aproximadamente 35 mm de envergadura sendo as asas anteriores pardo-escuras e as posteriores branco-acinzentados (GALLO et al., 2002).

Estes insetos são especialmente prejudiciais, entretanto ainda no final da temporada por não realizarem diapausa no inverno, vulnerável a temperaturas de congelamento e por isso sendo uma praga esporádica e migratória para as regiões temperadas. Em regiões tropicais, as aplicações de inseticidas frequentes são necessárias em lavouras de milho para manter a população de *S. frugiperda* abaixo dos limites de prejuízos econômicos (STORER et al., 2012).

Estudos sobre a diversidade genética deste inseto indicaram a existência de duas estirpes morfologicamente idênticas que diferem na preferência de acolhimento, susceptibilidade fisiológica, comportamento e reações aos pesticidas. Uma cepa foi identificada como estirpe de milho (*Z. mays*) que

essencialmente se alimenta de milho, sorgo e outras gramíneas grandes, a outra cepa foi identificada como variedade de arroz (*Oryza sativa*) e, principalmente, se alimenta de arroz e outras pequenas espécies de gramíneas (BELAY et al., 2009).

Dentro do contexto sócio-econômico as culturas do milho e do arroz irrigado apresentam significativa importância para o Estado do Rio Grande do Sul (RS), mas a ação de insetos considerados pragas tem sido um dos principais fatores que reduzem a produtividade dos híbridos e cultivares atualmente utilizados (GRÜTZMACHER; MARTINS; CUNHA, 2000; MARTINS; GRÜTZMACHER; CUNHA, 2004).

Na cultura do milho essa lagarta ataca o cartucho chegando a destruí-lo completamente, consumindo por completo as folhas, reduzindo a produção em até 20%, sendo o período crítico de seu ataque a época próxima do florescimento. Já na cultura do arroz irrigado, alimenta-se de plantas novas, antes da inundação definitiva do arrozal, chegando a consumir a planta por inteiro, podendo, assim, destruir a lavoura devido ao desfolhamento das plantas, dependendo do nível populacional desta lagarta. Nas lavouras onde o arroz também é cultivado sobre as taipas, o ataque pode estender-se até a fase de emissão das panículas, pelo deslocamento das lagartas a estes locais (GRÜTZMACHER et al., 1999; MARTINS; GRÜTZMACHER; CUNHA, 2004; GALLO et al., 2002).

Além do milho, também há registros de perdas causadas por estas lagartas em diversas culturas como sorgo, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, batata, repolho, espinafre, abóbora, couve, aveia, tabaco, grama, melão e violetas. E com a expansão do algodão e da cana-de-açúcar, o ataque de *S. frugiperda* tem sido frequente, e como medidas de controle, utilizam-se inseticidas (PINTO et al., 2006).

A frequente ocorrência de *S. frugiperda* nestas culturas vem aumentando os esforços da pesquisa na área da bioecologia do inseto, visando o monitoramento e o desenvolvimento de estratégias de controle (DEQUECH; SILVA; FIUZA, 2005). No entanto, segundo Parra (2006), o controle biológico não conta com a credibilidade do produtor. Em muitas regiões do Brasil, ainda se acredita que o controle biológico não pode substituir o químico. Alguns fatores para a não utilização de produtos alternativos seria a tradição em usar sintéticos

que garantem a eficiência e não geram prejuízos, a especificidade do produto biológico a determinadas pragas, baixa disponibilidade de produtos biológicos formulados e a credibilidade da qualidade dos mesmos.

A utilização de plantas inseticidas para o controle biológico de pragas de lavouras não é uma técnica recente, sendo muito utilizada em países tropicais antes do advento dos produtos sintéticos. As pesquisas com estas plantas podem ser realizadas com dois objetivos principais: a descoberta de moléculas com atividade inseticida para síntese de novos produtos e a obtenção de inseticidas naturais brutos para uso direto, em menor escala (GALLO et al., 2002).

3.1.1 Plantas Medicinais e Inseticidas

Durante milênios, o homem vem usando substâncias químicas retiradas da natureza com objetivos medicinais. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna tenham sido desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Não tem havido, no entanto, qualquer esforço abrangente para identificar e colocar em uso os metabólitos secundários inexplorados (CALIXTO, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; AGOSTA, 1996).

No Brasil, o uso de medicamentos à base de plantas é muito popular devido a sua imensa flora, aspectos culturais e da crença popular que afirma que as ervas, são de origem natural, são seguras e sem efeitos secundários indesejáveis (MOREIRA et al., 2011).

Após a Segunda Guerra Mundial algumas plantas e extratos vegetais que mostraram efeitos promissores, foram substituídos por inseticidas químicos sintéticos. Com a introdução de inseticidas sintéticos, o uso de inseticidas botânicos foi gradativamente substituído. Mais tarde, os efeitos adversos da química inseticida foram acoplados com os problemas ambientais, como contaminação no solo e água, resíduos em alimentos e rações como também resistência a pragas. Logo se percebeu claramente que, os tipos de inseticidas representavam um grande perigo para o ambiente, devido aos seus efeitos residuais. Portanto, alguns dos termitecidas como o DDT, aldrin, dieldrin, e o heptacloro foram proibidos, e iniciados estudos em busca de outros inseticidas

menos persistentes. O uso contínuo de termiticidas sintéticos para solo, bem como para o tratamento das culturas, foi permitido até o presente momento por causa da falta de qualquer substituto eficaz (ELANGO et al., 2012; KUMAR et al., 2011).

A aplicação de extratos com compostos químicos com ação inseticida extraídos de plantas tem algumas vantagens quando comparados com substâncias sintéticas: eles são facilmente degradáveis, isto é, elas não se mantêm em meio o ambiente e não deixam resíduos nos produtos alimentares adquiridos das lavouras (ROEL et al., 2010), que levam a revitalização de interesse crescente na utilização de extratos de plantas. Mais de 2000 espécies de plantas são conhecidas por possuir alguma atividade inseticida (D'INCAO et al., 2012).

Segundo Dequech et al. (2008) uma alternativa para atenuar esses problemas é a utilização de aleloquímicos extraídos de plantas para o controle de insetos-praga, de importância na agricultura, é o uso de extratos preparados a partir de plantas com propriedades inseticidas ativas aos insetos alvos.

Os produtos derivados de algumas plantas, inseticidas botânicos, desenvolveram sua própria defesa química contra os insetos herbívoros, ao longo de sua evolução, sintetizando metabólitos secundários com propriedades inseticidas, que apresentam atividade tóxica ou repelente. Esses produtos podem ser a própria matéria prima vegetal, normalmente macerada ou moída até se obter o pó da planta. Os inseticidas botânicos apresentam uma pequena persistência no meio ambiente e uma baixa toxicidade aos consumidores e aos aplicadores, quando comparados com os inseticidas sintéticos usualmente utilizados nas lavouras convencionais encontradas atualmente (DEQUECH et al., 2010).

Plantas e insetos experimentaram um longo período de interações recíprocas, principalmente como resultado de insetos fitófagos consumirem quantidades significativas de plantas. Para repelir ou incapacitar insetos, as plantas sintetizam uma variedade de produtos químicos de defesa amplamente classificados como terpenóides, compostos fenólicos e alcaloides. Muitos extratos de plantas superiores e os seus compostos constituintes foram avaliados contra pragas agrícolas e domésticas para possíveis atividades letais, propriedades repelentes e inibidoras de alimentação (WALIWIWIYA et al., 2012).

Triterpenos fazem parte da família de terpenóides, um grupo extenso de produtos naturais, que são abundantes no reino vegetal. Estes compostos possuem propriedades farmacológicas e que possivelmente são os causadores da atividade inseticida causada nos insetos (MARTÍN et al., 2011).

O que pode-se afirmar é que as plantas com propriedades medicinais conhecidas são largamente estudadas e caracterizadas devido ao seu uso na farmacologia. As pesquisas destinadas à identificação de novas substâncias tóxicas, a fim de controlar pragas agrícolas, são constantes nas atividades relacionadas ao gerenciamento e controle integrado de pragas hoje em dia. Em muitos casos, as plantas têm uma história como medicamentos tradicionais ou são usados para matar ou repelir insetos. Apesar dos vários estudos disponíveis sobre os efeitos entomotóxico de extratos de diferentes espécies de plantas, a sua aplicação ainda é incipiente (D'INCAO et al., 2012).

3.1.2 *Jodina rhombifolia*

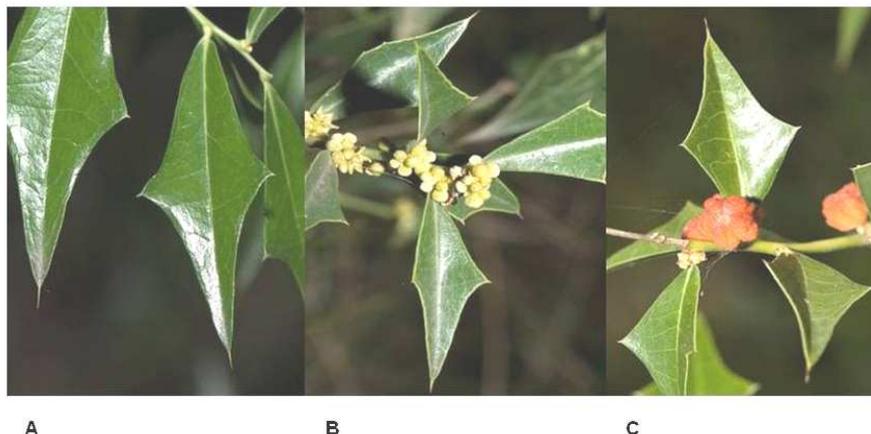
A ordem Santalales é reconhecida como um grupo monofilético de distribuição cosmopolita. Inclui cerca de 160 gêneros e 2.200 espécies em regiões tropicais e temperadas. O sistema Angiosperm Phylogeny Group (APG 2003) em sua classificação reconhece cinco famílias dentro Santalales: Olacaceae, Loranthaceae, Misodendraceae, Opiliaceae, e Santalaceae sensu lato (incluindo Viscaceae e Eremolepidaceae). As Santalaceae são encontradas em ervas, arbustos, árvores ou epífitas, hemiparasitas aéreas ou de raízes, às vezes espinescentes. As inflorescências não são vistosas, encontram-se sésseis ou pediceladas. Os frutos são do tipo baga, drupa ou núcula, com uma única semente ou raramente duas. No Brasil ocorrem 9 gêneros e aproximadamente 80 espécies. Santalaceae tradicionalmente são relativamente comuns em diversos ecossistemas brasileiros. Dentro desta família existe o gênero *Jodina* que é nativo do Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008; DER; NICKREND, 2008).

De acordo com Sobral et al. (2006), uma nova família de *Jodina* (Cervantesiaceae), a partir das espécies do Rio Grande do Sul foi considerada como pertencente à família Santalaceae e foi tratada, pelo autor, sob este nome, no entanto, estudos filogenéticos recente corroboram desmembrado em três famílias monofiléticas: Santalaceae e Cervantesiaceae Thesiaceae.

A espécie *Jodina rhombifolia* Hook. & Arn, (Santalaceae) (ICN 168190 - Herbário UFRGS) conhecida como cancorosa-de-três-pontas, erva-cancorosa, espinheira-de-três-pontas ou apenas cancorosa, é uma arvoreta ornamental e medicinal de copa densa e ramificada com aproximadamente de 2-4 metros de altura. No sul do Brasil é nativa e encontrada principalmente nas matas dos pinhais de Santa Catarina e na depressão central do RS sendo, contudo, rara. Nativa também da Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Suas partes aéreas são utilizadas na medicina popular, principalmente para o tratamento de problemas digestivos e, externamente, para curar úlceras e outras doenças de pele, como por exemplo, carcinoma, erupção cutânea ou polipose nasal (D'ÁVILA, 1910; SIMÕES et al., 1998).

Possui folhas simples, alternas, curto-pecioladas, grossas e coriáceas, de forma romboédrica com um espinho em cada um dos seus três ângulos. Inflorescências aglomeradas e curtas nas axilas das folhas, pequenas e discretas na cor rósea. O fruto é uma cápsula drupácea, rugosa, deiscente, dividida em 5 partes, cada um contendo uma semente (LORENZI; MATOS, 2002; TORETTA; BASILIO, 2009). De acordo com a Flora Digital do Herbário da UFRGS (FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2012) os meses de floração de *J. rhombifolia* são em Março e Novembro que é quando acontece a frutificação junto com a floração.

Figura 1 - *Jodina rhombifolia*



A) partes aéreas. B) floração. C) frutos
Fonte: Sombra de toro (2012)

Esta espécie é ocasionalmente cultivada como árvore ornamental. Suas folhas e ramos são empregados na medicina caseira do sul do país. Na forma de

infusão é utilizada contra resfriados e na forma de cozimento (decoção) da casca tem efeito adstringente contra disenteria. O pó torrado das folhas é aplicado contra úlceras crônicas, carcinomas e outros ferimentos infectados (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Internamente é empregada contra problemas estomacais e resfriados. Um estudo fotoquímico com os glicerídeos do óleo de suas sementes indicou a presença de ácidos graxos acetilênicos.

Mesmo sendo uma planta eficiente em vários aspectos, não se tem muitos registros de estudos realizados utilizando-a. Montanha et al. (2009) realizaram estudos referentes à avaliação química e inibidora de úlceras de extratos de *J. rhombifolia*, mostrando que, os extratos hidroetanólicos inibem a formação de úlceras em 37,5% dos ratos tratados e também apresentaram atividade ranitidina. Chiari et al. (2010) comprovaram atividade inibitória da tirosinase de 91 plantas nativas do centro de Argentina entre estas, foram testados extratos de *J. rhombifolia*, apresentando um resultado de inibição superior a 90% da atividade.

Já, em outros estudos, Toretta e Basilio (2009) apresentaram resultados referentes à dispersão polínica e êxito reprodutivo de *J. rhombifolia* em um bosque da Argentina, onde a espécie mostrou que o pólen foi encontrado nas peças bucais de insetos, mesmo ela sendo uma planta que floresce no inverno, um período em que os insetos estão em menor abundância.

Soberon et al. (2007) testaram a atividade antibacteriana de plantas do noroeste da Argentina usadas na medicina popular, com extratos aquosos e alcoólicos. Todos os extratos alcoólicos mostraram atividade antibacteriana contra as cepas testadas, sendo que, *J. rhombifolia* apresentou a maior atividade.

No entanto, não existem relatos em estudos científicos quanto a sua atividade inseticida, utilização para o manejo integrado de pragas, controle biológico e em nenhuma forma de extração de metabólitos secundários.

3.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFS)

3.2.1 Histórico

O estado supercrítico foi descrito pela primeira vez no ano de 1822, pelo Barão Gagniard de la Tour. Ele observou visualmente que os limites entre o gás e o líquido desapareciam quando a temperatura de certos materiais era elevada em um frasco fechado (TAYLOR, 1996).

Em 1869 T. H. Andrews determinou o ponto supercrítico do gás carbônico. Dez anos depois, em 1879, atribui-se a Hannay e Hogard (1879) a descoberta de que o aumento simultâneo na pressão e na temperatura de certas substâncias químicas aumentava sua solubilidade. Porém, as primeiras aplicações industriais e analíticas somente ocorreram na década de 1970 (SIHVONEN et al., 1999).

Do ano de 1963 a 1972 o Instituto de Pesquisas de Krasnodar (URSS) extraíram 80 plantas diferentes por este processo. A primeira planta industrial de extração com dióxido de carbono supercrítico foi instalada em 1978, para descafeinação de grãos verdes de café (Kaffe HAG AG – Alemanha, experimentos estes ampliados e melhor sistematizados por Buchner em 1906. Entretanto, o uso em larga escala desta propriedade somente consolidou-se a partir da segunda metade do século XX, inicialmente com o nome de gases densos, fluidos pressurizados e, finalmente, fluidos supercríticos (LANÇAS, 2002; CONTADO et al., 2009).

3.2.2 Fluido Supercrítico e suas Propriedades

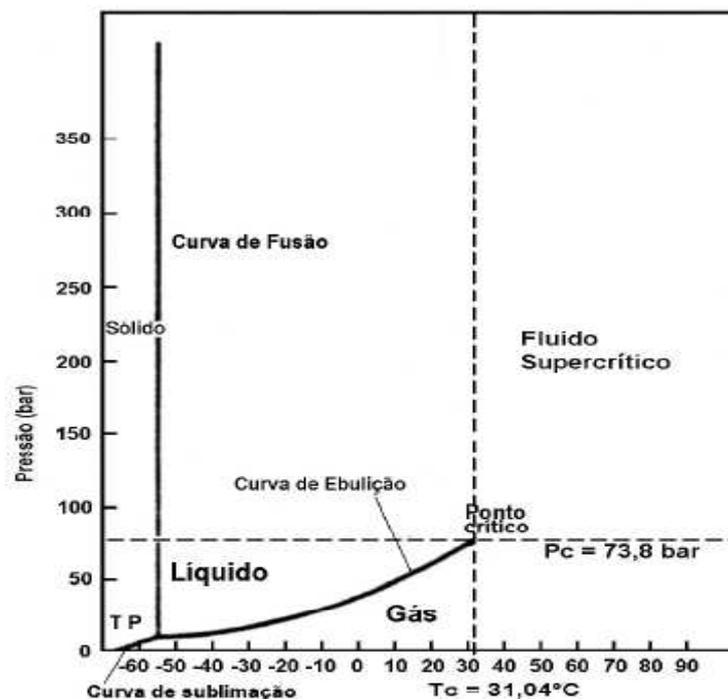
A Extração de Fluido Supercrítico (EFS) é uma técnica amplamente usada em processos de separação de produtos naturais, onde o solvente normalmente utilizado não é tóxico, tal como dióxido de carbono (BARROSO et al., 2011). Esta é uma das tecnologias que mais tem crescido nas últimas décadas, como alternativa para as tradicionais técnicas de extração de produtos naturais (MUKHOPADHYAY, 2009).

Um fluido com condições supercríticas é aquele que se apresenta acima da temperatura crítica (TC) e da pressão crítica (PC), simultaneamente,

possuindo propriedades intermediárias únicas entre o estado líquido e o gasoso. O ponto crítico é em função apenas da natureza do fluido (PEREIRA, 2009; FILIPPIS, 2001). Apresentam menor viscosidade que os líquidos e maior coeficiente de difusão, permitindo uma maior eficiência nas extrações. Além disso, a densidade pode ser ajustada variando a pressão e a temperatura, proporcionando, assim, uma maior seletividade (GOMES, 2003).

A temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão. A pressão crítica é definida como a pressão acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se diminua a temperatura. Nestas condições, o gás comprimido apresenta elevada densidade (próxima de líquidos) e baixa viscosidade (próxima a de gases) (LANÇAS, 2002; SARTOR, 2009).

Figura 2 - Diagrama de fases do dióxido de carbono



Fonte: Filippis (2001)

Este diagrama, ilustrado acima, apresenta três curvas: curvas de sublimação, curva de fusão e curva de ebulição. Estas curvas definem as regiões correspondentes ao estado gasoso, líquido e sólido. Os pontos pressão *versus* temperatura ao longo da curva definem onde existe o equilíbrio entre as duas

fases. A curva definida pelos limites gás-líquido, denominada de pressão de vapor, termina num ponto, denominado ponto crítico (TAYLOR, 1996).

Materiais apolares têm parâmetros críticos relativamente baixos (ex. CO₂: TC = 31,04° C, PC = 73,8 bar), enquanto que compostos polares apresentam elevados parâmetros críticos (ex: NH₃: TC = 132,5° C, PC = 109,8 atm), sendo uma característica de cada substância (TAYLOR, 1996).

Existem outros tipos de gases que são utilizados como solventes por apresentarem propriedades no estado supercrítico, mas devido as razões de custo, perigo de explosões, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos são usados comercialmente (FILIPPIS, 2001). A tabela abaixo mostra alguns exemplos de fluidos e suas características quanto ao ponto crítico.

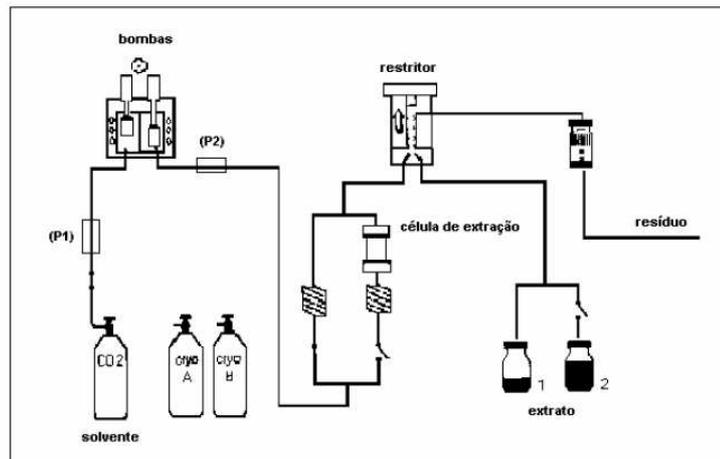
Tabela 1 - Dados de pontos críticos (pressão, temperatura e densidade) para algumas substâncias

Substância	P _c (bar)	T _c (°C)	d _c (g/mL)
H ₂ O	221	374	0,322
Etano	49	32	0,207
CO ₂	73,8	31,0	0,467

Fonte: National Institute of Standards and Technology - NIST (2012)

Um sistema básico de EFS opera com um reservatório de CO₂, um trocador de calor para refrigeração do CO₂ (P1), uma bomba de alta pressão, um permutador de calor para aquecer o solvente até a temperatura de extração (P2), uma célula de extração e um restritor. O solvente extrator, após atingir as condições supercríticas, passa pela célula de extração onde contém a amostra e a mistura resultante e vai até o restritor onde o fluido é despressurizado. O solvente extrator é eliminado por descompressão até alcançar temperatura ambiente (GOMES, 2003).

Figura 3 - Sistema de extração com fluidos supercríticos



Fonte: Gomes (2003)

Os mecanismos deste dispositivo experimental extrator são formados por uma bomba de deslocamento positivo (Thar P-200, USA) para a liberação de solvente (20–200 g/min), um vaso de extração de 500 μ L que opera a alta pressão e um frasco separador. O vaso de extração é suprido com uma jaqueta de aquecimento e um controlador de temperatura automatizado. As resistências elétricas são utilizadas ao longo do vaso de extração com a função de manter a temperatura constante na seção de extração. A manutenção de uma liberação constante e estacionária do solvente é garantida pela bomba que tem seu cabeçote resfriado. A vazão do solvente é medida por medidor de fluxo, 1-300 g/min (Thar 06618-2, EUA). A válvula micrométrica é usada para controlar o fluxo de solvente através do equipamento, regulando a pressão no vaso de extração. As resistências elétricas com controle de temperatura também são utilizadas no entorno desta válvula para evitar o congelamento do solvente na etapa de despressurização. No extrator, a pressão é monitorada pelo transdutor com uma precisão de $\pm 1,0$ bar. O controlador de temperatura é conectado a termopares (PT-100, com uma precisão de 0.5 K). O diâmetro do vaso cilíndrico, a altura do leito e o volume do extrator são, respectivamente, 0,13 m; 0,06 m e 0,000367 m³. A pureza do solvente CO₂ líquido usado nas extrações é de 99,9% (Air Products) e a taxa de solvente utilizada é de $6,667 \times 10^{-4}$ kg/s (BRUN, 2010; GOMES, 2003; FILIPPIS, 2001).

3.2.3 Vantagens e Desvantagens da EFS

EFS-CO₂ tem sido amplamente aplicado no setor agrícola e campos de alimentos durante os últimos 20 anos devido ao aumento do interesse por novos processos de separação em alimentos e campos de cosméticos e farmacêuticos (SPANOS; CHEN; SCHWARTZ, 1993).

Este é um método de separação e purificação que apresenta vantagens quando comparada aos métodos tradicionais entre elas a não produção de resíduos, quando se utiliza como solvente o dióxido de carbono (CO₂), o que tem despertado o interesse industrial por esta operação unitária, classificada como uma tecnologia mais limpa. Devido às suas características apresenta muitos benefícios para a extração de produtos naturais a partir de materiais. O fluido é estável e é ambientalmente seguro porque nenhum resíduo é produzido (AMBROSINO et al., 1999; BRUN, 2010).

Usando CO₂ como solvente, é possível afirmar que seu uso é limpo, seguro, barato, não inflamável, atóxico e não poluente. Tem sido amplamente utilizado na extração de princípios ativos presentes em plantas, visto que o solvente universal no caso da extração supercrítica. O CO₂ apresenta inúmeras vantagens em relação aos solventes orgânicos tradicionais usados em processos de extração, sendo que sua não toxicidade é uma propriedade fundamental quando se trata de produtos naturais (BRUN, 2010; FILIPPIS, 2001). Além disso, o custo da energia associada a esta técnica de extração é menor do que o custo com métodos de extração com solventes tradicionais. Porém, esta técnica é eficiente em escala laboratorial, devido aos altos custos de instalação, operação e manutenção em escala industrial (SARTOR, 2009).

O solvente de extração de CO₂ tem uma forte seletividade lipofílica, e substâncias polares, tais como orgânicas e sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos, glicosídeos, saponinas, taninos, e fosfolipídios são completamente insolúveis, assim como os polímeros, tais como proteínas, polissacarídeos, e politerpenos. Isto oferece uma vantagem de obtenção de um extrato que é virtualmente livre destas substâncias e, portanto, de seletividade na extração (REVERCHON; OSSEO; GORGOGLIONE, 1994).

3.3 REFERENCIAL TEÓRICO

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.**, n. 18, p. 265-267, 1925.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

AGOSTA, W. **Bombardier beetles and fever trees: a close-up look at chemical warfare and signals in animals and plants.** Massachusetts, USA: Addison-Wesley Publishing Company, 1996.

AMBROSINO, P. et al. Extraction of azadirachtin a from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. **Journal Agric. Food Chem.**, n. 47, p. 5252-5256, 1999.

BAGALKOTKAR, G. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **J. Pharm. Pharmacol.**, n. 58, p. 1559-1570, 2006.

BARROSO, M. S. T. et al. Supercritical fluid extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 305-312, 2011.

BELAY, D. K. et al. Spatial genetic variation among *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) sampled from the United States, Puerto Rico, Panama and Argentina. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 105, n. 2, p. 359-367, 2009.

BORGONI, P. C.; VENDRAMIN, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Revista Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 665-669, 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRUN, G. W. **Produção de nanopartículas de cafeína a partir de extrato obtido com dióxido de carbono supercrítico.** 61 f. 2010. Anteprojeto (Doutorado) - Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS, Porto Alegre, 2010.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 28, n. 167, p. 36-43, 2000.

_____ et al. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Med. Res. Rev.**, n. 18, p. 225-258, 1998.

CHIARI, M. E. et al. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. **Food Chemistry**, n. 120, p. 10-14, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

CONTADO, E. W. N da F. et al. Estudo dos métodos de extração de carotenoides em cenoura por fluido supercrítico (EFS) e convencional. **Ciênc. Agrotec.**, n. 34, p. 1617-1623, 2010.

CRUZ, I. **Manejo da resistência de insetos pragas a inseticidas com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 21).

D'ÁVILA, M. C. **Da flora medicinal do Rio Grande do Sul**. 155 f. 1910. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina e Farmácia de Porto Alegre, Porto Alegre, 1910.

D'INCAO, M. P. et al. Effect of Saponin Extracted from *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) on development of the *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). **International Journal of Plant Research**, v. 2, n. 5, p. 151-159, 2012.

D'INCAO, M. P. **Influência de extrato de saponina de *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) no desenvolvimento larval de *Heliconius erato phyllis*, *Heliconius ethilla narcaceae* (Nymphalidae) e *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) (Lepidoptera)**. 48 f. 2008. Dissertação (Mestrado) - Biologia Animal, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

DEQUECH, S. T. B. et al. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 551-554, 2009.

_____ et al. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 41-46, 2008.

_____ et al. Inseticidas botânicos sobre *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) e seus parasitóides em feijão-de-vagem cultivado em estufa. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 37-43, 2010.

_____; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Interação entre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Bacillus thuringiensis aizawai*, em Laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 937-944, 2005.

DER, J. P.; NICKREND, D. L. A Molecular Phylogeny of Santalaceae (Santalales). **American Society of Plant Taxonomists**, v. 33, n. 1, p. 107-116, 2008.

ELANGO, G. et al. Efficacy of medicinal plant extracts against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. **Industrial Crops and Products**, n. 36, p. 524-530, 2012.

FERRANTE, L. M. S. de et al. GC/FID-based authentication of *Baccharis trimera*: a quality control study of products commercialized in Curitiba and metropolitan region (Brazil). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 356-360, 2007.

FILIPPIS, F. M. **Extração com CO2 supercrítico de óleos essenciais de Hon-Sho e Ho-Sho - Experimento e modelagem**. 2001. Dissertação (Mestrado) – UFRGS, Porto Alegre, 2001.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1971.

FLORA Digital do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5298>. Acesso em: 13 nov. 2012.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas Brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.

FRIZZAS, M. R. **Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a comunidade de insetos**. 192 f. 2003. Tese (Doutorado) - Fundação de Estudos Agrícolas Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

GALLO, D. et al. Entomologia agrícola. **Fundação de Estudos Agrícolas Luiz de Queiroz – FEALQ**, Piracicaba, v. 10, p. 920, 2002.

GOMES, F. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluidos supercrítico**. 2003. Dissertação (Mestrado) - UFRGS, Porto Alegre, 2003.

GRÜTZMACHER, A. D. et al. Consumo foliar de cultivares de irrigado por *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera, Noctuide). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 519-525, 1999.

_____; MARTINS, J. F. S.; CUNHA, U. S. Insetos: pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. (Ed.). **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p. 87-102.

HOLZ, A. M. et al. Manejo alternativo de pragas. In. **Tópicos Especiais em Produção Vegetal I**. Alegre: UFES, Centro de Ciências Agrárias, 2008.

_____ et. al. Produtos naturais no controle de pragas. In. **Tópicos Especiais em Produção Vegetal I**. Alegre: UFES, Centro de Ciências Agrárias, 2009.

KUMAR, P. et al. Insecticidal properties of mentha species: a review. **Industrial Crops and Products**, n. 34, p. 802-817, 2011.

LAEMMLI, U. K. Smaller sample vols are better: if using large vols make the stack gel bigger. **Nature**, n. 227, p. 689, 1970.

LANÇAS, F. M. Extração com fluidos Supercrítico: Quo vadis?. **Revista Analytica**, n. 2, 2002.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 151-159, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, 2002.

MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 05 out. 2012.

MARTÍN, L. et al. Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO₂) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. **Industrial Crops and Products**, n. 34, p. 1615-1621, 2011.

MARTINS, J. F. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; CUNHA, U. S. Descrição e manejo integrado de insetos-praga em arroz irrigado. In: GOMES, A. da S.; MAGALHÃES JR., A. M. (Ed.). **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2004. p. 635-676.

MONTANHA, J. A. et al. Chemical and anti-ulcer evaluation of *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arm.) Resseik extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1^a, p. 29-32, 2009.

MOREIRA, H. S. et al. Elemental composition of herbal medicines sold over-the-counter in São Paulo city, Brazil. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 290, p. 615-621. 2011.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 2000.

MUKHOPADHYAY, M. Extraction and processing with supercritical fluids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 6-12, jan. 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST. Disponível em: <<http://www.nist.gov/index.html>>. Acesso em: 5 out. 2012.

NÚÑEZ, V. et al. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from Bothrops snake venoms: isolation of 4 - nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, n. 66, p. 1017-1025, 2005.

PARRA, J. R. P. A prática de controle biológico de pragas no Brasil. In: **Controle biológico de pragas na prática**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006.

- PAVAVELA, R. et al. The insecticidal activity of *Satureja hortensis* L. extracts obtained by supercritical fluid extraction and traditional extraction techniques. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 43, n. 3, p. 377-382, 2008.
- PEREIRA, C. S. S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do Óleo de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 73 f. 2009. Dissertação (Mestrado) – UFRRJ, Rio de Janeiro, 2009.
- PINTO, A. S. et al. **Controle biológico de pragas na prática**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006.
- PINTO, L. S. et al. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Florestal**, v. 9, n. 3, p. 385-390, 2005.
- PLANTILLUSTRATIONS. Disponível em: <www.plantillustrations.org>. Acesso em: 17 set. 2012.
- POUITOUT, S.; BUES, R. Élevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu simplifié. **Ann. Ecol. Anim.**, n. 2, p. 79-91, 1970.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- REVERCHON, E.; OSSEO, L.; GORGOGLIONE, D. Supercritical CO₂ extraction of Basil oil characterization of products and process modeling. **J. Supercrit. Fluid.**, n. 7, p. 185-190, 1994,
- RODRIGUEZ, G. I. D.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.
- ROEL, A. R. et al. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 505-510, 2010.
- SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. Dissertação (Mestrado) – UFRGS, Porto Alegre, 2009.
- SIHVONEN, M. et al. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. **Trends in Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 10, p. 217-222, 1999.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.
- _____ et al. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998.
- SOBERON, J. R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, n. 102, p. 1450-1461, 2007.

SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente, 2006.

SOMBRA de toro. Disponível em: <<http://floradeluruguay.blogspot.com.br/2009/09/sombra-de-toro.html>>. Acesso em: 4 out. 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 2008.

SPANOS, G. A.; CHEN, H.; SCHWARTZ, J. Supercritical CO₂ extraction of a carotene from sweet potatoes. **J. Food Sci.**, n. 58, p. 817-820, 1993.

STORER, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 110, p. 294-300, 2012.

TAGLIARI, M. S.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Efeito de extratos de plantas na mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 259-264, abr./jun. 2010.

TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1996.

TORETTA, J. P.; BASILIO, A. M. Dispersión polínica y éxito reproductivo de cuatro especies arbóreas de un bosque xerófito de Argentina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 57, n. 1-2, p. 283-292, 2009.

VENKATESWARAN, P. S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B. S. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: in vitro and in vivo studies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 84, p. 274-278, 1987.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. . Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 326-337, 2006.

WALIWIWIYA, R. et al. Plant terpenoids: acute toxicities and effects on flight motor activity and wing beat frequency in the blow fly *Phaenicia sericata*. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 1, p. 72-84, 2012.

4 ARTIGO: AVALIAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS LAGARTAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J.E. SMITH, 1979) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)¹

SOARES, P.²
 ALMEIDA, R. N.³
 D'INCAO, M. P.⁴
 CASSEL, E.⁵
 RODEMBUSCH, F. S.⁶
 CAMPO, L. F.⁷
 FIUZA, L. M.⁸
 MEDINA, L. F. da C.⁹

Resumo: *Spodoptera frugiperda* é uma praga polífaga, conhecida na cultura do milho como lagarta-do-cartucho-do-milho. Esse inseto-praga de importância agrícola tem sido controlado com inseticidas sintéticos, que podem causar elevados impactos ambientais. Extratos vegetais podem contribuir na produção de inseticidas botânicos, pelo efeito tóxico que causam. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de dez plantas medicinais, e a concentração letal média (CL) frente à lagartas de *S. frugiperda*. As plantas foram coletas em São Leopoldo/RS e no preparo dos extratos vegetais, utilizou-se água esterilizada em temperatura ambiente, decocção, etanol 70% e extração com CO₂ supercrítico a 40°C e 100, 150 e 250 bar. Os bioensaios foram divididos em triagem das plantas medicinais através de efeito agudo com os extratos convencionais, aplicação da extração supercrítica na planta selecionada, seguido de fracionamento com cromatografia de coluna seca e determinação da CL₅₀ do extrato selecionado. Nos resultados da triagem de plantas, os extratos com água não se mostraram eficientes, já com etanol 70% *Jodina rhombifolia* apresentou 31% de mortalidade corrigida (MC). Os resultados dos extratos supercríticos se mostraram significativos para 250 bar, atingindo 97% de MC (CL₅₀ 0.00472). Os resultados do fracionamento do extrato sugerem que a eficiência da planta no controle da lagarta esta relacionada ao efeito de sinergismo. Conclui-se que *J. rhombifolia* é eficiente para o controle de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: *Jodina rhombifolia*, plantas medicinais, extração supercrítica, controle biológico.

Abstract: *Spodoptera frugiperda* is a polyphagous pest in corn known as fall armyworm. This insect pest of agricultural importance has been controlled with synthetic insecticides, which can cause high environmental impacts. Plant extracts may contribute to the production of botanical insecticides, for the toxic effect they cause. The aim of this study was to evaluate the toxicity of ten

¹ Este artigo não está formatado de acordo com escopo da ABNT.

² UNISINOS – Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, São Leopoldo – RS.

³ PUCRS – Laboratório de Operações Unitárias, Porto Alegre – RS.

⁴ UNISINOS – Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, São Leopoldo – RS.

⁵ PUCRS – Laboratório de Operações Unitárias, Porto Alegre – RS.

⁶ UFRGS – Laboratório de Novos Materiais Orgânicos, Porto Alegre – RS.

⁷ UFRGS – Laboratório de Novos Materiais Orgânicos, Porto Alegre – RS.

⁸ UNISINOS – Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, São Leopoldo – RS.

⁹ UNISINOS – Laboratório de Biologia Molecular, São Leopoldo – RS. lfmedina@unisin.br

medicinal plants, and the mean lethal concentration (LC₅₀) to the larvae of *S. frugiperda*. Plants were collected in São Leopoldo / RS and for the preparation of the plant extracts, three solvents were used: sterile water at room temperature, decoction, and 70% ethanol extraction with supercritical CO₂ at 40°C and 100, 150 and 250 bar. Bioassays were divided into screening of medicinal plants through acute effect with conventional extracts, application of supercritical extraction from the selected plant followed by fractionation with dry column chromatography and determination of lethal concentration (LC) of the selected extract. The results of the plants screening showed that none of the extracts with water were efficient. On the other hand, *Jodina rhombifolia* with 70% ethanol showed 31% of corrected mortality (CM). The results of the supercritical extracts were significant at 250 bar, reaching 97% CM (LC₅₀ 0.00472). The result of fractionation of the extract suggests that plant efficiency in controlling the fall armyworm is related to the effect of synergism. It is concluded that *J. rhombifolia* is effective for the control of *S. frugiperda*.

Keywords: *Jodina rhombifolia*, medicinal plants, supercritical extraction, biocontrol.

4.1 INTRODUÇÃO

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) popularmente conhecida como lagarta-do-cartucho-do-milho, constitui-se de uma praga de importância agrícola, não somente pelos danos provocados nas lavouras, como desfolhamentos das plantas e perda de produção, mas também pela dificuldade de seu controle que é realizado com o uso de inseticidas químicos (SANTIAGO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; STORER et al., 2012). O controle químico com agrotóxicos não seletivos e sem a rotação de produtos do mesmo gênero, pode causar desequilíbrios mediante a eliminação de insetos benéficos às lavouras (BRITTAIN; POTTS, 2010), explosões populacionais de pragas e a perda de eficácia de inseticidas mediante a seleção natural de linhagens de insetos resistentes a estes compostos (MUNIZ et al., 2008; BORGONI; VENDRAMIM, 2003; BELAY et al., 2009). Na busca de alternativas a estes problemas, existe um interesse crescente em produtos naturais tóxicos de plantas (ELANGO et al., 2012). O emprego de substâncias inseticidas extraídas de plantas tem inúmeras vantagens, quando comparado com o uso de sintéticos como a baixa toxicidade ao meio ambiente e por ser ponto de partida para a síntese de novos produtos (HOLZ et al., 2008).

As plantas medicinais são uma fonte de compostos químicos que servem como alternativa no controle de agentes causadores de danos em lavouras. Elas

têm sido relatadas por mostrar atividades bioativas, como inseticidas, antifúngica e nematicida. Muitos trabalhos têm estudado os extratos de plantas ou fitoquímicos como fontes potenciais de controle biológico (SEO; PARK, 2012). Os compostos responsáveis por realizar este controle são produtos do metabolismo secundário das plantas (MANN, 1995; CAVALCANTE; CARRANO; DIAS, 2006) que estão relacionados com mecanismos de defesa das plantas (COLEY; BARONE, 1996; HOCHULI, 2001; CATEHOUSE, 2002). Os efeitos são variáveis podendo apresentar mortalidade aguda, repelência, infertilidade de machos e fêmeas, modificar o comportamento de vida, o desenvolvimento ou reduzir a alimentação da lagarta (MOREIRA et al., 2004).

Neste contexto há um aumento significativo na busca por inseticidas alternativos que causem menores impactos nas comunidades biológicas existentes nas lavouras, assim como a redução dos fatores contaminantes dos produtos gerados destas lavouras e dos aplicadores de inseticidas sintéticos.

A extração com fluido supercrítico (EFS) é um potencial método para auxiliar na busca por estas moléculas ativas nas plantas medicinais, está em conformidade com os princípios da Química Verde e tem vantagens ao extrair compostos bioativos a partir de uma matriz natural. Em particular, a utilização de CO₂ supercrítico como solvente, permite a extração em condições de temperatura crítica (31°C) e pressão (71 bar) evitando assim a degradação térmica dos compostos extraídos (MARTÍN et al. 2011). No entanto, este método ainda não é explorado suficientemente com fins de produtos para controle biológico.

Neste sentido, foi verificada a importância do uso de plantas medicinais para o controle de pragas de lavouras, como uma alternativa natural para resolver este problema. O objetivo deste trabalho foi avaliar os extratos vegetais de dez plantas, consideradas popularmente como medicinais no sul do Brasil, através de métodos de extração convencionais e por extração supercrítica, visando sua aplicação no controle biológico de lagartas de *S. frugiperda*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

No presente estudo foram utilizadas as partes aéreas (folhas) (Tabela 2), de nove plantas para realizar uma triagem inicial do potencial pesticida das mesmas. Todas as plantas foram coletadas no Município de São Leopoldo/RS, de localização geográfica Latitude: 29° 45' 39" Leste; Longitude: 51° 08' 50" Oeste. As coletas foram realizadas na parte da manhã, em dias sol, não antecedidos de chuva para minimizar a interferência dos fatores ambientais na composição química existentes nos tecidos das plantas.

Tabela 2 - Plantas medicinais utilizadas nos bioensaios com lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Nome Comum	Nome Científico	Família	Princípio Ativo
Babosa	<i>Aloe</i> sp.	Aloeaceae	Antracênicos
Guaco	<i>Mikania</i> sp.	Asteraceae	Polifenóis e taninos
Chá-de-Bugre	<i>Casearia sylvestris</i>	Flacourtiaceae	Flavonas e saponinas
Jambolão	<i>Syzygium cumini</i>	Myrtaceae	Fenilpropanóides
Boldo-rasteiro	<i>Plectranthus neochilus</i>	Lamiaceae	Quinonas
Cancorosa	<i>Jodina rombipholia</i>	Santalaceae	Polifenóis
Pariparoba	<i>Piper umbellatum</i>	Piperaceae	Fenóis e esteróides
Alcanfor	<i>Artemisia camphorata</i>	Asteraceae	Terpenos voláteis
Quebra-pedra	<i>Phyllanthus niruri</i>	Euphorbiaceae	Saponinas e terpenos

Fonte : Simões et al. (2007), Lopes, Ritter e Rates (2009), Pinto et al. (2005) e Ferrante et al. (2007)

4.2.2 Extratos

4.2.2.1 Extratos Brutos

As folhas das 9 plantas medicinais utilizadas neste estudo (Tabela 2) foram maceradas com nitrogênio líquido (-196°C) a fim de se obter um pó. Após a maceração, este pó foi suspenso em tubo do tipo Falcon na proporção de 1g de pó para 5 mL de solvente (1w:5v). Os solventes utilizados para as extrações foram: i) água destilada autoclavada à temperatura ambiente; ii) água destilada autoclavada quente por decocção (80°C por 30 min); iii) etanol na concentração de 70% em temperatura ambiente. Estes foram armazenados por 24 horas a 4°C

e posteriormente filtrados em papel filtro esterelizado. Os extratos brutos obtidos foram armazenados em microtubos de 1 mL e mantidos sob congelamento a -18°C .

4.2.2.2 Extração Supercrítica

O processo de extração supercrítica, com CO_2 como solvente, foi utilizado para a obtenção dos extratos de *J. rhombifolia* após a realização dos ensaios agudos e a seleção da mesma. A matéria-prima utilizada consiste no pó das folhas secas a 50°C por 48 horas em estufa, após a secagem das folhas foi feita a moagem com triturador para obtenção do pó. Uma quantidade de 150g foi usada para realizar a extração em uma unidade piloto automatizada, desenvolvida para trabalhar com CO_2 em condição supercrítica, que se encontra no Laboratório de Operações Unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre. Após a extração supercrítica foram obtidos os extratos coletados nas condições de temperatura igual a 40°C e pressão de 100, 150 e 250 bar, sem a utilização de co-solventes. A massa resultante do processo foi diluída em acetona na proporção de 1:2 g/mL e mantida em frascos do tipo Scotch a 4°C .

4.2.3 Insetos

As colônias de insetos da espécie *S. frugiperda*, oriundas das culturas do milho e arroz, se encontram estabelecidas em condições controladas na Sala de Criação de Insetos, no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo – RS. Durante todas as fases do ciclo de vida, a espécie se mantém em sala climatizada a temperatura aproximada de 25°C , fotofase de 12 horas e 60% de umidade relativa (U.R.) do ar.

4.2.4 Bioensaios

4.2.4.1 Toxicidade Aguda: Triagem de Plantas

Nos ensaios de toxicidade aguda dos 9 extratos das plantas medicinais foram utilizadas lagartas de 2^o ínstar acondicionadas individualmente em 15 placas de acrílico, de 35 mm de diâmetro, contendo dieta artificial de Poitout, onde foram aplicados 100 µL dos extratos. Cada experimento foi realizado em triplicata, totalizando 45 lagartas por tratamento, sendo na testemunha o extrato substituído por água destilada autoclavada e outro pelo solvente (água, etanol 70% ou acetona). Os bioensaios foram mantidos em câmeras do tipo Biological Oxygen Demand (B.O.D.) (25°C, 12 h fotofase e U.R. 60%) e observados num período de 7 dias para avaliação dos efeitos agudos.

4.2.4.2 Toxicidade Aguda dos Extratos por Fluido Supercrítico (EFS)

Nos ensaios de toxicidade aguda dos extratos de *Jodina rhombifolia* com CO₂ supercrítico foram utilizadas lagartas de 2^o instar acondicionadas individualmente em placas de acrílico de 35 mm contendo dieta artificial de Poitout onde foram aplicados 100 µL dos extratos. Cada tratamento foi constituído por 15 insetos e realizados em triplicata, sendo no controle o extrato substituído pelo solvente acetona e outro com água esterilizada. Os bioensaios foram mantidos em câmeras do tipo B.O.D (25°C, 12 hrs fotofase e UR 60%) e observados durante 7 dias para avaliação dos efeitos agudos.

4.2.4.3 Concentração Letal (CL₅₀, CL₇₀ e CL₉₀) do extrato a 250 bar

Para os ensaios de concentração letal (CL) foram utilizadas lagartas de 2^o ínstar. Estas foram mantidas individualmente em 15 placas de acrílico (35 mm de diâmetro), contendo a dieta artificial específica de Poitout, onde foram aplicados 100 µL dos extratos. Os tratamentos foram obtidos através de diluição seriada, reduzindo a massa à metade da solução mãe (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 e 0,78125%). O controle foi substituído por água destilada esterilizada e outro utilizando o solvente acetona. Ao final do bioensaio, 45

lagartas foram utilizadas por tratamento, em triplicata totalizando 135. Os experimentos foram mantidos em incubadora do tipo B.O.D., (25°C, 12 h de fotofase e U.R. 60%). A mortalidade foi avaliada diariamente durante 7 dias após a aplicação dos tratamentos.

4.2.4.4 Toxicidade Aguda dos Extratos Fracionados

Os bioensaios para avaliação da toxicidade dos extratos fracionados foram realizados utilizando lagartas de 2º instar acondicionadas em 10 placas de acrílico de 35 mm contendo dieta artificial de Poitout. Sobre as placas foram aplicados 100 µL de extrato por tratamento. Para este bioensaio, os extratos utilizados foram as frações de 250 bar supercrítico gerados da cromatografia de coluna seca. Os extratos foram divididos em frações sendo a fração 1 denominada de F1 e assim sucessivamente para as 5 frações (F1, F2, F3, F4 e F5). A diluição dos extratos foi feita com acetona pura. Os tratamentos controle foram feitos com água esterilizada e outro com o solvente utilizado. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D., (25°C, 12 hrs de fotofase e U.R. 60%) e avaliados durante 7 dias após a aplicação dos tratamentos.

4.2.5 Fracionamento dos Extratos Supercríticos

4.2.5.1 Cromatografia em Coluna Seca (CCS)

Na coluna foram colocados aproximadamente 50 g de sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm Merck). Antes dos extratos, foram colocados os solventes puros e após, os solventes novamente para a eluição. Foi utilizado o solvente acetato de etila para o fracionamento de compostos apolares e o solvente hexano para o fracionamento de compostos polares. Deste procedimento foram gerados 5 frascos (dois apolares e três polares) contendo frações diferentes (F1, F2, F3, F4 e F5) que, com o auxílio de um Rotavapor (Büchi R-114), foram concentrados, pesados e diluídos em acetona para aplicação nos bioensaios.

4.2.6 Análises Estatísticas

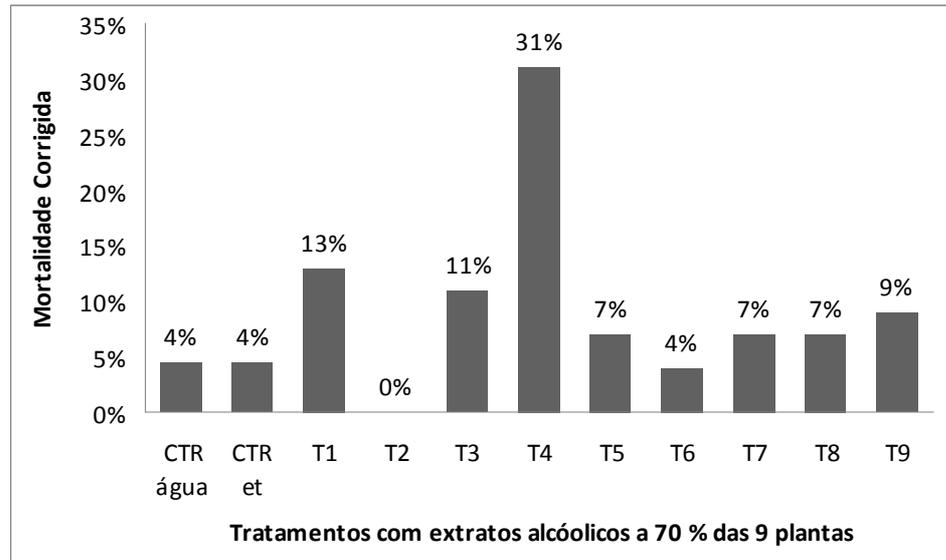
A mortalidade obtida a partir dos bioensaios foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925) gerando assim os resultados de mortalidade corrigida (MC). Os resultados dos testes de toxicidade aguda foram submetidos à ANOVA One Way e as médias comparadas por Tukey a 5% de probabilidade com o programa estatístico SISTAT 13. Os índices de mortalidade para os diferentes tratamentos foram comparados pela Análise de Probit de acordo com Finney (1971) e para a determinação das doses letais, causando 90%, 70% e 50% de eficácia, em intervalos de confiança de 95%.

4.3 RESULTADOS

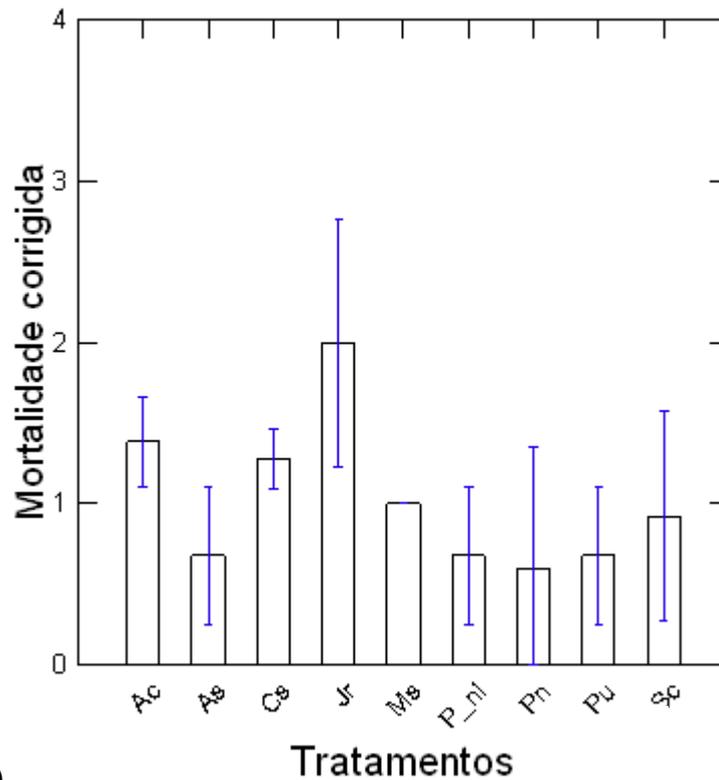
4.4 TRIAGEM DE PLANTAS: EXTRATOS BRUTOS

Nos bioensaios de efeito agudo dos extratos preparados com água fria e quente (temperatura ambiente e decocção) verificou-se que não houve resultados significativos para a mortalidade da praga alvo em relação ao controle, devido à baixa mortalidade que as dez plantas causaram. A planta que apresentou maior mortalidade com água fria foi a Babosa (*Aloe* sp.) tendo MC = 17% e $p = 0,167$. Nos testes com água quente, a planta que apresentou maior mortalidade foi o Chá-de-brugre (*Casearia sylvestris*), tendo MC = 15% e $p = 0,349$, no período de avaliação (7 dias). Estes resultados não são considerados positivos para indicação de manejo integrado de pragas.

As mortalidades corrigidas dos bioensaios realizados com extratos alcoólicos a 70% de todas as plantas são apresentadas na Figura 4a, onde Cancorosa (*J. rhombifolia*) apresentou maior eficiência, com MC = 31% nos bioensaios. A análise de variância (Figura 4b) apresenta o valor de $p < 0,009$, em relação ao tratamento controle. As demais plantas apresentaram mortalidades inferiores a 15%, no período de avaliação (7 dias). O controle de água esterilizada se manteve dentro do limite aceitável de 10%.

Figura 4 - Eficiência dos extratos brutos frente a *S. frugiperda*

a)



b)

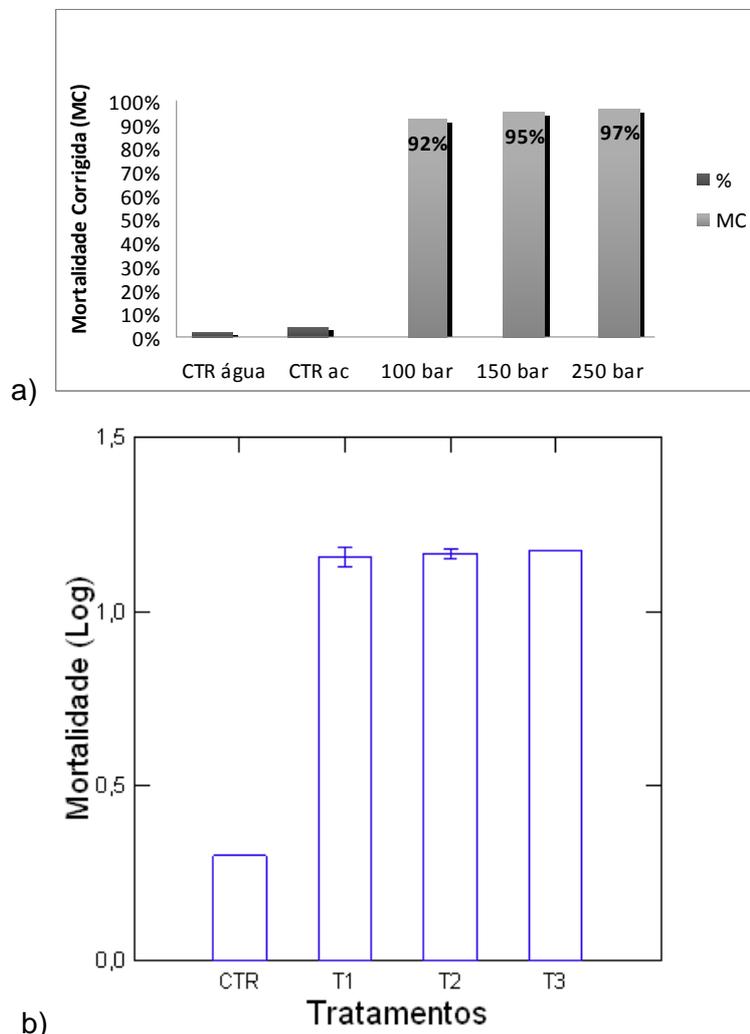
a). Mortalidade Corrigida (MC) em raiz quadrada, dos extratos alcóolicos a 70%, das dez plantas medicinais frente à *Spodoptera frugiperda*

b). Análise de variância dos extratos alcóolicos das dez plantas ($p < 0,009$). (CTR água) controle de água; (CTR et) controle de etanol; (T1) *Aloe* sp; (T2) *Artemisia camphorata*; (T3) *Casearia sylvestris*; (T4) *Jodina rhombifolia*; (T5) *Mikania* sp.; (T6) *Phyllanthus niuri*; (T7) *Plectranthus neochilus*; (T8) *Piper umbellatum*; (T9) *Syzygium cumini*.

4.4.1 Extração Supercrítica com *J. rhombifolia*

Os resultados obtidos a partir dos bioensaios de efeito agudo dos extratos supercríticos de *J. rhombifolia* (Figura 5a) mostraram que o mais eficiente foi com a extração a 250 bar, apresentando 97% de mortalidade corrigida em comparação aos extratos a 100 e 150 bar, que apresentaram 92 e 95% respectivamente. A análise de variância (Figura 5b) apresentou resultados significativos com $p = 0,001$ e o controle de acetona e água esterilizada se mantiveram dentro do limite aceitável de 10% nos dois testes.

Figura 5 - Eficiência dos extratos supercritico de *J. rhombifolia* frente a *S. frugiperda*



a) Mortalidade Corrigida (MC) e percentagem (%) total de lagartas mortas dos extratos feitos por extração supercrítica a 100 bar, 150 bar e 250 bar. (CTR água) tratamento controle com água; (CTR ac) tratamento controle com acetona;

b) Análise de variância (valor em Log) dos extratos feitos por extração supercrítica a 100 bar (T1), 150 bar (T2) e 250 bar (T3) frente à *Spodoptera frugiperda*. (CTR) controle com solvente acetona ($p = 0,001$).

4.4.2 Concentração Letal dos Extratos Supercríticos de *J. Rhombifolia*

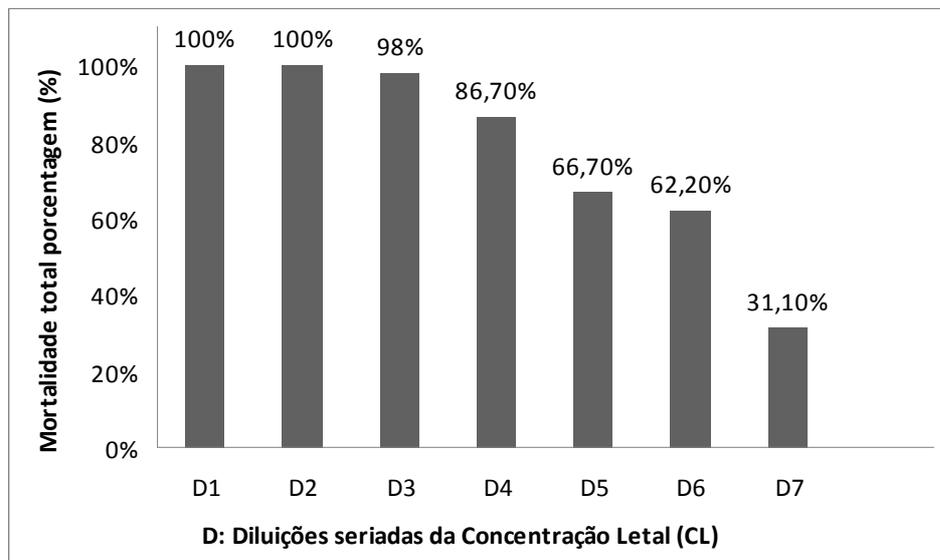
A concentração letal (CL) do extrato obtido a 250 bar (Tabela 3) foi determinada para 90, 70 e 50% de mortalidade de *S. frugiperda*. A CL foi realizada com estas considerações de extração (40°C e 250 bar) que apresentou maior mortalidade corrigida nos bioensaios de efeito agudo com os extratos supercríticos e a determinação da CL foi analisada até o segundo dia de tratamento. Os resultados mostraram que há uma equivalência entre massa e porcentagem de mortalidade. Quanto maior a massa do extrato, a 250 bar, maior a porcentagem de mortalidade da praga alvo, onde a $CL_{90} = 0.03973$, $CL_{70} = 0.01129$ e $CL_{50} = 0.00472$.

Tabela 3 - Concentração Letal dos extratos de *J. rhombifolia* obtidos por extração Supercrítica frente às lagartas de *S. frugiperda*.

Concentração Letal (CL) do extrato a 250 bar com CO ₂ supercrítico (g/mL) (IC 95 %: LI-LS)	
	250 bar
CL ₉₀	0.03973 (0.02394 – 0.09232)
CL ₇₀	0.01129 (0.00783 – 0.01767)
CL ₅₀	0.00472 (0.00298 – 0.0682)

IC – Intervalo de Confiança: LI= Limite Inferior; LS= Limite Superior.

O valor da mortalidade de *S. frugiperda* de cada tratamento da concentração letal foi calculado utilizando o total de indivíduos mortos para cada uma das diluições seriadas. Na Figura 6, pode ser observado que os extratos a 250 bar diluídos a 100 e 50% apresentaram 100% de mortalidade e a mortalidade mais baixa foi encontrada na diluição 1,5625% que apresentou 31,1%.

Figura 6 - Eficiência dos extratos diluídos de *J. rhombifolia* frente a *S. frugiperda*

Mortalidade total em porcentagem (%) de *S. frugiperda* em relação a massa resultante das diluições seriadas da CL do extrato a 250 bar. (D1) 100%: 0,08733 g/mL; (D2) 50%: 0,04366 g/mL; (D3) 25%: 0,02183 g/mL; (D4) 12,5%: 0,01091 g/mL; (D5) 6,25%: 0,00545 g/mL; (D6) 3,125%: 0,00279 g/mL; (D7) 1,5625%: 0,00136 g/mL.

4.4.3 Fracionamento com CCS dos extratos a 250 bar de *J. rhombifolia*

Todas as frações dos extratos a 250 bar apresentaram uma mortalidade de 100%. Os controles de acetona e água esterilizada se mantiveram dentro do limite aceitável de 10%. Na tabela 4, pode ser observado que as frações F2, F4 e F5 causaram mortalidade dentro das primeiras 24 horas e as frações F1 e F3 causaram mortalidade no período de avaliação (7 dias).

Tabela 4 - Mortalidade total das frações em relação aos dias de exposição ao tratamento

Dias/ Frações	CTR água	CTR ac	F1	F2	F3	F4	F5
1º dia	0	0	0	10	3	10	10
2º dia	0	1	2	-	8	-	-
3º dia	0	-	6	-	10	-	-
4º dia	Sábado	-	-	-	-	-	-
5º dia	Domingo	-	-	-	-	-	-
6º dia	0	-	10	-	-	-	-
7º dia	0	-	-	-	-	-	-

(-) não avaliado; CTR água: tratamento controle de água; CTR ac: tratamento controle de acetona; (F1) fração 1; (F2) fração 2; (F3) fração 3; (F4) fração 4 e (F5) fração 5

4.5 DISCUSSÃO

As plantas têm sido usadas comumente como uma fonte de moléculas ativas para medicina popular, repelente de insetos, cosméticos, pigmentos, sendo uma prática muito difundida no mundo. Entre os agentes químicos encontrados nas plantas, há muitas substâncias que estão sendo empregadas atualmente pelas populações humanas, para o tratamento de vários tipos de doenças. No entanto, o uso destes extratos para o controle biológico de pragas de lavouras é uma técnica pouco empregada. Sabe-se que os extratos vegetais podem apresentar atividade tóxica contra insetos, pois com a ameaça contínua de diferentes insetos fitófagos nas lavouras, as plantas desenvolveram um arsenal de estratégias de defesa (GÜLL et al., 2012; SILVEIRA e SÁ; LEITE; ALMEIDA, 2012; VANDENBORRE et al., 2011).

Nos bioensaios dos extratos das dez plantas medicinais com etanol a 70% foi possível verificar uma maior eficiência no controle de *S. frugiperda* em comparação aos métodos de extração com água, que apresentaram baixa mortalidade. O etanol possui uma polaridade mais baixa em relação a água, o que pode explicar a extração de parte dos compostos apolares neste extrato. As plantas *J. rhombifolia* e *U. dioica* apresentaram maior atividade (Tabela 1) para o controle de *S. frugiperda*. Estas plantas são ricas em compostos como polifenóis e flavonoides. Nencu et al. (2012) realizaram estudos preliminares sobre o uso terapêutico de *U. dioica* e encontraram uma predominância destes dois compostos em suas partes aéreas. Análise cromatográfica dos compostos ativos dos extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas de *J. rhombifolia*, Montanha et al. (2009) revelaram a predominância de flavonoides e C-glycosylflavonoides. Em estudos sobre a superexpressão de polifenol oxidase de tomateiros, Mahanil et al. (2008) sugeriram que tal superexpressão deste composto aumenta a resistência da planta frente às lagartas de *Spodoptera litura*. Em estudos com polifenóis, Isayama et al. (2011) mostraram que alguns polifenóis, presentes nas folhas do morangueiro, são responsáveis pelos efeitos inibidores sobre a atividade inseticida de uma planta Bt (*Bacillus thuringiensis*) em *S. litura*. Já em relação aos flavonoides, estudos recentes realizados por Jadhav et al. (2012), evidenciaram que há um efeito significativo de flavonoides sobre a inibição do crescimento das lagartas de *Helicoverpa armigera*. Todos estes estudos são

relacionados a algum tipo de agricultura que utiliza recursos de controle biológicos para o combate de lepidópteros praga, que, no caso do presente estudo, podem ser comparados quanto à eficiência dos compostos ativos presentes nos tecidos vegetais das plantas testadas e relatados pelos autores citados .

A mortalidade corrigida do extrato alcoólico de Urtiga (*U. dioica*) apresentou resultado mais significativo do que Cancorosa (*J. rhombifolia*). A escolha de *J. rhombifolia* para realizar a extração supercrítica foi baseada no fato que para esta planta ainda não foram feitos registros científicos do seu potencial tóxico para o controle de Lepidópteros e na facilidade de obter folhas do campo de coletas.

O extrato supercrítico é amplamente empregado nos processos de extração de compostos de origem vegetal e influenciado pelas condições operacionais (BARROSO et al., 2011). Os resultados obtidos de mortalidade corrigida de *S. frugiperda* com o extrato supercrítico (Figura 4a) apresentaram maior eficiência a 250 bar (97% - $CL_{50} = 0.00472$) do que 100 e 150 bar (92 e 95%), porque quanto maior a pressão durante a extração, maior será o tamanho das moléculas extraídas e estas podem apresentar uma menor polaridade. Corroborando com o fato de o etanol também ter sido mais eficiente na triagem. Este método de extração a 40°C e 250 bar foi selecionado a partir destes resultados para os testes de concentração letal e fracionamento dos extratos. No estudo de Pavavela et al. (2008) foi empregada a extração supercrítica de Camomila (*Tanacetum parthenium*) para o controle de *S. littoralis* mostrando que os extratos tiveram reação inibidora de alimentação e inibidor de crescimento com dose letal de 0,53 µL/g e este foi sugerido por possuir potencial inseticida.

Os bioensaios com o extrato a 250 bar fracionado com cromatografia em coluna seca foram realizados para avaliar os efeitos sinérgicos ou antagônicos causadores da mortalidade das lagartas. O extrato fracionado a 250 bar apresentou mortalidade igual em todas as frações (Tabela 4), sendo este, um indicativo de sinergismo. Este efeito causado na mistura do extrato é sugerido para explicar a sua alta eficiência. Assim como Martín et al. (2011) sugeriu o mesmo efeito quando realizaram estudos utilizando extrato supercrítico de *Artemisia absinthium* para o controle de *Spodoptera littoralis* e outras duas espécies de pulgões. Os extratos supercríticos foram consideravelmente mais

ativos contra *S. littoralis*. Quase todos os extratos supercríticos exibiram uma atividade inibidora de alimentação superior a 80% e a atividade biológica destes extratos variou de acordo com a sua composição.

A massa total resultante dos extratos a 250 bar obtidos na extração supercrítica e utilizada nos bioensaios foi de 0,2483 mg/mL. O produto Arrivo 200 EC é um inseticida do grupo dos piretróides que age por contato e ingestão proporcionando um efeito de repelência. Atua no sistema nervoso central da praga bloqueando a transmissão de impulsos nervosos (RURAL CENTRO, 2012). De acordo com a bula deste produto, são utilizadas 200 g de Cipermetrina (ingrediente ativo sintético contra *S. frugiperda*) por litro de emulsionáveis para 10 litros de água em aplicação nas lavouras (ha). Os boletins de recomendação técnica da quantidade de Cipermetrina necessária para o controle de 50% de *S. frugiperda* para milho (FEPAGRO, 2009) é de 80 mg/mL e para arroz (SOSBAI, 2012) é de 75 mg/mL.

O extrato supercrítico possui uma maior concentração de compostos que os extratos brutos convencionais. Quando diluído e a massa por mL reduzida, este pode estar com seus valores próximos aos extratos brutos, confirmando que a extração supercrítica apresenta vantagens quando comparadas a outros métodos de extração.

Os bioinseticidas podem ser eficazes, seletivos, biodegradáveis, com pouca ou nenhuma resistência pela praga e nenhuma toxicidade para o ambiente. O uso comum de extratos vegetais na medicina popular significa que as substâncias contidas nos extratos podem ser seguras para o ambiente. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para identificar os compostos ativos e avaliar o custo, a eficácia e a rentabilidade destes extratos contra a grande variedade de pragas e a favor da grande variedade de inimigos naturais encontrados nas lavouras de produções agrícolas.

4.6 CONCLUSÕES

Baseado nos presentes resultados é possível concluir-se que os extratos supercríticos com dióxido de carbono, a partir de *J. rhombifolia*, têm efeito tóxico agudo contra *S. frugiperda* sob as condições de exposição, principalmente o extrato a 250 bar que apresentou eficiência em todos os testes realizados. Por

consequente, estes extratos podem ser usados como inseticidas naturais eficientes contra a praga alvo do presente trabalho (estudos sobre insetos polinizadores devem ser realizados).

4.7 REFERENCIAS

BARROSO, M. S. T. et al. Supercritical fluid extraction of volatine and non-volatine compounds from *Schinus molle* L. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 305-312, 2011.

BELAY, D. K. et al. Spatial genetic variation among *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) sampled from the United States, Puerto Rico, Panama and Argentina. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 105, n. 2, p. 359-367, 2009.

BORGONI, P. C.; VENDRAMIN, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Revista Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 665-669, 2003.

BRITAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, v. 12, n. 2011, p. 321-331, 2010.

CATEHOUSE, J. A. Plant resistance toward insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, n. 156, p. 145-169, 2002.

CAVALCANTE, G.; CARRANO, A.; DIAS, S. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 41, p. 9-14, 2006.

CELIS, A. et al. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperácea: una Revisión. **Agronomía Colombiana**, n. 26, p. 97-106, 2008.

COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 27, p. 305-335, 1996.

CRUZ, I. Alternativas para o controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* e principais cuidados no uso de milhos transgênicos resistentes a insetos. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed.). **Milho: fatores determinantes da produtividade**. Piracicaba: USP-ESALQ, 2007.

_____. **Manejo da resistência de insetos pragas a inseticidas com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 21).

ELANGO, G. et al. Efficacy of medicinal plant extracts against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. **Industrial Crops and Products**, n. 36, p. 524-530, 2012.

FEPAGRO. **Boletim de recomendações técnicas para milho**. 2009. Disponível em: <www.fepagro.rs.gov.br>. Acesso em: 14 nov. 2012.

FERRANTE, L. M. S. de et al. GC/FID-based authentication of *Baccharis trimera*: a quality control study of products commercialized in Curitiba and metropolitan region (Brazil). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 356-360, 2007.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1971.

GONZALEZ-COLOMA, A. et al. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 34, n. 8, p. 609-616, 2006.

GÜLL, S. et al. Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *urtica dioica* L. **Bull Environmental Contamination and Toxicology**, n. 88, p. 666-671, 2012.

HOCHULI, D. F. Insect herbivory and ontogeny: How do growth and development influence feeding behavior, morphology and host use. **Austral Ecology**, n. 26, p. 563-570, 2001.

HOLZ, A. M. et. al. Manejo alternativo de pragas. In. **Tópicos especiais em produção vegetal I**. Alegre: UFES, Centro de Ciências Agrárias, 2008.

ISAYAMA, S. et al. Influences of tannic acid and polyphenols in the leaves of strawberry, *Fragaria x ananassa*, and Perilla, *Perilla frutescens viridis* on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* formulation against the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.**, n. 55, p. 49-57, 2011.

JADHAV, D. R. et al. Effect of some flavonoids on survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: Noctuidae). **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 4, p. 298-307, 2012.

LOPES, R. K.; RITTER, M. R.; RATES, S. M. K. Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 3, p. 305-315, 2009.

MAHANIL, S. et al. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance. **Plant Science**, n. 174, p. 456-466, 2008.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon, 1995.

MARTÍN, L. et al. Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO₂) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. **Industrial Crops and Products**, n. 34, p. 1615-1621, 2011.

- MONTANHA, J. A. et al. Chemical and anti-ulcer evaluation of *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arm.) Resseik extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1^a, p. 29-32, 2009.
- MOREIRA, M. D. et al. Toxicity of leaf extracts of *Ageratum conyzoides* to Lepidoptera pests of horticultural crops. **Biological Agriculture and Horticulture**, n. 22, p. 251-260, 2004.
- MUNIZ, S. B. et al. Extratos vegetais empregados como inseticidas para o controle de curuquerê da couve (*Ascia monuste orsies*). In: X Seminário de Iniciação Científica e Extensão da UEMG; 4º Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da FUNEDI/UEMG, 2008, Divinópolis-MG. **Anais...** Divinópolis, MG: FUNEDI/UEMG, 2008.
- NENCU, Loana et al. Pesquisa preliminar sobre os usos terapêuticos da *Urtica dioica*. **Farmácia**, v. 60, n. 4, p. 493-500, 2012.
- PAVAVELA, R. et al. The insecticidal activity of *Satureja hortensis* L. extracts obtained by supercritical fluid extraction and traditional extraction techniques. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 43, n. 3, p. 377-382, 2008.
- PINTO, L. S. et al. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Florestal**, v. 9, n. 3, p. 385-390, 2005.
- POUITOUT, S.; BUES, R. Élevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu simplifié. **Ann. Ecol. Anim.**, n. 2, p. 79-91, 1970.
- RODRIGUES, R. S. et al. Atividade inseticida de extratos etanólicos de plantas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Agrarian**, n. 1, p. 133-144, 2008.
- RURAL Centro. Disponível em: <<http://mercado.ruralcentro.com.br/produtos/3755/arrivo-200-ec-fmc>>. Acesso em: 08 jan. 2013.
- SANTIAGO, G. P. et al. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2007.
- SEO, S. M.; PARK, I. K. Larvicidal activity of medicinal plant extracts and lignin identified in *Phryma leptostachya* var. *asiatica* roots against housefly (*Musca domestica* L.). **Parasitol Res**, n. 110, p. 1849-1853, 2012.
- SILVEIRA e SÁ, R. de C. da; LEITE, M. N.; ALMEIDA, R. N. de. Toxicological screening of *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, extract in male Wistar rats reproductive system, sperm production and testosterone level after chronic treatment. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 5, p. 718-723, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SOSBAI. **Boletim de recomendações técnicas para arroz**. 2012. Disponível em: <www.sosbai.com.br>. Acesso em: 14 nov. 2012.

STORER, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 110, p. 294-300, 2012.

VANDENBORRE, G. et al. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, n. 72, p. 1538-1550, 2011.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados positivos dos testes de toxicidade aguda conferem a *Jodina rhombifolia* uma alternativa promissora para o controle das lagartas de *Spodoptera frugiperda*. O controle biológico, mesmo sendo muito conhecido no mundo, ainda é pouco utilizado quando se refere ao uso de plantas como ferramenta de controle das pragas agrícolas. São necessárias grandes quantidades de material vegetal (folhas) para realizar a extração por método convencional, onde o rendimento de extrato e a concentração de compostos, neste método de extração, são muito baixos. Em comparação ao método de extração por fluido supercrítico (EFS) que realiza tal extração com uma quantidade moderada de material vegetal e o rendimento e concentração de compostos químicos é maior.

Através deste trabalho, podemos evidenciar que a extração supercrítica é um método eficiente e que pode ser uma ferramenta promissora para a extração dos compostos químicos ativos de *J. rhombifolia* contra as lagartas de *S. frugiperda*.

Diante dos resultados encontrados, as perspectivas são:

- a) estabelecer um método de extração supercrítica padrão para *J. rhombifolia*;
- b) realizar curva de rendimento dos extratos supercrítico de *J. rhombifolia*;
- c) identificar os principais compostos ativos presentes nos extratos através de método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- d) purificar os extratos com cromatografia de coluna seca (CCS) a fim de realizar testes de toxicidade aguda com as lagartas de *S. frugiperda*;
- e) determinar os efeitos citotóxicos que ocorrem nos insetos e outros organismos que ocorrem nas populações das lavouras agrícolas;
- f) determinar os efeitos tóxicos que ocorrem nos tecidos das planta utilizadas em lavouras (milho e arroz), avaliando a germinação e mal formação das plantas;

Sabe-se que ainda há muito a investigar, mas acredito no potencial da integração de métodos alternativos de extração de compostos vegetais para o controle biológico de pragas de lavouras e, principalmente, na atividade inseticida que *J. rhombifoliai* demonstrou nos testes realizados neste trabalho. Por isso, seguiremos com a busca por respostas desta planta à mortalidade de *S. frugiperda*.

ANEXOS

Participação em Eventos (Resumos):

Autoria:

SOARES, P. D'INCAO, M.P.; CASSAL, M.; OLIVEIRA, J.; FIUZA, L.M. 2011. Efeito de extratos de folhas de *Euphorbia milii*, *Eugenia uniflora* e *Pachystroma longifolium* às lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). In: **XII Simpósio de Controle Biológico**, 2011, São Paulo - SP.

SOARES, P. D'INCAO, M.P.; CASSAL, M.; OLIVEIRA, J.; FIUZA, L.M. Eficiência de extratos vegetais de *Euphorbia pulcherrima* no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera, Noctuide). In: **VII Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado**, 2011, Camburiu - SC.

SOARES, P. R. N. ALMEIDA; E. CASSEL; L. M. FIUZA; L. F. da C. MEDINA . Avaliação de diferentes extratos de *Jodina rombipholia* aplicados no controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). In: **XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2012, Bento Gonçalves – RS.

SOARES, P. R. N. ALMEIDA; E. CASSEL; L. M. FIUZA; L. F. da C. MEDINA. Efeito agudo de extratos de *Jodina rombipholia* obtidos por extração supercrítica no controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). In: **I Simpósio de Integração das Pós-graduações do CCB/UFSC**, 2012, Florianópolis – SC.

SOARES, P. QUADROS, B. C.; D'INCAO, M.P.; L. M. FIUZA; L. F. da C. MEDINA. Toxicidade aguda de diferentes plantas medicinais no controle biológico de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). In: **II Congresso de Iniciação Científica e Pós-graduação da Unisinos**, 2012, São Leopoldo – RS.

Co-Autoria:

D'INCAO, M.P., **SOARES, P.**; QUADROS, B. C.; OLIVEIRA, J.; FIUZA, L.M. Potencial bioinseticida de *Rhododendron simsii* e *Euphorbia pulcherrima* à *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH, 1797) (Lep., Noctuidae). In: XII Simpósio de Controle Biológico, 2011, São Paulo - SP.

D'INCAO, M.P., **SOARES, P.**; QUADROS, B. C.; OLIVEIRA, J.; FIUZA, L.M. Toxicidade de diferentes extratos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss à lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797). In: VII Congresso Brasileiro do Arroz Irrigado, 2011, Camburiu - SC.