

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ALEXANDRA APARECIDA ZORZAL

**ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E VÍRUS  
ENTOMOPATOGÊNICO NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda*  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

ALEGRE- ES  
2018

ALEXANDRA APARECIDA ZORZAL

**ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E VÍRUS  
ENTOMOPATOGÊNICO NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda*  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na área de Fitossanidade (Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Pin Dalvi.

Coorientador: Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago.

ALEGRE- ES  
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Z88a Zorzal, Alexandra Aparecida, 1991-  
Associação de óleos essenciais e vírus entomopatogênico no manejo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Alexandra Aparecida Zorzal. – 2018.  
63 f. : il.

Orientador: Hugo José Gonçalves dos Santos Junior.  
Coorientadores: Leandro Pin Dalvi ; Hugo Bolsoni Zago.  
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Pragas - Controle. 2. Lagartas. 3. Metabólitos. 4. Milho. I. Santos Junior, Hugo José Gonçalves dos. II. Dalvi, Leandro Pin. III. Zago, Hulgo Bolsoni. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 63

---

Bibliotecário: Felício Gomes Corteletti – CRB-6 ES-000646/O

ALEXANDRA APARECIDA ZORZAL

**ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E VÍRUS  
ENTOMOPATOGÊNICO NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda*  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, na área de Fitossanidade (Entomologia).

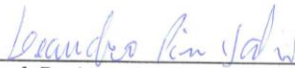
Aprovada em 27 de julho de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Hugo Gonçalves  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Leandro Pin Dalvi  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

Prof. Dr. Victor Dias Pirovani  
Instituto Federal do Espírito Santo- Campus Centro Serrano

Dedico à minha mãe Edimara e à minha avó Maria pelo exemplo de vida, pelo apoio, amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, que sempre me iluminou nos momentos de dificuldade e me proporcionou forças;

A minha família, ao Lucas Rocha, por toda confiança, incentivo e amor;

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade dada a minha formação profissional;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES), em especial ao NUDEMAFI - Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário pelo suporte científico;

Ao Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo (EMBRAPA/CNPMS), em especial ao pesquisador Dr. Fernando Hercos Valicente pelo apoio e parceria científica;

Ao meu orientador Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior pelos ensinamentos e orientação;

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago e Prof. Dr. Leandro Pin Dalvi, pelas sugestões e esclarecimentos;

Ao Prof. Dr. Victor Dias Pirovani por ter aceitado compor a banca e suas respectivas sugestões para o aprimoramento do trabalho;

Ao Prof. Dr. Claudio A. G. da Camara e ao discente, Marcilio M. de Moraes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil pela ajuda nas análises da composição química dos óleos essenciais;

A FAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro que possibilitaram a realização e conclusão desse trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo pelos ensinamentos;

Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos: Carlos Eduardo Paiva, Catariny Nicoli, Julianne Rodrigues, por não terem medido esforços em me ajudar na execução deste trabalho. E, a Lorena Contarini pela disponibilidade incondicional e ajuda quando necessário na condução dos ensaios;

Aos pós-graduandos, Laura Vaillant, Luiza Tamashiro, Mariana Almeida, Alice Braga, Julielson Ataide, Rafael Souza e Priscila Stinguel, pela amizade e momentos de descontração;

Ao funcionário Leonardo Mardgan, pelos conselhos, e momentos de descontração;

Ao funcionário Carlos Magno Ramos Oliveira, por toda ajuda e ensinamentos;

Ao Dr. José Romário de Carvalho pela ajuda e ensinamentos;

Aos estagiários do setor de Entomologia do NUDEMAFI, com os quais tive a oportunidade de conviver e trabalhar, mesmo aqueles que foram apenas passageiros pelo laboratório ou que não tiveram um tempo de convívio direto, o meu muito obrigado!

Às amigadas construídas durante o Mestrado, pelos momentos de convivência, carinho e apoio quando precisei em especial a Vanessa Barros, Felipe Siman e Joab Pedrosa;

Aos amigos de república, Kamila Areas, Matheus Alves e Gabriel Finotti;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação acadêmica e realização deste trabalho. Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

ALEXANDRA APARECIDA ZORZAL, filha de Edimara Zorzal, nasceu em 30 de dezembro de 1991 no município de Domingos Martins, localizado no estado do Espírito Santo, Brasil. Em agosto de 2011 iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Espírito Santo e graduou-se em agosto de 2016. No segundo semestre do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal para realizar o Mestrado na linha de pesquisa em Fitossanidade/Entomologia na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre – ES, submetendo-se à defesa de dissertação em 27 de julho de 2018.



## ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E VÍRUS ENTOMOPATOGÊNICO NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

### RESUMO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga do milho no Brasil. É um inseto polífago, com grande capacidade de infestar diferentes culturas de importância econômica. Seu manejo é realizado usualmente por meio de métodos químicos que podem causar problemas ambientais e favorecer o surgimento de populações de insetos resistentes aos inseticidas químicos sintéticos. Dessa forma, encontrar um método adequado para o manejo dessa praga torna-se necessário. Assim, o objetivo geral desse estudo foi avaliar a toxicidade dos óleos essenciais e o efeito associativo destes com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV). Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI, localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES). O estudo foi dividido em duas etapas, a primeira teve como objetivo, avaliar o efeito ovicida e a toxicidade de óleos essenciais às lagartas de *S. frugiperda* e a segunda etapa foi avaliar o efeito associativo do óleo de neem com o vírus entomopatogênico *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV). Na primeira etapa, realizou-se o método de imersão para avaliar a atividade ovicida e a pulverização para avaliar a toxicidade dos óleos sobre os três primeiros instares larvais de *S. frugiperda*. Com base nos resultados comprovou-se que todos os óleos apresentam atividade ovicida superior a 47%, destacando-se os óleos de citronela, melaleuca, palmarosa que afetaram a eclosão de todos os ovos. Com relação à atividade inseticida as larvas de *S. frugiperda*, as taxas de mortalidade variaram entre 2 a 94%. Além disso, verifica-se que houve uma diminuição da atividade inseticida com o desenvolvimento larval, exceto quando analisamos os índices de mortalidade do óleo de cravo no 2º e 3º instar de *S. frugiperda*. Baseando-se nos resultados e também pelo interesse de controlar essa espécie de inseto praga antes da eclosão ou no primeiro instar larval, foram estimadas as concentrações letais do óleo de

neem e copaíba, isso para subsidiar o estudo de associação com o SfMNPV. Portanto, com base nas estimativas da CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> do óleo de neem avaliou-se a associação com o isolado de SfMNPV na segunda etapa dessa pesquisa. Para isso, o efeito associativo entre o óleo de neem e o isolado de SfMNPV foi avaliado no 1º instar larval de *S. frugiperda* utilizando as respectivas CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> do óleo vegetal e vírus entomopatogênico. Dessa forma, determinou-se que a associação do SfMNPV com o óleo de neem afetou a multiplicação do vírus no seu hospedeiro natural, *S. frugiperda*, reduzindo conseqüentemente o número de poliedros virais por lagarta inoculada. Contudo, apesar de não ter ocorrido uma interação sinérgica, acredita-se que, é uma opção que pode ser avaliada em condições de campo, isso em virtude dos benefícios que o óleo vegetal promove aos poliedros virais no ambiente em relação à proteção contra a radiação ultravioleta.

**Palavras- chave:** Controle microbiano. Baculovirus. Lagarta-do-cartucho.

## ASSOCIATION OF ESSENTIAL OILS AND ENTOMOPATHOGENIC VIRUS IN THE MANAGEMENT OF *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

### ABSTRACT

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), considered the main pest of maize in Brazil. It is a polyphagous insect, with great capacity to infest different cultures of economic importance. Their management is usually carried out by chemical methods that can cause environmental problems and favor the emergence of insect populations resistant to synthetic chemical insecticides. Thus, finding a suitable method for the management of this pest becomes necessary. Thus, the general objective of this study was to evaluate the toxicity of the essential oils and the associative effect of these with *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV). The experimental tests were performed at the Laboratory of Microbial Control of Insects, Entomology Sector of NUDEMAFI, located at the Center of Agrarian Sciences and Engineering of the Federal University of Espírito Santo (CCAUE/UFES). The study was divided into two stages, the first one had as objective to evaluate the ovicidal effect and the toxicity of essential oils the *S. frugiperda* caterpillars and the second step was to evaluate the associative effect of neem essential oil with the entomopathogenic virus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV). In the first step, the immersion method was performed to evaluate ovicidal activity and spraying to evaluate the toxicity of the oils on the first three larval instars of *S. frugiperda*. Based on the results, it was verified that all the oils present ovicidal activity superior to 47%, especially the oils of citronella, melaleuca, palmarosa and clove that affected the hatching of all the eggs. Regarding the insecticidal activity of *S. frugiperda* larvae, mortality rates ranged from 2 to 94%. In addition, there was a decrease in insecticidal activity with larval development, except when we analyzed the mortality rates of clove oil in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instar of *S. frugiperda*. Based on the results and also for the interest of controlling this species of insect plague before hatching or in the first larval instar, the lethal concentrations of the neem and copaíba oils were estimated, to support the study of association with the SfMNPV. Therefore, based on the LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> estimates of neem oil, the association with the SfMNPV isolate was evaluated in

the second stage of this study. For this, the associative effect between the neem oil and the SfMNPV isolate was evaluated in the 1<sup>st</sup> larval instar of *S. frugiperda* using the respective LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> of the vegetable oil and entomopathogenic virus. Thus, it was determined that the association of SfMNPV with neem oil affected the multiplication of the virus in its natural host, *S. frugiperda*, consequently reducing the number of viral polyhedra per inoculated caterpillar. However, although a synergistic interaction has not taken place, it is believed that it is an option that can be evaluated under field conditions, this is due to the benefits that vegetable oil promotes to viral polyhedra in the environment in relation to protection against ultraviolet radiation.

**Keywords:** Microbial control. Baculovirus. Fall armyworm.

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2- TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS A *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais.....	35
Tabela 2. Mortalidade média de ovos de <i>S. frugiperda</i> ( $\pm$ EP) submetidos a diferentes óleos vegetais (Temperatura: $25 \pm 2$ °C; Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h).....	38
Tabela 3. Atividade inseticida de óleos vegetais a <i>S. frugiperda</i> (Temperatura: $25 \pm 2$ °C; Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h). ....	39
Tabela 4. Inclinação das curvas de concentração-resposta e concentração letal ( $CL_{50}$ e $CL_{95}$ ), três vezes no tempo, do óleo essencial de Copaíba ( <i>Copaifera officinalis</i> ) e óleo de Neem ( <i>Azadirachta indica</i> ), sobre lagartas de 1º ínstar de <i>S. frugiperda</i> (Temperatura: $25 \pm 2$ °C, Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h).....	41

### **CAPÍTULO 3- ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE NEEM E *Spodoptera frugiperda* *multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) VISANDO O MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Tabela 1. Concentração letal de SfMNPV a lagartas de 1º ínstar de <i>S. frugiperda</i> ...	54
Tabela 2. Produção de SfMNPV em lagartas de 1º ínstar de <i>S. frugiperda</i> , infectadas com SfMNPV, tratamento individual e associado com óleo de neem. ....	58

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
<b>CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>S. frugiperda</i> .....	15
2.2 CONTROLE MICROBIANO: SfMNPV.....	17
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS .....	19
<b>2.3.1 Manejo de <i>S. frugiperda</i> com extratos e óleos vegetais.....</b>	<b>20</b>
2.4 ASSOCIAÇÃO DE VÍRUS ENTOMOPATOGÊNICO E ÓLEOS ESSENCIAS ....	21
<b>3 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 2 - TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS A <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) .....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>27</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>28</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE <i>S. frugiperda</i> .....	30
2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS .....	30
2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	31
2.4 ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS VEGETAIS A <i>S. frugiperda</i> .....	31
<b>2.4.1 Efeito ovicida de óleos vegetais sobre os ovos de <i>S. frugiperda</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.2 Efeito inseticida de óleos vegetais às lagartas de <i>S. frugiperda</i>.....</b>	<b>32</b>
2.5 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL).....	33
2.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	33
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
3.2 EFEITO OVICIDA DE ÓLEOS VEGETAIS SOBRE OS OVOS DE <i>S. frugiperda</i> .....	37
3.3 EFEITO INSETICIDA DE ÓLEOS VEGETAIS ÀS LAGARTAS DE <i>S. frugiperda</i> .....	38
3.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL).....	40

<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>5 AGRADECIMENTOS</b> .....	42
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>APÊNDICE - ETAPAS DO ESTUDO DE TOXICIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS EM OVOS E LAGARTAS DE 1º, 2º, 3º ÍNSTAR DE <i>S. frugiperda</i>.</b> .....	46
<b>CAPÍTULO 3 - ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE NEEM E <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV) VISANDO O MANEJO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)</b> .....	47
<b>RESUMO</b> .....	47
<b>ABSTRACT</b> .....	48
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
2.1 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE <i>S. frugiperda</i> .....	50
2.2 OBTENÇÃO E PRODUÇÃO DE SfMNPV .....	50
2.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE NEEM.....	51
2.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL) DE SfMNPV .....	52
2.5 ASSOCIAÇÃO DO SfMNPV COM ÓLEO DE NEEM .....	52
2.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	53
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
3.1 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL) DE SfMNPV .....	54
3.2 ASSOCIAÇÃO DO SfMNPV COM ÓLEO DE NEEM .....	55
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>5 AGRADECIMENTOS</b> .....	59
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>APÊNDICE - ETAPAS DA ASSOCIAÇÃO DE SfMNPV E ÓLEO VEGETAL EM LAGARTAS DE <i>S. frugiperda</i>, UTILIZANDO FOLHAS DE MILHO COMO SUBSTRATO</b> .....	62
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63

## CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto com grande capacidade de infestar diferentes culturas de importância econômica em vários países. No Brasil, além do milho, ataca culturas como o trigo, sorgo, arroz, milho e algodão (BARROS et al., 2010; OMOTO et al., 2013).

Dentre os métodos de controle para *S. frugiperda*, pode-se citar o químico, o biológico e a utilização de plantas geneticamente modificadas como as principais medidas utilizadas pelos produtores para evitar os prejuízos causados por essa espécie de inseto-praga. O manejo de *S. frugiperda* tem sido realizado usualmente por meio de método químico. Porém, o uso contínuo desse produto, pode ocasionar uma série de problemas, tais como o surgimento de populações de insetos resistentes e contaminação ambiental (JAN, 2015; SALEM et al., 2016).

Entre os principais inimigos naturais de *S. frugiperda*, destacam-se os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e os entomopatógenos, tais como a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bacillaceae) e o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) (CAMARA, 2010; VALICENTE et al., 2013; LEMES, 2015). Considerando o vírus SfMNPV, pesquisas comprovam a eficiência para o manejo de *S. frugiperda*, aumentando o interesse das indústrias de produtos fitossanitários na formulação e produção de bioinseticidas com esse entomopatógeno (BARRERA et al., 2011).

Considerando outras alternativas no manejo de *S. frugiperda*, pesquisas comprovam a eficiência da utilização dos compostos químicos extraídos das plantas, merecendo destaque os óleos essenciais, encontrados em diversas famílias arbóreas que apresentam atividade inseticida, destacando-se: Meliaceae, Poaceae, Myrtaceae, Fabaceae, Rutaceae, Annonaceae e Piperaceae (CRUZ et al., 2017).



Alguns métodos de controle quando aplicados em um sistema de produção podem ser potencializados quando associados a um ou mais métodos. Dessa forma, a associação de vírus entomopatogênico com óleos essenciais é um exemplo desse tipo de associação e apresenta potencialidade comprovada, isso devido aos efeitos sinérgicos, tais como à diminuição do tempo letal ou os efeitos prejudiciais ao desenvolvimento dos insetos praga (NATHAN, KALAIVANI, CHUNG, 2005; SOKAME et al., 2015).

Baseado no contexto e também no crescente interesse no desenvolvimento de métodos alternativos ao controle químico de pragas, objetivou-se avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de copaíba (*Copaifera officinalis* Linné.), citronela (*Cymbopogon nardus* L. Rendle), cravo (*Eugenia caryophyllata* Thunb), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden e Betche, Cheel), palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb. Wats.) e o óleo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), a *S. frugiperda*. Além disso, avaliou-se o efeito associativo de SfMNPV com os óleos essenciais com maior atividade tóxica a *S. frugiperda*, visando implementar os programas de manejo integrado nas diferentes culturas que essa espécie de inseto praga cause prejuízos.

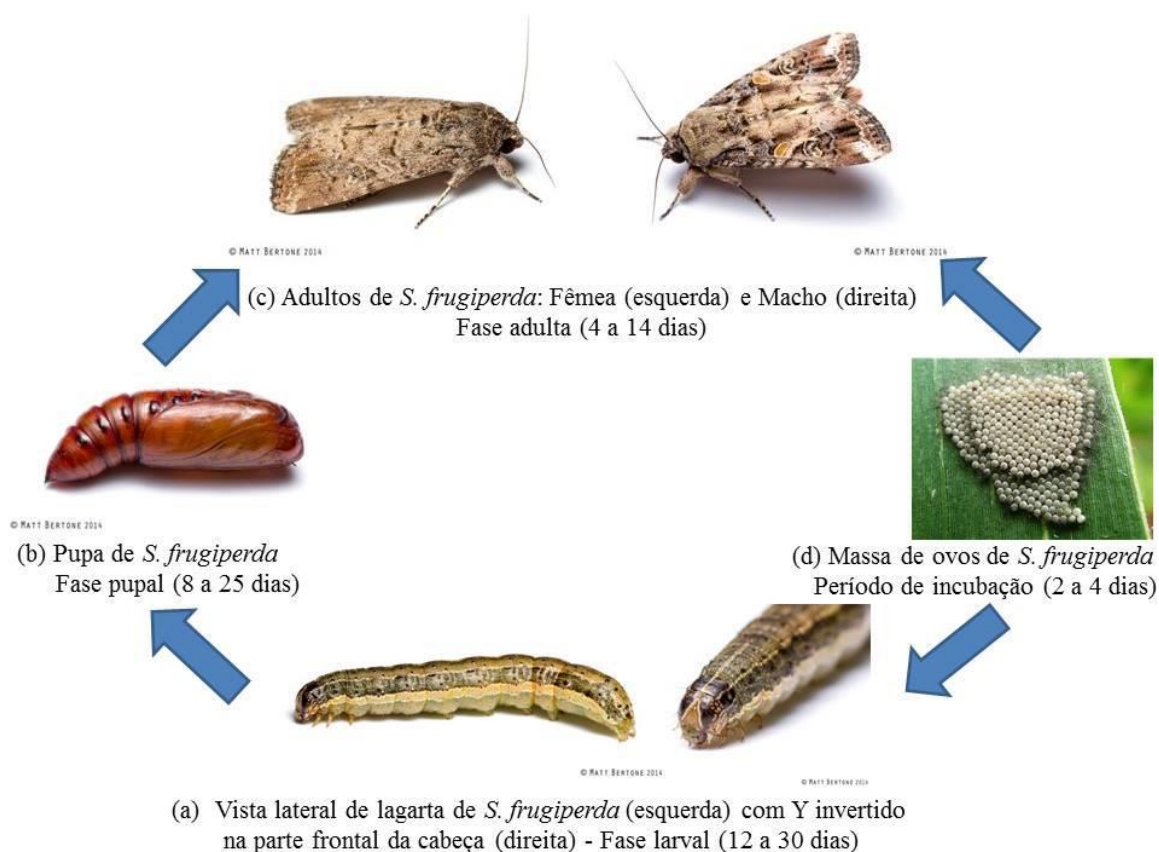
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *S. frugiperda*

Conhecida vulgarmente como lagarta-do-cartucho ou lagarta militar é a principal praga do milho no Brasil. Porém é uma espécie polífaga, que ataca diversas culturas de importância econômica, dentre as quais, algodoeiro, soja, amendoim, arroz, aveia, batata, cana-de-açúcar, trigo e algumas hortaliças como o tomate (BARROS et al., 2010).

Em função da sua alimentação diversificada e conseqüentemente pela grande disponibilidade de alimento e condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, a sua distribuição ocorre praticamente em todas as regiões do território nacional (SARMENTO et al., 2002).

O desenvolvimento de *S. frugiperda*, é do tipo holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos têm a coloração verde claro, são colocados em massas, tanto na fase inferior e superior das folhas, onde eclodem as larvas, que irão passar por seis estágios, até chegar ao completo desenvolvimento. Nessa fase, a lagarta apresenta uma coloração que varia de pardo escuro, verde até quase preta. A cabeça possui suturas que se cruzam formando um “y” invertido, bem característico da espécie e quando bem desenvolvidas as lagartas chegam a possuir cerca de 50 mm de comprimento. A fase larval tem duração em média de 12 a 30 dias, conforme as condições de temperatura e alimentação. Ao término do período larval as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupa, de coloração avermelhada. Após a emergência, surge a mariposa adulta, com asa anterior de coloração cinza e os machos diferenciam-se das fêmeas, pois possuem manchas mais claras (ROSA et al., 2012).



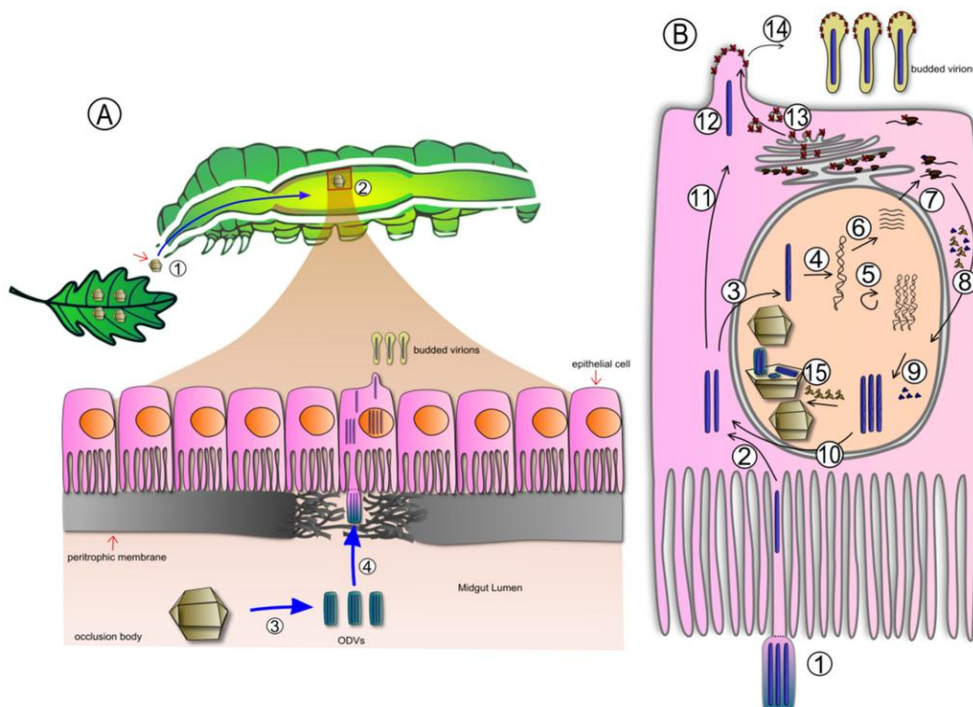
**Figura 1.** Ciclo biológico de *S. frugiperda*. (Fonte: BERTONE, 2014).

## 2.2 CONTROLE MICROBIANO: SfMNPV

Dentre as táticas de manejo, o controle microbiano é uma opção que consiste na utilização de entomopatógenos, tais como bactérias, nematoides, fungos e vírus (LACEY et al., 2015). Com relação aos vírus entomopatogênicos, pesquisas comprovam a eficiência do vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV), conhecido como Baculovírus *spodoptera*, devido a sua especificidade e virulência a *S. frugiperda* (LAPOINTE et al., 2012). Para o manejo de *S. frugiperda*, baseado no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Mapa (AGROFIT), no ano de 2016 foi registrado o primeiro produto comercial formulado a base de SfMNPV, disponibilizando para os agricultores uma nova alternativa para evitar os prejuízos ocasionados por essa espécie de inseto-praga (AGROFIT, 2018).

Por sua vez, os Baculovírus pertencem à família Baculoviridae e com base na especificidade do hospedeiro e em evidências filogenéticas, divide-se em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus*. Sendo que o gênero *Alphabaculovirus*, inclui todos os *nucleopolyhedrovirus* (NPVs) de lepidópteros formadores dos fenótipos virais (*Budded virus* (BV) e *Occlusion-derived virus* (ODV). Ambas atuam no processo de infecção do inseto, sendo ODV no início da infecção do hospedeiro e BV de célula a célula do órgão infectado (JEHLE et al., 2006).

O processo infeccioso inicia-se com a ingestão do alimento contaminado com os poliedros virais (1); em seguida, mediante a dissolução da forma oclusa do vírus no intestino médio que apresenta pH alcalino, as partículas virais são liberadas (2); iniciando a infecção nas células epiteliais do intestino médio (3). Portanto, as partículas virais penetram nas células epiteliais do intestino médio via fusão de membrana, mediada por receptores específicos (4,5). Em seguida, os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo das células do hospedeiro, liberando o DNA (6,7,8) e iniciando a replicação do vírus e conseqüentemente produção de BV, responsável pela infecção de outros tecidos (9,10,11,12,13). Nos estágios finais os vírus são liberados pela ruptura das células (15), causando a morte do inseto, podendo infectar novos hospedeiros (Figura 2) (HAASE, ROMANOWSKI, SCIOCCO-CAP, 2015).



**Figura 2.** Processo infeccioso de vírus entomopatogênico. (A) Vista transversal da lagarta ingerindo o vírus e (B) Replicação do vírus nas células do intestino médio. (Fonte: HAASE, ROMANOWSKI, SCIOCCO-CAP, 2015).

Espécies infectadas por SfMNPV apresentam, desde a ingestão do vírus até a sua morte, o seguinte comportamento: primeiro, a infecção debilita o inseto, comprometendo sua capacidade motora e de alimentação. Posteriormente, as lagartas infectadas se deslocam para as partes superiores da planta hospedeira e, após determinado tempo, morrem. De 48 a 72 horas após a infecção, o inseto apresenta corpo com aspecto opaco, branco-leitoso, e dependendo da espécie hospedeira e do vírus, ocorre o rompimento do corpo liberando grande quantidade de vírus no ambiente e a morte da lagarta ocorre entre 6 a 8 dias após a infecção (VALICENTE; CRUZ, 1991; PAIVA et al., 2016).

Uma característica que favorece a utilização do SfMNPV, está relacionada à especificidade pelo hospedeiro natural, pois diminui o risco de afetar inimigos naturais (RODRIGUEZ; BELAICH; GHIRINGHELLI, 2012). Como comprovado em estudos de interação, a exemplo do estudo que avaliou a seletividade deste entomopatógeno para os inimigos naturais *Chelonus insularis* Cresson, 1865 (Hymenoptera: Braconidae), *Eiphosoma laphygmae* Costa Lima, 1953 (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Doru luteipes* Scudder, 1876 (Dermaptera:

Forficulidae), os quais não foram afetados pela utilização de SfMNPV (FIGUEIREDO et al., 2009).

### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS NO MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS

Existem diferentes modos de ação de óleos essenciais sobre os insetos, como: toxicidade por ingestão ou contato por meio da cutícula, deterrência, alterações do sistema hormonal, deformações morfológicas, esterilização dos adultos e comportamento sexual, podendo os óleos atuarem em diferentes fases de desenvolvimento dos insetos (AKHTAR et al., 2012).

O óleo essencial de palmarosa (*C. martinii*) e o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) da família Poaceae, têm sido estudados em relação à atividade repelente e inseticida de insetos (KUMAR et al., 2007; LAINAS; CROCOMO, 2002). O óleo essencial de palmarosa apresenta alta atividade inseticida por contato para *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae) com um valor de  $DL_{50}$  de 22,8 mg/cm<sup>2</sup> (JESSER et al., 2017). Em outro trabalho, o óleo de citronela provocou alterações no intestino médio, diminuição dos níveis de proteína, lipídeos e açúcares totais, e aumento dos níveis de glicogênio, causando danos na histofisiologia reprodutiva das lagartas de *S. frugiperda* (SILVA et al., 2018).

O óleo essencial de cravo, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry, da família Myrtaceae, demonstrou atividade inseticida para lagartas de 3º instar de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) na concentração de 5,0% com 80,0% de mortalidade e 100% de mortalidade na concentração de 10,0% (SOARES et al., 2011). O óleo essencial de melaleuca (*M. alternifolia*) outra espécie da família das Myrtaceae, apresentou atividade tóxica sobre larvas de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) com concentração letal  $CL_{50}$  de 267,13 ppm (CONTI et al., 2014).

Além destes, outros óleos essenciais da família Rutaceae, como tangerina cravo (*Citrus reticulata* Branco), laranja mimoso (*Citrus sinensis* L. Osbeck), lima-da-pérsia

(*Citrus aurantium* L.) e tangerina murcot (*Citrus sinensis* Osbeck x *reticuata* Branco) apresentaram excelentes resultados no controle de *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae), com índices de mortalidade superiores a 95%.

### 2.3.1 Manejo de *S. frugiperda* com extratos e óleos vegetais

Dentre os óleos vegetais para o manejo de *S. frugiperda*, foi comprovado a atividade inseticida da espécie *Copaifera langsdorfii* Desf. da família Fabaceae, na fase larval de *S. frugiperda* no 2º instar, com extratos das folhas e polpas dos frutos, causando aumento da mortalidade e diminuição do peso das lagartas (ALVES et al., 2012). Enquanto que o extrato aquoso de *Piper tuberculatum* Jacq. da família Piperaceae, exibiu atividade inseticida no 1º instar de *S. frugiperda* reduzindo sua alimentação e prolongando a fase larval dos insetos (CASTRO et al., 2008).

Outra espécie vegetal que apresenta potencialidade para o controle de insetos praga é óleo de neem (*A. indica*), pertencente à família Meliaceae, que tem como principal composto químico a azadiractina, encontrado em concentrações mais altas na semente, além da casca e das folhas de onde provém o óleo. Estudos com o óleo de neem demonstrou atividade inseticida para *S. frugiperda*, com altos índices de mortalidade, seja na fase larval ou na fase de pupa, matando 83,33% e 100% respectivamente (CAMPOS; JUNIOR, 2012).

A família Meliaceae possui outras espécies que apresentam atividade inseticida para o controle de *S. frugiperda*. Baseado nesse contexto, algumas espécies do gênero *Trichilia* estão sendo estudadas, dentre as quais: *Trichilia casaretti* C. DC.; *Trichilia catigua* A. Juss; *Trichilia clauseni* C. DC.; *Trichilia elegans* A. Juss; *Trichilia pallens* C. DC. e; *Trichilia pallida* Swartz que foram avaliadas em comparação com o extrato aquoso de sementes de *A. indica* sob lagartas de 1º instar de *S. frugiperda*, destacando-se o extrato aquoso de *T. pallens* que ocasionou 98,7% de mortalidade larval, mas não diferiu do extrato de *A. indica* (BOGORNI; VENDRAMIM, 2003).

Além destes óleos, as espécies da família Myrtaceae apresentam atividade inseticida, como é o caso das pertencentes ao gênero *Eucalyptus*. Haas et al. (2014) verificaram a ação inseticida do extrato aquoso de folhas de eucalipto, como

alternativa para o manejo de *S. frugiperda*. Neste trabalho os autores comprovaram que o extrato de *Eucalyptus robusta* Smith, afetou o desenvolvimento de *S. frugiperda* durante a fase larval e apresenta atividade inseticida sob 2º ínstar com a taxa de mortalidade acima de 75%.

#### 2.4 ASSOCIAÇÃO DE VÍRUS ENTOMOPATOGÊNICO E ÓLEOS ESSENCIAS

A associação com vírus entomopatogênico e óleos essenciais é de considerável interesse no manejo integrado de pragas, devido aos efeitos sinérgicos gerados pela associação que podem funcionar com aditivos, proporcionando a utilização de menores quantidades dos produtos e aumento da mortalidade (NATHAN, KALAIVANI, CHUNG, 2005; ALMEIDA et al., 2017). Contudo, apesar da comprovação dos benefícios da associação entre entomopatógenos e óleos essenciais de plantas, estudos devem ser realizados para avaliar a compatibilidade entre os mesmos, isso para que não haja interferência no modo de ação de um sobre o outro (PESSOA et al., 2014).

Baseado nesse contexto, estudos comprovam o efeito da associação dos vírus entomopatogênicos com óleos vegetais, a exemplo da combinação do extrato de *A. indica* com o vírus *Spodoptera litura multiple nucleopolyhedrovirus* (SplMNPV) que afetou o desenvolvimento larval da espécie *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) (NATHAN; KALAIVANI, 2005). Resultados similares em relação ao desenvolvimento larval e efeito letal, também foram observados com a associação do *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV) e o composto majoritário do extrato de neem, a azadiractina, em larvas do 3 a 6º ínstar de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (KUMAN et al., 2008).

Em outro estudo associativo com óleo de neem e SplMNPV verificou-se o efeito sinérgico, assim a associação de óleo de neem e SplMNPV possibilitou um aumento na mortalidade larval de *S. litura* quando comparado com o uso isolado dos respectivos tratamentos, comprovando assim os benefícios da associação de compostos vegetais e vírus entomopatogênicos (NATHAN; KALAIVANI, 2006).

Dessa forma, os óleos ou extratos vegetais podem aumentar a eficiência do vírus quando associados, como também observado por Sokame et al. (2015), quando avaliaram a associação do óleo de neem e o *Maruca vitrata multiple nucleopolyhedrovirus* (MaviNPV) visando ao manejo da espécie *Maruca vitrata* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). Outro estudo realizado por Kumar e Muragan (1998) comprova esse efeito sinérgico do HearNPV associado com óleo de neem resultando no aumento da mortalidade, bem como na redução da oviposição e longevidade dos adultos de *H. armigera*. Dessa forma, a associação de vírus entomopatogênicos e óleos vegetais conferem uma vantagem no manejo integrado de pragas, especialmente de uma praga que é polífaga como *S. frugiperda*.

### 3 REFERÊNCIAS

AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Mapa. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons.html](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.html)>. Acesso em: 10 maio de 2018.

AKHTAR, Y. L.; PAGES, E.; ESYEVENS, A.; BRADBURY, R.; CAMARA, C. A. G.; ISMAN, M. B. Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. **Physiological Entomology**, Hoboken, v. 37, n. 1, p. 81-91, 2012.

ALMEIDA, W. R. SILVA, I. H. L.; SANTOS, A. C. V.; BARROS JÚNIOR, A. P.; SOUSA, A. H. Potentiation of Copaiba oil-resin with synthetic insecticides to control of fall armyworm. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.30, n.4, p. 1059-1066, 2017.

ALVES, D. S; CARVALHO, G. A; OLIVEIRA, D. F; SÂMIA, R. R; VILLAS-BOAS, M. A; CARVALHO, G. A; CÔRREA, A. D. Toxicity of copaíba extracts to armyworm *Spodoptera frugiperda*. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 11, n. 24, p. 6578-6591, 2012.

BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control**, v. 58, n.2, p. 113-120, 2011.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.137, n.3, p. 237-245, 2010.



BERTONE, M. Attack of the Armyworms. Raleigh: North Carolina State University, **Plant Disease and Insect Clinic**, 2014. Disponível em: <<http://ncsupdicblog.blogspot.com/2014/08/attack-of-armyworms.html>>. Acesso em: 10 de agosto de 2018.

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

BORN, F. S. **Atividade de óleos essenciais de plantas das famílias Burseraceae, Lamiaceae, Rutaceae e Verbenaceae em *Tetranychus urticae* Koch e *Neoseiulus californicus* (McGregor)**. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola)- Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, p.101, 2012.

CAMERA, C. Primeiro relato de *Trichogramma rojasi* parasitando ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40 n. 8, p.1828-1830, 2010.

CAMPOS, A. P.; JUNIOR, A. L. B. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.2, p. 137-144, 2012.

CASTRO, J. P. C.; SILVA, H. S. S.; PÁDUA, L. E. M. Atividade de extrato de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n.3, p.437-442, 2008.

CONTI, B.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; CECCARINI, L.; MACCHIA, M.; BENELLI, G.; Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target aquatic organisms? **Parasitology Research**, v.113, n.1, p.251-259, 2014.

CRUZ, G. S.; TEIXEIRA, V. W.; OLIVEIRA, J. V.; ASSUNÇÃO, C. G. D.; CUNHA, F. M.; TEIXEIRA, A. A. C.; CAROLINA A. GUEDES, C. A.; DUTRA, K. A.; BARBOSA, D. R. S.; BREDA, M. O. Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemico Biological Interactions**, v.263, p.74-80, 2017.

FIGUEIREDO, M. L. C.; CRUZ, I.; PENTEADO-DIAS, A. M.; SILVA, R. B. Interaction between Baculovirus *spodoptera* and natural enemies on the suppression of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8, p.207-222, 2009.

HAAS, J.; GARCIA, B. C.; ALVES, L. F. A.; HAIDA, K. S. Efeito de extratos aquosos vegetais sobre a lagarta-do-cartucho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p. 79-82, 2014.

HAASE, S.; ROMANOWSKI, V.; SCIOCCO-CAP, A. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. **Viruses**, v. 7, p.2230-2267, 2015.

- JAN, M. T.; ABBAS, N.; SHAD, S. A.; SALEEM, M. A. Resistance to organophosphate, pyrethroid and biorational insecticides in populations of spotted bollworm, *Earias vittella* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), in Pakistan. **Crop Protection**, v.78, p.247-252, 2015.
- JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THEIM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v.151, p.1257-1266, 2006.
- JESSER, E. N.; WERDIN-GONZÁLEZ, J. O.; MURRAY, A. P.; FERRERO, A. A. Efficacy of essential oils to control the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.20, p.1122-1129, 2017.
- KUMAR, N. S.; MURUGAN, K., ZHANG, W. Additive interaction of *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* and azadirachtin. **Biological Control**, v.53, p.869-880, 2008.
- KUMAR, N.; MURUGAN, K. Potential enhancement of nuclear polyhedrosis virus by azadirachtin and its effects on the food utilization, development and mortality of *Helicoverpa armigera* Hubner. **Tropical Agricultural Research**, v.10 p.324-333, 1998.
- KUMAR, R. SRIVASTAVA, M.; DUBEY, N. K. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.172-8, 2007.
- LABINAS, A. M. ; CROCOMO, W. B. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1401-1405, 2002.
- LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v.132, p.1-41, 2015.
- LAPOINTE, R. THUMBI, D., LUCAROTTI, C. J. Recent advances in our knowledge of baculovirus molecular biology and its relevance for the registration of baculovirus-based products for insect pest population control. In: Larramendy, M. L. e Soloneski, S. (Eds.). **Integrated pest management and pest control -Current and future tactics**, v.1, cap. 21, p. 495-536, 2012.
- LEMES, A. R. N.; SUZANA C. MARUCCI.; JULIANA R. V. COSTA.; ELIANE C. C. ALVES.; ODAIR A. FERNANDES.; MANOEL VICTOR F. LEMOS.; JANETE A. DESIDA. Selection of strains from *Bacillus thuringiensis* genes containing effective in the control of *Spodoptera frugiperda*. **Bt Research**, v.6, n.1, p. 1-8, 2015.
- MAKHAIK, M.; NAIK, S. N.; TEWARY, D. K. Evaluation of anti-mosquito properties of essential oils. Evaluation of anti-mosquito properties of essential oils. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.64, n.2, p.129-33, 2005.

NATHAN, S. S., KALAIIVANI, K. Efficacy of nucleopolyhedrovirus and azadirachtin on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**. v. 34, p.93-98, 2005.

NATHAN, S. S., KALAIIVANI, K., CHUNG, P.G. The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry Physiology**. 83, 46-57, 2005.

NATHAN, S. S.; KALAIIVANI, K. Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biological Control**, v.39, p.96-104, 2006.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; FARIAS, J. R. **Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas Bt**. ESALQ/USP, Piracicaba- SP, 2013. Disponível em: <[http://file:///C:/Users/Windows/Downloads/\\_Folder-IRAC-Spodoptera-2013.pdf.html](http://file:///C:/Users/Windows/Downloads/_Folder-IRAC-Spodoptera-2013.pdf.html)>. Acesso em 10 de abril de 2018.

PAIVA, C. E. C; VALICENTE, F. H.; SANTOS JUNIOR, H. J. C. **Controle Microbiano de Insetos-praga: Vírus entomopatogênico**, 2016. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/publication/301296944\\_controle\\_microbiano\\_de\\_insetos-praga\\_virus\\_entomopatogenico.html](https://www.researchgate.net/publication/301296944_controle_microbiano_de_insetos-praga_virus_entomopatogenico.html)>. Acesso em: 12 maio de 2018.

PESSOA, A. S.; LOZANO, E. R.; VILANI, A.; POTRICH, M.; MATOS, L. L.; OLIVEIRA, T. M.; PESSOA, G. M. *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) sob ação de extratos vegetais. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.81, n.4, p.329-334, 2014.

RODRIGUEZ, V. A.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. Baculoviruses: Members of Integrated Pest Management Strategies. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Eds). **Integrated pest management and pest control: Current and future tactics**. Rijeka: In Tech, p.463-480, 2012.

ROSA, A. P. A.; TRECHA, C. O.; ALVES, A.C.; GARCIA, L.; GONÇALVES, V.P. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em linhagens de milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.1, p. 39-45, 2012.

SALEEM, M.; HUSSAIN, D.; GHOUSE, G.; ABBAS, M.; FISHER, S. W. Monitoring of insecticide resistance in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. **Crop Protection**, Toowoomba, v. 79, n. 1, p. 177-184, 2016.

SARMENTO, R. A.; AGUIAR, R. W. S.; AGUIR, R. A. S. S.; VIEIRA, S. M. J.; OLIVEIRA, H. G.; HOLTZ, A. M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p.41-48, 2002.

SILVA, C. T. S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, J. V.; DUTRA K. A, NAVARRO, D. F.; TEIXEIRA, A. Effects of citronella oil (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) midgut and fat body, **Biotechnic Histochemistry**, v. 93, n.1, p.36-48, 2018.

SOARES, C. S. A.; SILVA, M.; COSTA, M. B.; BEZERRA, C. E. S. Ação inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyriniteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae). **Revista Verde**, Mossoró, v.6, n.2, p. 154-157, 2011.

SOKAME, B. M.; TOUNOU, A. K.; DATINON, B.; DANNON, E. A.; AGBOTON, C.; SRINIVASAN, R.; PITTENDRIGH, B. R.; TAM, M. Combined activity of *Maruca vitrata multi-nucleopolyhedrovirus*, MaviMNPV, and oil from neem, *Azadirachta indica* Juss and *Jatropha curcas* L., for the control of cowpea pests. **Crop Protection**, v.72, p.150-157, 2015.

VALICENTE, F. H, TUELHER, E. S.; PENA, R. C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M. R. F. Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with Baculovirus *spodoptera*. **Neotropical Entomology**,v.42, p.191-199, 2013.

VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, (Circular Técnica, 15), p. 23, 1991.

## **CAPÍTULO 2 - TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS A *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

### **RESUMO**

Óleos essenciais são compostos orgânicos pertencentes à classe dos metabólitos secundários que vêm se destacando no controle de diferentes espécies de inseto-praga. No presente trabalho, objetivou-se avaliar a toxicidade dos óleos de Copaíba (*C. officinalis*), Citronela (*C. nardus*), Cravo (*E. caryophyllata*), Eucalipto (*E. globulus*), Melaleuca (*M. alternifolia*), Palmarosa (*C. Martini*) e Neem (*A. indica*) a *S. frugiperda*. Para isso, avaliou-se o efeito ovicida através do método de imersão e o efeito inseticida às lagartas do 1º, 2º e 3º ínstar mediante a pulverização das respectivas soluções dos óleos vegetais. Os resultados comprovam a atividade ovicida de todos os óleos, com índices de mortalidade acima de 47%, destacando-se os óleos de citronela, cravo, melaleuca e palmarosa que foram os mais eficientes. Com relação à atividade inseticida as lagartas de *S. frugiperda* no 1º e 2º ínstar, os óleos de copaíba e neem foram os mais eficientes. Assim, com base nos resultados de mortalidade e na estimativa da concentração letal, o óleo de neem foi o mais tóxico a *S. frugiperda*, comprovando a sua importância para o manejo dessa espécie de inseto praga.

**Palavras- chave:** MIP. Neem. Lagarta-do-cartucho.

## CHAPTER 2 - TOXICITY OF ESSENTIAL OILS *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

### ABSTRACT

Essential oils are organic compounds belonging to the class of secondary metabolites that have been prominent in the control of different species of insect pests. The objective of this study was to evaluate the toxicity of Copaíba (*C. officinalis*), Citronela (*C. nardus*), Cravo (*E. caryophyllata*), Eucalipto (*E. globulus*), Melaleuca (*M. alternifolia*), Palmarosa (*C. Martini*) and Neem (*A. indica*) to *S. frugiperda*. For this, the ovicidal effect was evaluated through the immersion method and the insecticidal effect to the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instar caterpillars by spraying the respective solutions of the vegetable oils. The results confirm the ovicidal activity of all oils, with mortality rates above 47%, especially citronela, cravo, melaleuca and palmarosa oils that were the most efficient. Regarding the insecticidal activity of *S. frugiperda* caterpillars in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> instar, the copaíba and neem oils were the most efficient. Thus, based on the results of mortality and the estimation of lethal concentration, neem oil was the most toxic to *S. frugiperda*, proving its importance for the management of this species of insect plague.

**Keywords:** MIP. Neem. Fall armyworm.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma enorme variedade de metabólitos secundários que são utilizados nas mais diversas interações existentes com outros seres vivos, como por exemplo, inibindo a fitofagia de insetos praga ou o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (LÓPEZ et al., 2013).

Nesse sentido, a busca por substâncias ou compostos de origem vegetal, sejam óleos ou extratos, que possam ser utilizados para evitar os prejuízos decorrentes da alimentação de insetos praga é uma medida viável e com eficácia comprovada para implementação em programas de manejo integrado de pragas (COLPO et al., 2014; BRAHMI et al., 2016).

Óleos essenciais são compostos voláteis que são produzidos no metabolismo secundário das plantas, variando com a intensidade e composição de acordo a espécie, época de coleta e condições edafoclimáticas (SIMÕES; SPITZER, 2003; YAZDANI et al., 2014).

A espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto responsável por ocasionar sérios prejuízos em diversas culturas de grande importância econômica. O manejo desta praga tem sido realizado geralmente pelo método químico. Contudo, o uso inadequado desse método tem favorecido a seleção de populações resistentes aos inseticidas químicos sintéticos, além de causar efeitos negativos à saúde das pessoas e ao ambiente (SALEEM et al., 2016).

Desta maneira, objetivou-se avaliar o efeito ovicida e a toxicidade dos óleos essenciais de Copaíba (*Copaifera officinalis* Linné.), Citronela (*Cymbopogon nardus* L. Rendle), Cravo (*Eugenia caryophyllata* Thunb), Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), Melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden e Betche, Cheel), Palmarosa (*Cymbopogon martini* Roxb. Wats.) e do óleo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) as lagartas de *S. frugiperda*, visando à utilização no manejo dessa praga.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES).

### 2.1 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE *S. frugiperda*

Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda*, provenientes da criação massal mantida no Laboratório de Entomologia do NUDEMAFI. A multiplicação e manutenção foram realizadas em sala climatizada com as seguintes condições: temperatura:  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa: 60% e fotofase: 12 horas. Adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de mel em 10%. Como substratos para a oviposição foram utilizadas folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas, as quais foram mantidas em potes plásticos transparentes até a eclosão das larvas. Em seguida, as larvas foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes de acrílico (50 mL) contendo dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja (NALIM, 1991). Posteriormente, as larvas foram individualizadas com aproximadamente 10 dias de vida em recipientes de acrílico (Gerbox<sup>®</sup> - 3 cm de diâmetro) até a fase pupal e o alimento (dieta artificial) foi fornecido *ad libitum*. Após a emergência dos adultos, os mesmos foram transferidos para as gaiolas de criação, dando continuidade ao ciclo.

### 2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Foram utilizados os óleos essenciais de Copaíba (*C. officinalis*), Citronela (*C. nardus*), Cravo (*E. caryophyllata*), Eucalipto (*E. globulus*), Melaleuca (*M. alternifolia*) e Palmarosa (*C. Martini*) adquiridos na empresa Solua Coml Ltda – Phytoterápica e



também um óleo vegetal a base de Neem (Neenmax<sup>®</sup>), que foi adquirido em uma loja de produtos agropecuários.

### 2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises da composição química dos óleos essenciais foram feitas no Laboratório de Investigação Química de Inseticidas Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria em massa (CG-EM), modelo QP-PLUS-2010 da Shimadzu<sup>®</sup>. A coluna cromatográfica utilizada foi a do tipo capilar de sílica fundida Rtx-5MS não polar, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás de arraste. As temperaturas utilizadas foram de 260 °C para o injetor e detector. A temperatura inicial da coluna foi de 60 a 240 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada minuto. O volume de injeção foi de 0,5 mL de solução diluída (1/100) dos óleos em n-hexano. A identificação dos componentes foi baseada nos índices de retenção de CG-EM, com referência a uma série homóloga de n-alcenos C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> calculada usando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL E KRATZ, 1963).

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros de massas existentes no banco de dados do equipamento (Wiley7) e também pela comparação dos valores dos Índices de Kovats, calculados com os valores tabelados e pelos dados da literatura (ADAMS, 2007).

### 2.4 ATIVIDADE INSETICIDA DE ÓLEOS VEGETAIS A *S. frugiperda*

Para verificação da atividade inseticida dos óleos vegetais, foram utilizados ovos de 12 horas de idade e lagartas de 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> ínstar de *S. frugiperda*, com

respectivamente 2, 4 e 6 dias de vida. Inicialmente, foram realizados testes com a concentração de 2%, visando avaliar a viabilidade da respectiva utilização de cada óleo, isso se baseando na concentração letal.

Para a realização dos bioensaios, todos os óleos foram diluídos usando acetona (2% v/v), Tween<sup>®</sup> 80 (0,05% v/v) e água destilada, para o controle utilizou-se acetona (2% v/v), Tween<sup>®</sup> 80 (0,05% v/v) e água destilada, seguindo a metodologia proposta por Ataíde (2017), que avaliou a toxicidade de óleos essenciais a ovos e larvas de *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae).

Os ensaios foram conduzidos em câmara climática, ajustada nas seguintes condições: Temperatura:  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas).

#### **2.4.1 Efeito ovicida de óleos vegetais sobre os ovos de *S. frugiperda***

Para realização desse ensaio, foram separados lotes com ovos de *S. frugiperda* com 12h de idade, sendo cada lote composto por 30 ovos. Posteriormente, para avaliar o efeito ovicida, os ovos foram imersos nas respectivas soluções dos óleos vegetais por um período de 30 segundos e em seguida acondicionados em recipientes de acrílico (Gerbox<sup>®</sup> - 3 cm de diâmetro). O ensaio foi composto por oito tratamentos, óleos vegetais e controle, respectivamente, sendo que para cada tratamento foram utilizados 300 (trezentos) ovos, perfazendo assim 10 repetições/tratamento. As avaliações foram realizadas diariamente durante 72h, determinando-se o número de ovos eclodidos e não eclodidos.

#### **2.4.2 Efeito inseticida de óleos vegetais às lagartas de *S. frugiperda***

Para execução dessa segunda etapa, realizou-se a pulverização de 1 mL da solução de cada óleo, sobre os três primeiros instares larvais de *S. frugiperda*. Dessa forma, com o auxílio de um micropulverizador, tipo aerógrafo, com pressão ajustada para 15 lb/pol<sup>2</sup>, uma alíquota de 1 mL da solução de cada tratamento foi pulverizada

sobre um lote de insetos no respectivo ínstar larval e, em seguida, para cada tratamento, cinco insetos foram agrupados e acondicionados em um recipiente de acrílico (3 cm de diâmetro) contendo um pedaço de dieta artificial (2 cm<sup>3</sup>) como fonte alimentar nas mesmas condições climáticas do ensaio anterior, com oito tratamentos com 10 repetições, perfazendo assim: 400 lagartas para cada ínstar larval. As avaliações foram realizadas diariamente durante 72h.

## 2.5 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL)

Para estimar a concentração letal foram utilizados o óleo essencial de copaíba e o óleo de neem, isso baseado na maior toxicidade destes óleos às lagartas de 1º ínstar de *S. frugiperda* (Tabela 3). Assim, para estimar a concentração letal foram utilizadas 9 concentrações espaçadas em escala logarítmica, a saber: 0,1; 0,145; 0,211; 0,307; 0,446; 0,649; 0,944; 1,372 e 2% (v/v). As soluções dos óleos foram diluídas usando acetona (2% v/v), Tween 80<sup>®</sup> (0,05% v/v) e água destilada (AD). Para o controle utilizou-se acetona (2% v/v), Tween<sup>®</sup> 80 (0,05% v/v) e AD. A metodologia experimental foi similar à adotada para avaliação do efeito inseticida às lagartas (Item 2.4.2), ou seja, o preparo das respectivas soluções e a técnica de pulverização, bem como as avaliações foram realizadas diariamente até 72 horas, com cinco repetições, com cinco insetos para cada concentração analisada, três vezes ao longo do tempo.

## 2.6 ANÁLISE DOS DADOS

O modelo experimental adotado foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC), os dados de mortalidade foram submetidos ao modelo linear generalizado com distribuição de Poisson (MLG-Poisson;  $p < 0,05$ ), com zeros inflados, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Os dados referentes à mortalidade da concentração letal do óleo de neem e óleo de copaíba foram submetidos à análise de Probit. O software utilizado em todas as análises foi o programa estatístico R.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os principais constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais estão apresentados na Tabela 1.

Por sua vez, a análise química do óleo de copaíba indicou a presença de 42,46% de  $\beta$ -cariofileno, aromadendreno (8,42%),  $\beta$ -duprezianeno (7,43%) e 2-epi- $\alpha$ -funebreno (6,29%) como principais constituintes químicos (Tabela 1). A composição química do óleo de copaíba extraído da espécie *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) foi analisada por Silva et al. (2017), que também encontraram como constituinte majoritário o  $\beta$ -cariofileno apresentando 75%.

Os principais compostos químicos encontrados no óleo essencial de citronela foram o geraniol (44,60%), citronelal (23,62%) e citronelol (15,31%) (Tabela 1). Este resultado é similar ao verificado por Scherer et al. (2009), que também identificaram os compostos majoritários  $\beta$ -citronelal (45%), geraniol (20,71%) e  $\beta$ -citronelol (14,49%).

Os constituintes químicos majoritários verificados na análise do óleo essencial de cravo foram o eugenol (83,68%),  $\beta$ -cariofileno (11,41%),  $\alpha$ -humuleno (3,22%) (Tabela 1). A composição química do óleo essencial de cravo foi analisada por Scherer et al. (2009), que encontraram os compostos majoritários, eugenol (83,75%),  $\beta$ -cariofileno (10,98%) e  $\alpha$ -humuleno (1,26%).

O óleo essencial de eucalipto apresentou na sua composição 1,8-cineol (84,39%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (5,60%),  $\alpha$ -pineno (5,15%) (Tabela 1). Algumas pesquisas destacam a mesma relação de compostos químicos encontrados em *Eucalyptus globulos* Labill. Estudos revelam como principais constituintes predominantes do óleo desta espécie o 1,8-cineol, com teor de 60-85% (VIEIRA, 2004). Em outro estudo similar, o principal composto majoritário, 1,8-cineol, foi encontrado em algumas espécies, *Eucalyptus microcorys* F. Muell (66,2%), *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake (65,4%) e *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (44,8%) (PEREIRA, 2010).

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais.

(Continua)

Componentes	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Óleos essenciais					
			Copaíba	Citronela	Cravo	Eucalipto	Melaleuca	Palmarosa
$\alpha$ -Pinenos	928	932	-	-	-	<b>5,15%</b>	-	-
$\beta$ -Pinenos	970	974	-	-	-	0,76%	-	-
$\alpha$ -Terpinenos	1011	1014	-	-	-	1,29%	-	-
Silvestrenos	1023	1025	-	-	-	1,31%	-	-
1,8-Cineol	1026	1026	-	-	-	<b>84,39%</b>	-	-
(E)- $\beta$ -Ocimeno	1042	1044	-	-	-	<b>5,60%</b>	-	-
Terpinoleno	1081	1086	-	-	-	0,02%	-	-
Citronelal	1143	1148	-	<b>23,62%</b>	-	-	-	-
Iso-pulegol	1150	1155	-	0,34%	-	-	-	-
(Z)-isocitral	1156	1160	-	0,35%	-	-	-	-
Neo- Mentol	1157	1161	-	-	-	0,15%	-	-
$\alpha$ -Terpineol	1183	1186	-	0,53%	-	-	-	-
Citronelol	1220	1223	-	<b>15,31%</b>	-	-	-	-
Neral	1231	1235	-	3,62%	-	-	-	-
Geraniol	1246	1249	-	<b>44,60%</b>	-	-	-	<b>80,87%</b>
Geranial	1260	1264	-	4,84%	-	-	-	-
Formato de Citronela	1270	1271	-	0,19%	-	-	-	-
8-hidroxi-neo-Mentol	1324	1328	-	0,29%	-	-	-	-
(E)-Patchenol	1328	1328	-	0,69%	-	-	-	-
Eugenol	1356	1351	-	-	<b>83,68%</b>	-	-	-
Acetato nerilo	1355	1359	-	1,67%	-	-	-	-
$\beta$ -Cariofileno	1415	1417	<b>42,46%</b>	1,12%	<b>11,41%</b>	-	1,02%	-
$\beta$ -Gurjuneno	1430	1431	-	0,48%	-	-	-	-
(Z)- $\beta$ -Farneseno	1438	1440	-	0,19%	-	-	-	-
$\alpha$ -humuleno	1452	1450	-	-	<b>3,22%</b>	-	-	-
Trans-Muurola-3,5-dien	1450	1451	-	0,24%	-	-	-	-
Germacreno D	1480	1483	-	0,56%	0,24%	-	-	-
Cis- $\beta$ -Guaieno	1488	1492	-	0,28%	-	-	-	-
Cubebol	1510	1514	-	0,30%	-	-	-	-
Cubebol	1514	1516	-	-	0,23%	-	-	-
Acetato eugenol	1521	1525	-	-	0,19%	-	-	-
Cis-Calameneno	1528	1528	-	-	0,13%	-	-	-
Germacreno B	1559	1555	-	-	0,43%	-	-	-
Iso-Silvestreno	1008	1007	0,23%	-	-	-	-	0,54%
p-Cymeno	1022	1020	0,40%	-	-	-	<b>6,90%</b>	3,73%
$\alpha$ -Pinenos	933	932	-	-	-	-	-	0,22%
1,8-Cineole	1030	1026	0,64%	-	-	-	-	-
Acetato de linalol	1257	1254	1,35%	-	-	-	-	-
2-epi- $\alpha$ -Funebreno	1382	1380	<b>6,29%</b>	-	-	-	-	-
7-epi-Sesquithujeno	1391	1390	1,99%	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Gurjuneno	1409	1409	0,52%	-	-	-	-	-
$\beta$ -Cedreno	1420	1419	2,00%	-	-	-	-	-
$\beta$ -Duprezianeno	1422	1421	<b>7,43%</b>	-	-	-	-	-
4,8-óxido $\beta$ -Cariofileno	1424	1423	0,45%	-	-	-	-	-
$\beta$ -Copaeno	1432	1430	1,12%	-	-	-	0,56%	-

**Tabela 1.** Composição química dos óleos essenciais.

(Continuação)

Componentes	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Óleos essenciais					
			Copaíba	Citronela	Cravo	Eucalipto	Melaleuca	Palmarosa
Epóxido II de humulenol	1608	1608	0,23%	-	-	-	-	-
Isobutanoato de neryl	1491	1490	<b>4,90%</b>	-	-	-	-	-
Cis- $\beta$ -guaieno	1493	1492	1,10%	-	-	-	-	-
Trans-muurola 4(14),5dieno	1493	1493	<b>4,17%</b>	-	-	-	-	-
$\beta$ -Bisaboleno	1505	1505	0,80%	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cadineno	1538	1537	0,46%	-	-	-	-	-
Davanone B	1566	1564	0,33%	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1583	1582	2,16%	-	-	-	-	-
Junenol	1619	1618	0,77%	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -Ocimeno	1048	1044	0,19%	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Fencheno	950	945	-	-	-	-	2,74%	-
Sabineno	971	969	-	-	-	-	0,67%	-
Mirceno	990	988	-	-	-	-	0,79%	0,11%
$\beta$ -Pinenos	976	974	-	-	-	-	0,77%	0,08%
$\alpha$ -Phellandreno	1002	1002	-	-	-	-	0,69%	-
$\alpha$ -Terpineno	1013	1014	-	-	-	-	<b>6,00%</b>	-
Silvestreno	1027	1025	-	-	-	-	<b>4,00%</b>	-
$\gamma$ -Terpineno	1059	1054	-	-	-	-	<b>15,57%</b>	-
Terpinoleno	1085	1086	-	-	-	-	<b>3,44%</b>	-
Terpinen-4-ol	1177	1174	-	-	-	-	<b>38,63%</b>	-
$\alpha$ -Terpineol	1188	1186	-	-	-	-	<b>3,64%</b>	-
Trans-Ascaridole glicol	1269	1266	-	-	-	-	0,29%	-
2-Etil-Isomentona	1294	1293	-	-	-	-	0,33%	-
Metil geranato	1324	1322	-	-	-	-	-	0,84%
$\alpha$ -Cubebeno	1348	1345	-	-	-	-	0,47%	-
Acetato de geranilo	1381	1379	-	-	-	-	-	<b>10,37</b>
$\beta$ -Panasinseno	1384	1381	-	-	-	-	0,70%	-
Iso-Longifoleno	1390	1389	-	-	-	-	2,38%	-
Sibireno	1400	1400	-	-	-	-	0,32%	-
$\beta$ -Longipineno	1402	1400	-	-	-	-	0,22%	<b>3,04%</b>
$\alpha$ -Cis-Bergamoteno	1411	1412	-	-	-	-	0,28%	-
$\beta$ -Gurjuneno	1433	1431	-	-	-	-	0,49%	-
Khusimeno	1455	1453	-	-	-	-	1,56%	-
Dehidroaromadendreno	1462	1460	-	-	-	-	0,24%	-
$\gamma$ -Muurolo	1479	1478	-	-	-	-	2,18%	-
Ar-Curcumeno	1480	1479	-	-	-	-	0,68%	-
Germacreno D	1485	1484	-	-	-	-	0,38%	-
Aromadendreno	1441	1439	<b>8,42%</b>	-	-	-	-	-
Cis-Muurola-3,5-dieno	1450	1448	2,85%	-	-	-	-	-
$\alpha$ -neo-Cloveno	1454	1452	1,26%	-	-	-	-	-
Propanoato de neryl	1454	1452	0,87%	-	-	-	-	-
Allo-Aromadendreno	1460	1458	0,78%	-	-	-	0,72%	-

**Tabela 1.** Composição química dos óleos essenciais.

(Conclusão)

Componentes	R <sup>a</sup>	R <sup>B</sup>	Óleos essenciais					
			Copaíba	Citronela	Cravo	Eucalipto	Melaleuca	Palmarosa
Cis-Cadina-1(6),4-dieno	1463	1461	0,41%	-	-	-	-	-
Isovalerato de Linalol	1468	1466	0,49%	-	-	-	-	-
Dauca-5,8-Dieno	1472	1471	2,13%	-	-	-	-	-
Total	-	-	97,20%	99,22%	99,53%	98,67%	96,66%	99,80%
Monoterpenos	-	-	2,81%	-	-	-	84,46%	86,39%
Sesquiterpenos	-	-	94,39%	-	-	-	12,2%	13,41%

IR<sup>a</sup> = Índice de Retenção Calculado. IR<sup>b</sup> = Índices de Retenção Linear da Literatura

Na análise do óleo de palmarosa observou-se que o mesmo é constituído majoritariamente pelos compostos geraniol (80,87%), acetato de geraniol (10,37%) e  $\beta$ -longipineno (3,04%) (Tabela 1). Este resultado corrobora com o verificado por Rao et al. (2005), que encontraram teores de 78-85% de geraniol e 3,0-12% de acetato de geraniol em diferentes amostras de óleo essencial de palmarosa.

O óleo de melaleuca apresentou na sua composição o terpinen-4-ol (38,63%),  $\gamma$ -terpineno (15,57%), p-cimeno (6,90%),  $\alpha$ -Terpineno (6,00%), Silvestreno (4,00%),  $\alpha$ -Terpineol (3,64%) e Terpinoleno (3,44%) (Tabela 1). Este resultado é similar ao encontrado por Oliveira et al. (2003), que também identificaram os compostos majoritários do óleo de melaleuca, terpinen-4-ol (40%),  $\gamma$ -terpineno (23%) e  $\alpha$ -terpineno (10%).

### 3.2 EFEITO OVICIDA DE ÓLEOS VEGETAIS SOBRE OS OVOS DE *S. frugiperda*

Com base nos resultados, os óleos de citronela, cravo, melaleuca e palmarosa foram significativamente semelhantes e apresentaram maior atividade ovicida aos ovos de *S. frugiperda* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Mortalidade média de ovos de *S. frugiperda* ( $\pm$  EP) submetidos a diferentes óleos vegetais (Temperatura:  $25 \pm 2$  °C; Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h).

Óleos vegetais	Mortalidade média <sup>1,2</sup>
Neem	47,33 $\pm$ 4,22d
Copaíba	93,33 $\pm$ 2,00b
Citronela	100,00 $\pm$ 0,00a
Cravo	98,33 $\pm$ 0,50a
Eucalipto	78,00 $\pm$ 2,53c
Melaleuca	100,00 $\pm$ 0,00a
Palmarosa	100,00 $\pm$ 0,00a
Controle	9,43 $\pm$ 2,56e
MLG- Poisson	26,234
GL	7
P- valor	0,0004573

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>Análise feita com base no número de ovos, segundo distribuição de Poisson.

A atividade ovicida dos óleos essenciais de citronela, palmarosa e melaleuca pode estar associada à presença dos constituintes majoritários, como o geraniol no óleo de citronela (44,60%), geraniol no óleo de palmarosa (80,87%) e melaleuca (38,63%) de Terpinen-4-ol. O efeito ovicida do óleo de citronela já foi observado em ovos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae), com índices de mortalidade entre 62 a 81% de mortalidade (COLPO et al., 2014). Em outro estudo, foi avaliado o extrato aquoso de *Melia azedarach* L. da família Meliaceae, que tem como principal composto majoritário a azadiractina, em ovos de *S. frugiperda*. Não foi verificado efeito tóxico do extrato aquoso nos ensaios de atividade ovicida. Porém, adultos provenientes de lagartas intoxicadas com extrato em 0,1%, apresentaram alterações em parâmetros reprodutivos tais como: número de ovos por fêmea, ovos por postura e viabilidade dos ovos (MORONESE; GALLEGOS, 2009). A mortalidade dos insetos na fase de ovo pode ser de grande importância no manejo dessa praga, pois evitaria os danos causados na cultura mediante a alimentação do inseto na fase larval (CAMPOS; BOIÇA JÚNIOR, 2012).

### 3.3 EFEITO INSETICIDA DE ÓLEOS VEGETAIS ÀS LAGARTAS DE *S. frugiperda*

Com base nos resultados (Tabela 3), o óleo de copaíba e o óleo de neem ocasionaram, respectivamente 94% e 82% de mortalidade no 1º ínstar larval. Corroborando com esses resultados, pesquisas comprovam o efeito inseticida do



óleo puro de plantas do gênero *Copaifera* às larvas de *S. frugiperda* (SANTOS et al., 2016).

Uma das razões na qual o óleo de copaíba ocasionou uma maior mortalidade de lagartas do primeiro ínstar pode ser atribuída aos componentes químicos majoritários, principalmente a produção de  $\beta$ -cariofileno, que é particularmente efetivo contra lepidópteros (LEANDRO et al., 2012).

O efeito inseticida do óleo de neem foi comprovado em todos os ínstar larvais, com o maior percentual de mortalidade no 1º ínstar (82%), ou seja, houve um decréscimo do efeito inseticida com o desenvolvimento larval do inseto (Tabela 3). Por sua vez, alguns estudos comprovam a ação inseticida do óleo de neem a *S. frugiperda* e estabelecem a relação fagodeterrente do composto majoritário, azadirachtina, que causa bloqueio na alimentação dos insetos (MORDUE; NISBET, 2000; CONCESCHI et al., 2011).

**Tabela 3.** Atividade inseticida de óleos vegetais a *S. frugiperda* (Temperatura:  $25 \pm 2$  °C; Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h).

Óleos vegetais	1º ínstar <sup>1,2</sup>	2º ínstar <sup>1,2</sup>	3º ínstar <sup>1,2</sup>
Neem	82,00 $\pm$ 0,23a	44,00 $\pm$ 0,29a	30,00 $\pm$ 0,40a
Copaíba	94,00 $\pm$ 0,21a	40,00 $\pm$ 0,47a	2,00 $\pm$ 0,10b
Citronela	8,00 $\pm$ 0,22c	2,00 $\pm$ 0,10c	2,00 $\pm$ 0,10b
Cravo	34,00 $\pm$ 0,33b	10,00 $\pm$ 0,22c	18,00 $\pm$ 0,23a
Eucalipto	4,00 $\pm$ 0,13c	0,00 $\pm$ 0,00c	0,00 $\pm$ 0,00b
Melaleuca	28,00 $\pm$ 0,40b	20,00 $\pm$ 0,26b	2,00 $\pm$ 0,10b
Palmarosa	40,00 $\pm$ 0,056b	26,00 $\pm$ 0,33b	0,00 $\pm$ 0,00b
Controle	6,00 $\pm$ 0,15c	2,00 $\pm$ 0,10c	0,00 $\pm$ 0,00b
MLG- Poisson	75,688	27,397	18,355
GL	7	7	7
P-valor	<0,0001	0,0002827	0,01047

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott em 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>Análise feita com base no número de indivíduos, segundo distribuição de Poisson.

Quanto a mortalidade de lagartas no 2º ínstar, o uso de óleos vegetais em *S. frugiperda*, indicou que a maior média obtida foi encontrada com o óleo de neem (44,00%), que por sua vez não diferiu de copaíba (40,00%) (Tabela 3).

Os resultados encontrados para o óleo de neem assemelham-se aos obtidos por Mcagnan et al. (2012) que, verificaram a mortalidade de 40% das lagartas do 2º

ínstar de *S. frugiperda*, comprovando o efeito inseticida do óleo de neem. Por outro lado, Sâmia et al. (2016), estudando a bioatividade de extratos aquosos originários de plantas do gênero *Copaifera*, observaram que teve um efeito negativo na biologia de *S. frugiperda*, quando fornecidos na dieta ou na pulverização nas larvas de 2º ínstar.

Considerando o efeito inseticida às larvas de *S. frugiperda* no 3º ínstar, verifica-se que apenas o óleo de neem e óleo de cravo ocasionaram índices de mortalidade que possam ser considerados no âmbito do manejo fitossanitário, com taxas de mortalidade de 30 e 18%, respectivamente (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2010), que comprovaram o efeito inseticida do neem sobre larvas de 3º ínstar de *S. frugiperda*, com taxas de mortalidade entre 7,5 a 27,5%. Viana e Prates (2005), estudando o extrato aquoso de folhas de neem, constataram que a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* até o terceiro ínstar foi significativa com índices de 90% de mortalidade. Por outro lado, o potencial inseticida do óleo essencial de cravo, também foi comprovado sobre lagartas de 3º ínstar de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) na concentração de 1% (v/v), obteve 20,00% de mortalidade (SOARES et al., 2011).

#### 3.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL)

A partir dos resultados obtidos na análise de mortalidade de ovos e lagartas de 1º, 2º e 3º ínstar (Tabelas 2 e 3), optou-se por investigar a concentração letal dos óleos de neem e copaíba, isso baseando-se no controle aplicado dessa espécie, ou seja, controlar antes que possa ocasionar danos ou injúrias às culturas de interesse agrícola, como, por exemplo o milho. Os resultados das curvas de concentração de mortalidade de *S. frugiperda* expostas aos óleos vegetais de neem e copaíba estão apresentados na (Tabela 4).

**Tabela 4.** Inclinação das curvas de concentração-resposta e concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>), três vezes no tempo, do óleo essencial de Copaíba (*Copaifera officinalis*) e óleo de Neem (*Azadirachta indica*), sobre lagartas de 1º instar de *S. frugiperda* (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h).

Óleos vegetais	N <sup>a</sup>	Inclinação ± EP <sup>b</sup>	CL <sub>50</sub> v/v (IC95%) <sup>c</sup>	CL <sub>95</sub> v/v (IC95%) <sup>c</sup>	χ <sup>2d</sup>	P-valor <sup>e</sup>	GL <sup>f</sup>
Copaíba	667	2,100 ± 0,212	0,567 (0,491-0,660)	3,445 (2,533-5,241)	14,17	0,951	7
Neem	659	1,785 ± 0,179	0,232 (0,188-0,276)	1,937 (1,408-3,052)	10,44	0,835	7

<sup>a</sup> Número de insetos usados no teste;

<sup>b</sup> Inclinação ± Erro padrão;

<sup>c</sup> Intervalo de confiança em 95% de probabilidade;

<sup>d</sup> Teste de qui-quadrado;

<sup>e</sup> Probabilidade de significância;

<sup>f</sup> Graus de liberdade.

Estas curvas foram utilizadas para identificar a toxicidade dos óleos para as lagartas de *S. frugiperda* no 1º instar. Observa-se pela Tabela 4, que as concentrações letais necessárias para matar 50% (CL<sub>50</sub>) e 95% (CL<sub>95</sub>) da populações de *S. frugiperda* utilizando-se o óleo de copaíba foram de 0,567% v/v e 3,445% v/v, respectivamente e para o óleo de neem foram 0,232% v/v e 1,937% v/v, respectivamente. Dessa forma, o óleo de neem foi mais tóxico tanto para a CL<sub>50</sub> quanto para a CL<sub>95</sub>, necessitando uma menor quantidade de produto para causar mortalidade. Por outro lado, o óleo de copaíba apresentou menor toxicidade, necessitando maior quantidade de produto para garantir a mortalidade dos insetos comparativamente ao óleo de neem (Tabela 4).

Os resultados obtidos nesse trabalho concordam com Bernardi et al. (2011) que testando a eficiência de um produto comercial a base do óleo de neem (NeemAzal-T/S<sup>®</sup>), sob as lagartas recém-eclodidas de *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae), estimaram a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> com taxas entre 0,15% e 0,24%, respectivamente. Em outro trabalho, a concentração letal (CL<sub>50</sub>) estimada do óleo de neem foi de 0,213% para lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* (CAMPOS; BOIÇA JUNIOR, 2012).

O óleo essencial de copaíba tem como principal componente químico o β-cariofileno, com efeito inseticida contra lepidópteros (LEANDRO et al., 2012). Assim como encontrado no presente trabalho (Tabela 3 e 4), outros estudos comprovam a atividade inseticida do óleo de copaíba às larvas de *S. frugiperda*, como pode ser

verificado no estudo desenvolvido por Santos et al. (2016) com 11 espécies de plantas, os autores avaliaram o efeito inseticida dos óleos vegetais extraídos dessas espécies, sob o 3º instar de *S. frugiperda*, e constataram que o óleo extraído de uma espécie do gênero *Copaifera* (Fabaceae) apresentou maior toxicidade para as lagartas, sendo mais tóxico que os demais óleos avaliados.

Assim, o óleo de neem e o óleo de copaíba apresentaram atividade inseticida contra *S. frugiperda*, o que pode ser atribuído pela ocorrência das interações entre os constituintes majoritários, uma vez que os compostos químicos, independentemente da concentração no óleo vegetal, exercem um papel de extrema significância no manejo integrado de pragas.

#### **4 CONCLUSÃO**

Todos os óleos apresentaram atividade ovicida, porém os óleos de citronela, palmarosa e melaleuca foram mais tóxicos.

O óleo de neem e de copaíba apresentam atividade inseticida satisfatória sobre as larvas de 1º e 2º instar de *S. frugiperda*;

Baseando-se na concentração letal, o óleo de neem é mais tóxico às larvas de 1º instar de *S. frugiperda*.

#### **5 AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. 4. ed. Carol Stream: Allured, **Publishing Corporation**, p.804, 2007.
- ATAIDE, J. O. **Óleos essenciais no manejo de *Duponchelia fovealis* Zeller, 1847 (Lepidoptera: Crambidae)**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, p. 80, 2017.
- BERNARDI, D.; SILVA, O. A. B. N.; BERNARDI, O.; SILVA, A.; DA CUNHA, U. S.; GARCIA, M. S. Eficiência e efeitos subletais de nim sobre *Bonagota salubricola* (meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 2, p. 412-419, 2011.
- BRAHMI, F.; ABDENOUR, A.; BRUNO, M.; SILVIA, P.; ALESSANDRA, P.; DANILLO, F.; MOHAMED, C. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* L. Huds growing in Algeria. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 88, p.96-105, 2016.
- CAMPOS, A. P; BOIÇA JUNIOR, A. L. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes concentrações de óleo de nim. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.2, p. 137-144, 2012.
- COLPO, J. F.; JAHNKE, S. M.; FÜLLER, T. Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de plantas medicinais**. Campinas, v.16, n.2, p.182-188, 2014.
- CONCESCHI, M. R.; ANSANTE, T, F.; MAZZONETTO, F.; VENDRAMM, J. D.; SOSSAI, V. L. M.; PIZETTA, L. C.; CORBANI, R. Z. Efeito de Extratos Aquosos de *Azadirachta indica* e de *Trichilia pallida* sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **BioAssay**, Londrina, v. 6, n. 1, p.1-6, 2011.
- LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C.; NEVES, J. K.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, Beijing, v. 17, n. 4, p.3866-3889, 2012.
- LIMA, M. P. L.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JUNIOR, M. G C.; MARQUES, E. J.; CORREIA, A. A. Bioatividade de formulações de nim (*azadirachta indica* A. Juss, 1797) e de *bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1381-1389, 2010.

LÓPEZ, G. P.; RODRÍGUEZ, A. G.; OYAMA, K.; REYES, P. C. Importância de la diversidad genética sobre la defensa química de plantas y las comunidades de herbívoros. **Biológicas Revista de la Des Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, v.15, n.2, p.1-8, 2013.

MARONEZE, D. M.; GALLEGOS, D. M. N. Efeito de extrato aquoso de *Melia azedarach* no desenvolvimento das fases imatura e reprodutiva de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 537-550, 2009.

MCAGNAN, R.; MACAGNAN, R.; FLÁVIA WERNER, F.; REGO, B. E. F.; BARP, E. A. Eficácia de Extratos Vegetais no Controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em Milho. **Biosaúde**, Londrina, v. 14, n. 2, 2012.

MORDUE, A. J; NISBET, A. J. Azadirachtin from nem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Londrina, v.29, n. 4, p.615-632, 2000.

NALIN, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba: USP/ESALQ, p. 150, 1991.

OLIVEIRA, L. G. S.; RIBEIRO, D. A.; SARAIVA, M. E.; MACÊDO, D. G.; MACEDO, J. G. F.; PINHEIRO, P. G.; COSTA, J. G. M.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v.97, p.455-464, 2017.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* L' Herit (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa-MG, p.59, 2010.

RAO, B. R. R.; KAUL, P. N.; SYAMASUNDAR, K. V.; RAMESH, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). **Industrial Crops and Products**, v.21, p.121-7, 2005.

SALEEM, M.; HUSSAIN, D.; GHOUSE, G.; ABBAS, M.; FISHER, S. W. Monitoring of insecticide resistance in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of Punjab, Pakistan to conventional and new chemistry insecticides. **Crop Protection**, Toowoomba, v. 79, n. 1, p. 177-184, 2016.

SÂMIA, R.R. OLIVEIRA, R. L.; MOSCARDINI, V. F.; CARVALHO, C. A. Effects of Aqueous Extracts of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) on the Growth and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.45, p. 580-587, 2016.

SANTOS, A. C. V.; FERNANDES, C. C.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H. Insecticidal oils from amazon plants in control of fall armyworm. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 642-647, 2016.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SILVA, M. T.; BORGES, L. L.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; BATISTA, C. R.; MATOS, C. B.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; MOURÃO, R. H. V.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Viscosity of the Oil-resins and Chemical Composition of the Essential Oils from Oils-resins of *Copaifera multijuga* Hayne Growing in the National Forest Saracá-Taquera Brazil, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.20, n.5, p.1226-1234, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 467-496, 2003.

SOARES, C. S. A.; COSTA, M. S.; BOTELHO, M.; BEZERRA, C. E. S. Ação Inseticida de Óleos Essenciais Sobre a Lagarta Desfolhadora *Thyrintea arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, p.154 -157 2011.

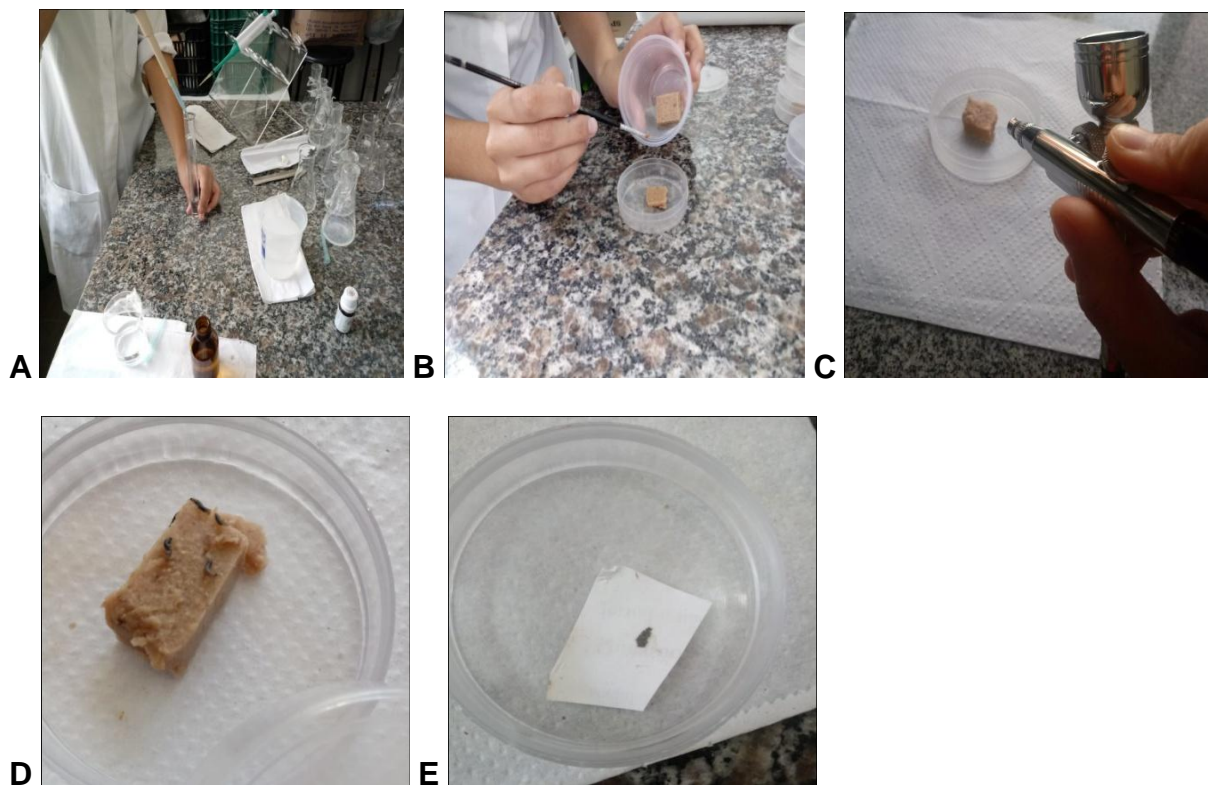
VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatographi**, USA, v. 11, p. 463-471, 1963.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Mortalidade de lagarta de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.3, p.316-322, 2005.

VIEIRA, I. G. **Estudos caracteres silviculturais e de produção de óleos essenciais de progênies de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill; L. A. S. Johnson procedente de Anhembi SP Brasil, Ex. Atherton QLD- Austrália**. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Programa de Pós-Graduação em recursos florestais, Universidade Federal de São Paulo, Picacicaba: ESALQ p.80, 2004.

YAZDANI, E, SENDI J. J, HAJIZADEH, J. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research**, v.54, p.53-61, 2014.

**APÊNDICE - ETAPAS DO ESTUDO DE TOXICIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS EM OVOS E LAGARTAS DE 1º, 2º, 3º ÍNSTAR DE *S. frugiperda*.**



Fotos: Alexandra Aparecida Zorzal.

**Figura 1.** Etapas do estudo de toxicidade de óleos vegetais em ovos e lagartas de 1º, 2º, 3º instar de *S. frugiperda*. (A) Preparação das diluições de óleos vegetais; (B) Lagartas sendo transferidas para gerbox com dieta artificial; (C) Pulverização dos óleos vegetais; (D) Lagartas mortas pelos óleos vegetais; (E) Ovos não eclodidos pela imersão dos óleos vegetais.



### **CAPÍTULO 3 - ASSOCIAÇÃO DO ÓLEO DE NEEM E *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) VISANDO O MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

#### **RESUMO**

Para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), vários métodos são pesquisados, incluindo a associação de compostos vegetais e agentes entomopatogênicos. Assim, no presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito associativo do óleo de neem com o vírus entomopatogênico *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). Para isso, avaliou-se o efeito isolado e associativo do óleo e do vírus em lagartas no primeiro ínstar de *S. frugiperda* utilizando respectivamente os valores estimados da CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> de ambos os agentes de controle. Por sua vez, a associação foi realizada com a combinação de 2 mL (SfMNPV) + 2 mL (Óleo de neem) e, em todas as aplicações isoladas 2 mL, seja do SfMNPV ou óleo de neem. Assim, para fornecer o alimento inoculado com os respectivos tratamentos, procedeu-se a pulverização do substrato alimentar (Pedaços de folhas de milho), utilizando um micropulverizador com pressão ajustada para 15 lb/pol<sup>2</sup>. Dessa forma, determinou-se que a associação do SfMNPV com o óleo de neem afetou a multiplicação do vírus no seu hospedeiro natural, *S. frugiperda*, reduzindo conseqüentemente o número de poliedros virais por lagarta inoculada. Contudo, apesar de não ter ocorrido uma interação sinérgica com a associação do SfMNPV e o óleo de neem, acredita-se que, é uma opção que pode ser avaliada em condições de campo, isso em virtude dos benefícios que o óleo vegetal promove aos poliedros virais no ambiente em relação à proteção contra a radiação ultravioleta.

**Palavras- chave:** Metabólitos secundários. Baculovirus. Lagarta-do-cartucho.

**CHAPTER 3 - ASSOCIATION OF NEEM OIL AND *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) VISUALIZING THE MANAGEMENT OF *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**ABSTRACT**

For the control of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), several methods are investigated, including the association of plant compounds and entomopathogenic agents. Thus, in the present work, the objective was to evaluate the associative effect of neem oil with the entomopathogenic virus *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). For this, we evaluated the isolated and associative effect of oil and virus on caterpillars in the first instar of *S. frugiperda* using respectively the estimated LC<sub>50</sub> and LC<sub>95</sub> values of both control agents. In its turn, the association was performed with the combination of 2 mL (SfMNPV) + 2 mL (neem oil) and, in all isolated applications 2 mL, either SfMNPV or Neem oil. Thus, to provide the food inoculated with the respective treatments, the food substrate (Corn leaf pieces) was sprayed using a micropulver with a pressure set at 15 lb/in<sup>2</sup>. In this way, it was determined that the association of SfMNPV with neem oil affected the multiplication of the virus in its natural host, *S. frugiperda*, consequently reducing the number of viral polyhedra per inoculated caterpillar. However, although a synergistic interaction has not taken place, it is believed that it is an option that can be evaluated under field conditions, this is due to the benefits that vegetable oil promotes to viral polyhedra in the environment in relation to protection against ultraviolet radiation.

**Keywords:** Secondary metabolites. Baculovirus. Fall armyworm.

## 1 INTRODUÇÃO

A Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto polífago que ataca diversas culturas de importância econômica, dentre as quais o milho. Essa espécie é originária da região tropical e subtropical do continente americano. Entretanto, já existem relatos de sua ocorrência na cultura do milho no continente africano (ROSA; BARCELOS, 2012; GOERGEN et al., 2016).

O manejo de *S. frugiperda* é feito basicamente através do uso dos inseticidas químicos, plantas geneticamente modificadas e inseticidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae). Contudo, além do *B. thuringiensis*, existem outros agentes de controle biológico que podem ser utilizados visando o manejo de *S. frugiperda*, destacando-se os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e o vírus entomopatogênico *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) (TAVARES et al., 2009; BARRERA et al., 2011; CAMARGO et al., 2017).

Pesquisas comprovam a eficiência do vírus SfMNPV, por ser específico e virulento a *S. frugiperda* e não causar nenhum impacto aos inimigos naturais, vertebrados, incluindo o homem (VALICENTE et al., 2013). Por outro lado, extratos e óleos de diversas espécies vegetais também vêm sendo estudados quanto à atividade inseticida a *S. frugiperda* (SCAPINELLO et al., 2014; CRUZ et al., 2017). Baseando-se nessas medidas de manejo, pesquisas comprovam a possibilidade do uso associado visando à redução dos prejuízos decorrentes dessa espécie praga em diversas culturas de importância agrícola (NATHAN; KALAIVANI, 2006; KUMAN et al., 2008; SOKAME et al., 2015).

Desse modo, objetivou-se avaliar o efeito associativo do óleo de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) com SfMNPV, visando à incorporação dessa associação aos programas de manejo integrado de *S. frugiperda*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAÉ/UFES).

### 2.1 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DE *S. frugiperda*

Os insetos utilizados nesta pesquisa são provenientes da criação massal mantida no Laboratório de Entomologia do NUDEMAFI e a respectiva multiplicação e manutenção foram realizadas em sala climatizada ajustada nas seguintes condições climáticas: temperatura:  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa: 60% e fotofase: 12 horas. Para isso, adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de mel em 10%. Como substratos para a oviposição foram utilizadas folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas, as quais foram mantidas em potes plásticos transparentes até a eclosão das larvas. Em seguida, as larvas foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes de acrílico (50 mL) contendo dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja (NALIM, 1991). Posteriormente, as larvas foram individualizadas com aproximadamente 10 dias de vida em recipientes de acrílico (Gerbox<sup>®</sup> - 3 cm de diâmetro) até a fase pupal e o alimento (dieta artificial) foi fornecido *ad libitum*. Após a emergência dos adultos, os mesmos foram transferidos para as gaiolas de criação, dando continuidade ao ciclo.

### 2.2 OBTENÇÃO E PRODUÇÃO DE SfMNPV

Para o ensaio foi utilizado o isolado 6 de SfMNPV proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, pois esse isolado causa alta mortalidade e alta produção viral por lagarta dessa

espécie. Além disso, foi selecionado por não ocasionar o rompimento imediato do tegumento após a morte (VALICENTE et al., 2008; VIEIRA et al., 2012).

A multiplicação do vírus foi feita a partir de uma alíquota inicial na concentração de  $1 \times 10^8$  corpos poliédricos de inclusão (PIB/mL), sendo pipetada (70  $\mu$ l) na superfície da dieta artificial (sem formaldeído) contida em tubos de vidro (2 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e em seguida lagartas de *S. frugiperda* com 8 dias foram individualizadas. As lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por SfMNPV foram recolhidas e congeladas para purificação do vírus.

A purificação do vírus seguiu a metodologia proposta por Hashimoto et al. (2000) com modificações. Com isso, os insetos com sintomatologia viral foram macerados em água destilada autoclavada contendo SDS em 1% (Dodecil Sulfato de Sódio) e o líquido proveniente foi filtrado em tecido tipo *Voile*, isso com intuito de facilitar a remoção dos tecidos gordurosos e, conseqüentemente separar o líquido resultante das partes mais grosseiras das lagartas para obtenção da suspensão viral de SfMNPV. Em seguida a suspensão com as partículas virais foi adicionada em tubos Falcon<sup>®</sup> (50 mL). O filtrado permaneceu sob agitação orbital a 250 rotações por minuto (rpm) por um período 30 minutos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 6000 rpm/20 minutos durante três vezes. As partículas virais precipitadas pelo processo de centrifugação formaram um *pellet* no fundo do tubo, descartando o sobrenadante em cada centrifugação. Em seguida, após a última centrifugação o vírus purificado foi ressuspenso em água destilada e armazenado em freezer a 4 °C para posterior uso nos ensaios.

### 2.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE NEEM

Apesar dos resultados no capítulo 2, em relação à atividade inseticida do óleo de copaíba às lagartas de 1º instar, foi utilizado apenas o óleo de neem (*A. indica*), NeemMax<sup>®</sup>, pois foi mais tóxico em ambas as concentrações letais analisadas, CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>.

## 2.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL) DE SfMNPV

O ensaio experimental foi montado com lagartas de 1<sup>o</sup> ínstar de *S. frugiperda* inoculadas com sete concentrações de suspensão viral. As concentrações utilizadas foram:  $1,00 \times 10^2$ ;  $1,00 \times 10^3$ ;  $1,00 \times 10^4$ ;  $5,00 \times 10^4$ ;  $1,00 \times 10^5$ ;  $1,00 \times 10^6$  e  $1,00 \times 10^7$  corpos poliédricos de inclusão/mL (PIB/mL). Todas as concentrações foram escolhidas baseadas na metodologia proposta por Paiva (2013).

A inoculação do vírus foi realizada através da pulverização de 2 mL das respectivas suspensões virais em pedaços de folhas de milho (22 cm<sup>2</sup>), utilizando um micropulverizador com pressão ajustada para 15 lb/pol<sup>2</sup>. Posteriormente, os pedaços foliares foram acondicionados em caixas de acrílico tipo Gerbox<sup>®</sup> (363 cm<sup>3</sup>) e, em seguida 15 lagartas foram transferidas com auxílio de um pincel de cerdas macias para cada unidade amostral.

Dessa forma, cada tratamento foi composto de quatro repetições, perfazendo assim 60 insetos por concentração. Assim, os pedaços foliares utilizados no controle foram pulverizados com água destilada mais espalhante adesivo (Tween<sup>®</sup> 20). Após 24h, os insetos foram individualizados em copos plásticos com tampa (50 mL) contendo no seu interior um pedaço de dieta artificial (2 cm<sup>3</sup>) como substrato alimentar. Por sua vez, o ensaio foi repetido três vezes ao longo do tempo e conduzido em câmara climática (Temperatura:  $25 \pm 2$  °C, Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12h). As avaliações foram realizadas diariamente até o décimo dia, determinando-se o número de insetos mortos em cada repetição, sendo as lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por SfMNPV, identificadas por unidade amostral e armazenadas em freezer a 4 °C.

## 2.5 ASSOCIAÇÃO DO SfMNPV COM ÓLEO DE NEEM

Para realização desse ensaio, foram utilizados as concentrações letais estimadas no capítulo 2 para o isolado 6 de SfMNPV e o óleo de neem sobre lagartas de *S. frugiperda* no 1<sup>o</sup> ínstar. Por sua vez, a associação foi realizada com a combinação de 2 mL (SfMNPV) + 2 mL (Óleo de neem) e, em todas as aplicações isoladas 2 mL, seja do SfMNPV ou óleo de neem. Dessa forma, para fornecer o alimento inoculado

com os respectivos tratamentos, procedeu-se a pulverização do substrato alimentar (Pedaços de folhas de milho) ( $22 \text{ cm}^2$ ), utilizando um micropulverizador com pressão ajustada para  $15 \text{ lb/pol}^2$ . No controle, o substrato alimentar foi pulverizado com água destilada mais espalhante adesivo (Tween<sup>®</sup> 20). Posteriormente, os pedaços foliares foram acondicionados em caixas de acrílico tipo Gerbox<sup>®</sup> ( $363 \text{ cm}^3$ ) e em seguida 15 lagartas foram transferidas com auxílio de um pincel de cerdas macias para cada unidade amostral.

Então, após 24h da pulverização, os insetos foram individualizados em copos plásticos com tampa (50 mL) contendo no seu interior um pedaço de dieta artificial ( $2 \text{ cm}^3$ ) como substrato alimentar, fornecido *ad libitum* e sem nenhum tipo de inoculação. Cada tratamento e o controle tiveram quatro repetições, com 15 lagartas de *S. frugiperda* por repetição. Os parâmetros avaliados foram baseados na taxa de mortalidade dos insetos, ou seja, observando-se o tempo de sobrevivência. Além disso, nos tratamentos com SfMNPV, foi determinado a produção viral (Corpos Poliédricos de Inclusão (PIB), PIB/total, PIB/lagarta e LE/ha (Lagarta equivalente por hectare)). O ensaio foi conduzido em câmara climática, ajustada nas seguintes condições: Temperatura:  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , Umidade relativa: 60% e Fotofase: 12 horas. Assim, esse ensaio foi constituído pelos seguintes tratamentos:

1. Óleo de neem ( $\text{CL}_{50}$ );
2. SfMNPV ( $\text{CL}_{50}$ );
3. SfMNPV ( $\text{CL}_{50}$ ) + Óleo de neem ( $\text{CL}_{50}$ );
4. Óleo de neem ( $\text{CL}_{95}$ );
5. SfMNPV ( $\text{CL}_{95}$ );
6. SfMNPV ( $\text{CL}_{95}$ ) + Óleo de neem ( $\text{CL}_{95}$ );
7. Controle.

## 2.6 ANÁLISE DOS DADOS

O modelo experimental adotado foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e, para análise dos dados da associação foi realizada a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, com comparações pelo teste de Log Rank ( $p < 0,05$ ), para verificar as diferenças entre os grupos de tratamentos.

Os dados de mortalidade referentes à estimativa da concentração letal do SfMNPV foram submetidos à análise de Probit.

Os dados dos parâmetros de produção viral, foram transformados para  $\log_{10}(x)$ , e submetidos às análises de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O software utilizado em todas as análises foi o programa estatístico R.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL) DE SfMNPV

Com base nas estimativas das concentrações letais para lagartas de *S. frugiperda* inoculadas com o SfMNPV, observa-se que as concentrações letais necessárias para matar 50% ( $CL_{50}$ ) e 95% ( $CL_{95}$ ) de *S. frugiperda*, foram de  $1,03 \times 10^5$  (PIB/mL) e  $1,09 \times 10^7$  (PIB/mL), respectivamente (Tabela 1). Entretanto, para otimizar a multiplicação do vírus, o ideal é inocular lagartas em estádios mais avançados para aumentar a produção viral, analisando a susceptibilidade do hospedeiro e respectivamente a virulência do vírus (ESCRIBANO et al., 1999, RIOS-VELASCO et al., 2002).

**Tabela 1.** Concentração letal de SfMNPV a lagartas de 1º instar de *S. frugiperda*.

Nº	Inclinação $\pm$ EP <sup>a</sup>	$CL_{50}$ (PIB/mL) (IC95%) <sup>b</sup>	$CL_{95}$ (PIB/mL) (IC95%) <sup>b</sup>	$\chi^2$ <sup>c</sup>	P-Valor <sup>d</sup>	GL <sup>e</sup>
1184	$0,812 \pm 0,111$	$1,03 \times 10^5$ ( $7,4 \times 10^4$ - $1,4 \times 10^5$ )	$1,09 \times 10^7$ ( $5,6 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$ )	35,51	0,999	5

<sup>a</sup> Inclinação  $\pm$  Erro padrão;

<sup>b</sup> Intervalo de confiança em 95% de probabilidade;

<sup>c</sup> Teste de qui-quadrado;

<sup>d</sup> Probabilidade de significância;

<sup>e</sup> Graus de liberdade.

Desse modo, a susceptibilidade foi comprovada por Escrivano et al. (1999) em lagartas de 2º ao 6º instar de *S. frugiperda*, com quatro isolados geográficos de SfMNPV (dois dos Estados Unidos, um da Nicarágua e um da Argentina), mostraram que os valores das concentrações letais ( $CL_{50}$ ) aumentaram com o estágio larval e

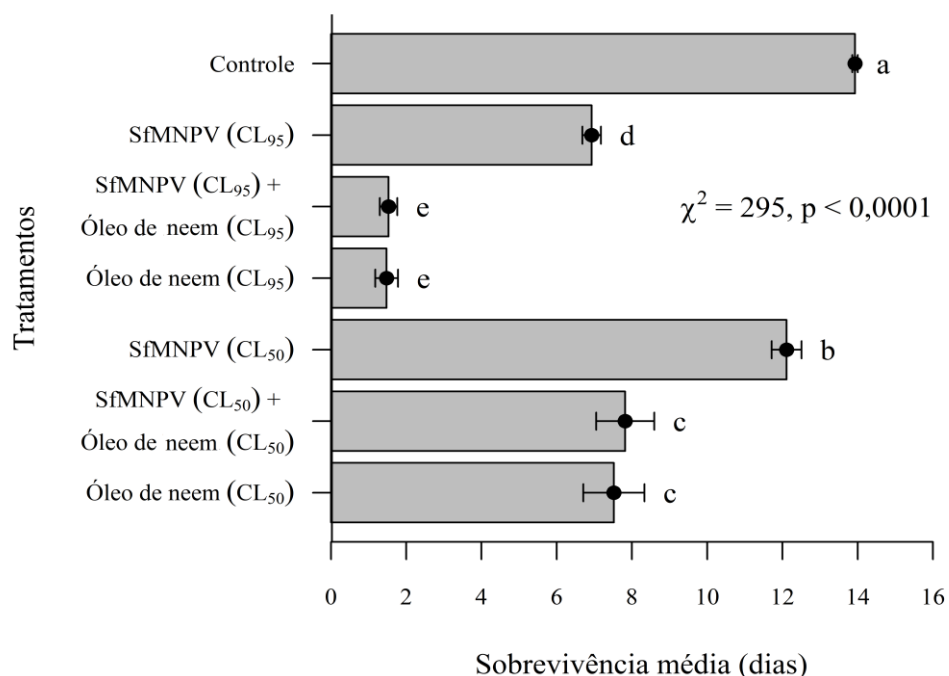


também houve diferença entre os isolados e a susceptibilidade dos insetos dentro da mesma população de *S. frugiperda*.

Em relação ao SfMNPV, o Centro Nacional de Pesquisas com Milho e Sorgo (CNPMS) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) avaliou a eficiência de 22 isolados desta espécie de vírus e destacou o isolado 19 (I19) com alta virulência (BARRETO et al., 2005). Em outro estudo o efeito dos isolados 19 e 6 de SfMNPV foi estudado em lagartas de 2º instar de *S. frugiperda*, obtendo-se como resultado  $CL_{50}$   $1,2 \times 10^6$  PIB/mL e  $1,6 \times 10^6$  PIB/mL, respectivamente, mostrando que o isolado 6 é tão virulento quanto o isolado 19 (VIEIRA et al., 2012).

### 3.2 ASSOCIAÇÃO DO SfMNPV COM ÓLEO DE NEEM

Os resultados apresentados indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos  $CL_{95}$  SfMNPV + neem e  $CL_{95}$  neem isolado com tempo de sobrevivência média de 1,53; 1,48 dias, respectivamente de *S. frugiperda* (Figura 1).



**Figura 1.** Análise de sobrevivência de lagartas de 1º instar de *S. frugiperda* sob efeito isolado ou associado do óleo de Neem e o vírus SfMNPV.

Esses tratamentos obtiveram maiores mortalidades, além disso, o tempo de morte foi reduzido para as lagartas de *S. frugiperda*. O que pode ter ocasionado um menor tempo de sobrevivência, é a ação do óleo de neem, pois, o óleo pode ter efeito direto sobre o metabolismo dos insetos, causando danos nos tecidos (NATHAN; KALAIVANI, 2005).

Com relação à utilização isolada de SfMNPV (Figura 1), os tratamentos necessitaram de 12,11 dias e 6,93 dias, respectivamente para matar 50% e 95% da população das lagartas, duração bem superior quando analisamos os tratamentos isolados do óleo de neem (Figura 1). Esse período de tempo é devido ao processo infeccioso do vírus no hospedeiro, que necessita um tempo maior para ocorrer a replicação do SfMNPV nas células do inseto, resultando na morte da lagarta em média de 6 a 8 dias após a infecção, isso dependendo dos fatores envolvidos, seja bióticos ou abióticos (VALICENTE; CRUZ, 1991).

Trabalhos realizados por outros pesquisadores comprovam o aumento da porcentagem da mortalidade das larvas do 2º instar de *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae), quando associado o *Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus* (LdNPV) com óleo de neem, as larvas morreram mais rápido, comparado com o tratamento isolado do LdNPV (COOK et al., 1996).

De forma similar e, corroborando com os resultados obtidos de associação de SfMNPV com o óleo de neem, e trabalhando com outro vírus e inseto praga, Kuman et al. (2008) avaliando o efeito isolado e a associação do vírus *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV) + Extrato de neem sob larvas de 3º a 6º instar de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) também concluíram que as lagartas morrem mais rápido quando associa-se o vírus entomopatogênico com o extrato vegetal.

Em outro estudo, foi avaliado a combinação do vírus *Spodoptera litura multiple nucleopolyhedrovirus* (SplMNPV) com o extrato de *A. indica* sob o desenvolvimento larval da espécie *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório, comprovando os benefícios dessa associação no manejo dessa espécie de inseto praga (NATHAN; KALAIVANI, 2005). O efeito sinérgico da associação do SplMNPV com o extrato do óleo de neem foi comprovado pelos mesmos autores,

com a associação de  $1 \times 10^3$  PIB + 0,25 ppm (SplMNPV + Óleo de neem) e  $1 \times 10^6$  PIB + 0,5 ppm (SplMNPV + Óleo de neem), confirmando o potencial associativo destes agentes visando o manejo de *S. litura* (NATHAN; KALAIVANI, 2006).

Com base nos resultados, verifica-se que não houve diferença entre os tratamentos que associaram as  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  do vírus SfMNPV com as  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  do óleo de neem, isso em comparação com a utilização isolada do óleo de neem em ambas as concentrações ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ) (Figura 1). Apesar disso, a associação do SfMNPV com o óleo de neem pode auxiliar na manutenção da viabilidade dos poliedros virais no ambiente por mais tempo, ou seja o óleo pode evitar a inativação dos poliedros virais ocasionada pela incidência da radiação ultravioleta, aumentando seu uso como agente de controle biológico. Uma vez que, independente da virulência do entomopatógeno selecionado, sua infectividade é afetada no campo por fatores ambientais, como radiação solar, temperatura, umidade e pH (SHAPIRO et al., 2002; VILLAMIZAR et al., 2009). A exemplo, pode-se relatar a redução da infectividade do vírus SplMNPV, que é altamente patogênico para as larvas de *S. litura*, mas perdeu sua infectividade após 12 h de exposição direta à luz solar (SAJAP et al., 2007).

Como relatado, os óleos vegetais podem proporcionar proteção contra os raios ultravioletas, tal efeito foi comprovado por Shapiro et al. (2016), onde verificaram que o extrato da groselha negra, *Ribes nigrum* L. (Grossulariaceae), proporcionou proteção contra a inativação do vírus *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* (SeMNPV), apresentando índices satisfatórios, 88,8% de mortalidade de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e 93,2% de infectividade dos poliedros virais após a exposição aos raios ultravioleta (UVA/UVB).

De acordo com os resultados da produção viral, todos os tratamentos foram significativos ( $p < 0,001$ ). Como esperado, os tratamentos com SfMNPV sem associação com o óleo de neem foram mais produtivos em relação à produção viral (Tabela 2), uma vez que os insetos sobreviveram por um maior período de tempo, o que possibilitou um melhor aproveitamento do hospedeiro para a replicação do vírus (Figura 1).

**Tabela 2.** Produção de SfMNPV em lagartas de 1º instar de *S. frugiperda*, infectadas com SfMNPV, tratamento individual e associado com óleo de neem.

Tratamentos	PIB/total <sup>1,2</sup>	PIB/lagarta <sup>1,2</sup>	LE <sup>1,3</sup>
SfMNPV (CL <sub>50</sub> )	1,37E+08 ± 2,61E+06a	2,81E+08 ± 2,01E+06a	10878,25 ± 730,87d
SfMNPV (CL <sub>95</sub> )	1,50E+08 ± 1,85E+07a	1,04E+07 ± 1,01E+06b	29690,25 ± 3451,82c
SfMNPV (CL <sub>50</sub> ) + neem (CL <sub>50</sub> )	5,11E+07 ± 5,20E+06b	6,02E+06 ± 4,44E+05c	50640,25 ± 3768,32b
SfMNPV (CL <sub>95</sub> ) + neem (CL <sub>95</sub> )	1,46E+07 ± 2,17E+06c	1,01E+06 ± 1,54E+05d	315798,75 ± 47088,19a
F	97,165	173,36	172,95
p-valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ );

<sup>1</sup>Resultados obtidos da transformação dos dados por  $\text{Log}_{10}(x)$ ;

<sup>2</sup>PIB - Corpos Poliédricos de Inclusão;

<sup>3</sup>LE - Lagarta equivalente.

Dessa forma, os tratamentos com a utilização isolada de SfMNPV obtiveram uma maior quantidade de poliedros devido ao processo infeccioso do vírus no hospedeiro, pois quanto maior o tempo de exposição do vírus na lagarta, maior será a quantidade produzida. A produção viral está diretamente ligada ao estágio de desenvolvimento larval em que a inoculação do vírus foi feita (RIOS-VELASCO et al., 2012). No presente estudo, mesmo que a inoculação do vírus tenha sido realizada com lagartas de 2 dias, demorou para ocorrer a morte do inseto e assim ocorrer a replicação do SfMNPV na lagarta, infectando novos tecidos celulares.

Com relação à associação de SfMNPV + óleo de neem, a produção viral foi menor, uma vez que a mortalidade ocorreu em poucos dias, assim, o vírus não teve tempo de se replicar dentro do inseto, resultando em menor quantidade de poliedros nas lagartas. Dessa forma, apesar de não ter ocorrido uma interação sinérgica com a associação do SfMNPV + óleo de neem, acredita-se no potencial dessa associação em condições de campo, com base na proteção contra os efeitos adversos do ambiente, como, por exemplo a inativação dos poliedros virais pela radiação ultravioleta.

#### 4 CONCLUSÃO

Nas condições avaliadas, a associação de SfMNPV com o óleo de neem, apresentou efeito antagônico em relação aos parâmetros produtivos do vírus.

## 5 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo.

## 6 REFERÊNCIAS

- BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control**, v. 58, n.2, p. 113-120, 2011.
- BARRETO, M. R., GUIMARÃES, C.T., TEIXEIRA, F.F., PAIVA, E., VALICENTE, F.H. Effect of Baculovirus *spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by Rapd. **Neotropical Entomology**. v.34, n.1, 67-75, 2005
- CAMARGO, A. M.; CASTAÑERA, P.; FARINÓS, G. P.; HUANG, F. Comparative analysis of the genetic basis of Cry1F resistance in two strains of *Spodoptera frugiperda* originated from Puerto Rico and Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.146, p.47-52, 2017.
- COOK, S.P., WEBB, R. E., THORPE, K.W. Potential enhancement of the *gypsy moth* (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with the triterpene azadirachtin. **Environmental Entomology**. v.25, p.1210-1214, 1996.
- CRUZ, G. S.; TEIXEIRA, V. W.; OLIVEIRA, J. V.; ASSUNÇÃO, C. G. D.; CUNHA, F. M.; TEIXEIRA, A. A. C.; CAROLINA A. GUEDES, C. A.; DUTRA, K. A.; BARBOSA, D. R. S.; BRENDA, M. O. Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemico Biological Interactions**, v.263, p.74-80, 2017.
- ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R. D.; CHAPMAN, J. W.; CABALLERO, P. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.5, p.1079-1085, 1999.
- GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S.B.; TOGOLA, A.; TAMÒ, M. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. **Plos one**, v.11, n.10, 2016.

HASHIMOTO, Y.; HAYASHI, K.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; SHIMOJO, E. I.; KONDO, A.; MIYASONO, M.; SANNO, Y.; MATSUMOTO, T.; GRANADOS, R. R. Physical map of a *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Applied Entomology and Zoology**, v.35, n.1, p.45-51, 2000.

KUMAR, N. S.; MURUGAN, K., ZHANG, W. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. **Biological Control**, v.53, p.869-880, 2008.

NALIN, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba: USP/ESALQ, p. 150, 1991.

NATHAN, S. S., KALAIVANI, K. Efficacy of nucleopolyhedrovirus and azadirachtin on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**. v. 34, p.93-98, 2005.

NATHAN, S. S.; KALAIVANI, K. Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SplNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biological Control**, v.39, p.96-104, 2006.

PAIVA, C. E. C. **Multiplicação de *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Programa de Pós- Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, MG, p.63, 2013.

RIOS-VELASCO, C.; GALLEGOS-MORALES, G.; BERLANGA-REYES, D.; CAMBERO-CAMPOS, J.; ROMO-CHACÓN, A. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. **Florida Entomologist**, v.95, n.3, p.752-757, 2012.

ROSA, A. P. S. A.; BARCELOS, H. T. **Bioecologia e controle de *Spodoptera frugiperda* em milho**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Embrapa Informação Tecnológica, p. 9-10, 2012.

SAJAP, A. S., BAKIR, M.A., KADIR, H.A., SAMAD, N. A. Effect of pH, rearing temperature and sunlight on infectivity of Malaysian isolate of nucleopolyhedrovirus to larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.27, p. 108-113, 2007.

SCAPINELLO, J.; OLIVEIRA, V. J.; RIBEIROS, M. L.; TOMAZELLI JUNIOR, O. LUÍS CHIARADIA, A.; JACIRDAL MAGRO, J. D. Effects of supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Melia azedarach* L. on the control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p.20-26, 2014.

SHAPIRO, M.; SALAMOUNY, S. E.; SHEPARD, B. M.; JACKSON, D. M. Fruit and Vegetable Extracts as Radiation Protectants for the beet Armyworm

Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 32, p.91-100, 2016.

SHAPIRO, M.; FARRAR R.R. FARRAR JR.; DOMEK J., JAVAID I. Effects of virus concentration and ultraviolet irradiation on the activity of *corn earworm* and *beet armyworm* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedroviruses. **Journal of Economic Entomology**, v.95, p. 243-249, 2002.

SOKAME, B. M.; TOUNOU, A. K.; DATINON, B.; DANNON, E. A.; AGBOTON, C.; SRINIVASAN, R.; PITTENDRIGH, B. R.; TAM, M. Combined activity of *Maruca vitrata multi-nucleopolyhedrovirus*, MaviMNPV, and oil from neem, *Azadirachta indica* Juss and *Jatropha curcas* L., for the control of cowpea pests. **Crop Protection**, v.72, p.150-157, 2015.

TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; ASSIS JÚNIOR, S. L. A.; SILVIA DE SOUSA FREITAS, S. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Potential use of asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, v.30, p.384-388, 2009.

VALICENTE, F. H, TUELHER, E. S.; PENA, R. C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M. R. F. Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with Baculovirus *spodoptera*. **Neotropical Entomology**, v.42, p.191-199, 2013.

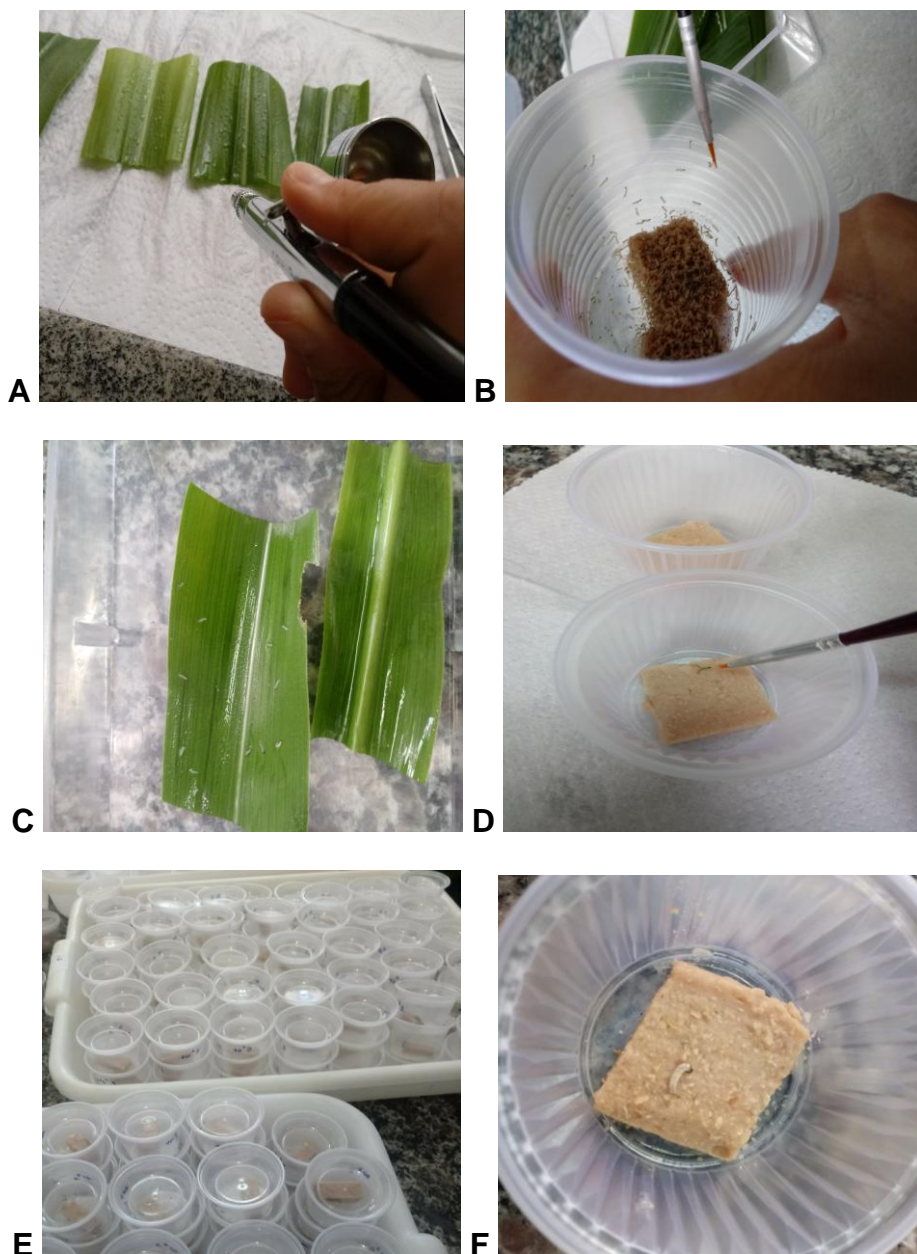
VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, (Circular Técnica, 15), p. 23, 1991.

VALICENTE, F.H; TUELHER, E. S.; PAIVA, C.E.C.; GUIMARÃES, M.R.F., MACEDO, C. V.; WOLFF, L.C. A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.1, p.77-82, 2008.

VIEIRA, C.M.; TUELHER, E.S.; VALICENTE, F.H.; WOLFF, J.L.C. Characterization of a *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.111, n.2, p. 189-192, 2012.

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A. M. Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de um nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.35, n.2, p.116-121, 2009.

**APÊNDICE - ETAPAS DA ASSOCIAÇÃO DE SfMNPV E ÓLEO VEGETAL EM LAGARTAS DE *S. frugiperda*, UTILIZANDO FOLHAS DE MILHO COMO SUBSTRATO.**



Fotos: Alexandra Aparecida Zorzal.

**Figura 1.** Etapas da associação de SfMNPV e óleo vegetal em lagartas de *S. frugiperda*, utilizando folhas de milho como substrato. (A) Pulverização da suspensão SfMNPV + óleo neem; (B) Lagartas sendo transferidas para as folhas; (C) Lagartas saudas sobre as folhas pulverizadas com SfMNPV + óleo neem; (D) Individualização da lagarta com dieta artificial; (E); Copo de plástico contendo dieta artificial e a lagarta infectada (ainda sem sintomas aparentes); (F) Lagarta com sintoma de infecção pelo SfMNPV.



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo possibilitou compreender e averiguar o potencial dos óleos vegetais e o vírus entomopatogênico SfMNPV para o manejo de *S. frugiperda*. Verificou-se que o óleo de neem apresentou maior toxicidade nas concentrações letais estudadas, desse modo o óleo foi associado ao vírus SfMNPV. A associação do SfMNPV com óleo de neem, é uma opção que pode ser avaliada em condições de campo, isso em virtude dos benefícios que o óleo vegetal promove aos poliedros virais no ambiente em relação à proteção contra a radiação ultravioleta.