

GUSTAVO DIAS DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE PRODUTOS DERIVADOS DE *Azadirachta indica* NO CONTROLE
DE *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

GUSTAVO DIAS DE ALMEIDA

POTENCIAL DE PRODUTOS DERIVADOS DE *Azadirachta indica* NO CONTROLE DE
Anticarsia gemmatalis (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

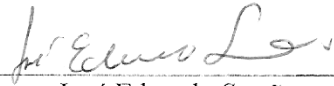
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de fevereiro de 2009.



Dirceu Pratissoli

Co-orientador

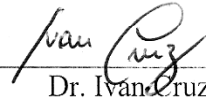


José Eduardo Serrão

Co-orientador



Prof. Ricardo Antonio Polanczyk



Dr. Ivandro Cruz



Prof. José Cola Zanuncio

Orientador

DEDICO

Aos meus pais

*José Elias de Almeida e Marlene Dias de
Almeida, que com o suor do rosto fizeram brotar
da terra o sustento de nossa família.*

OFEREÇO

*Aos meus irmãos, Rafael e
Lorena, e à Mariana.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido a vida e imensurável força e perseverança nas adversidades.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, sem a qual seria impossível o término deste curso.

Ao professor José Cola Zanuncio, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, meu franco reconhecimento pela valiosa orientação.

Ao professor José Eduardo Serrão, pelo grande apoio, atenção e ensinamentos durante esse trabalho.

Ao professor Dirceu Pratisoli, pela oportunidade, ainda, na graduação, de ingressar na pesquisa científica e pelo apoio e sugestões durante os experimentos.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela valiosa contribuição estatística e à Dra. Teresinha Vinha Zanuncio, pela contribuição nesta pesquisa.

Aos meus pais José Elias e Marlene, aos irmãos Rafael e Lorena e demais familiares pela educação, carinho, compreensão e apoio em toda a vida acadêmica.

À Mariana, minha namorada, pelo seu carinho, amor, compreensão e apoio para que ingressasse na pós-graduação.

Aos grandes amigos do tempo de graduação, Juliano, Moises e Victor, pela amizade, parceria científica e social.

Aos amigos Caio e Fabio pelo convívio diário, pela grande amizade, meu franco agradecimento.

Aos amigos do laboratório e de curso: Alexandre, Evaldo, Gilberto, Gibran, Glauco, José Milton, Mábio, Marcus, Patrick, Robson, Rosenilson e Sheila.

Aos estagiários do laboratório, especialmente à Raquel, que me acompanhou durante toda essa pesquisa, Danilo, João Paulo, Sergio, Taísa pela valiosa ajuda nas coletas de dados e aos demais estagiários do laboratório: Aline, Ancideriton, Astolfo, Gabriel, Isabel, Lais, Robson e Úrsula.

Ao Sr. Moacir, funcionário do laboratório, sempre presente e com boa vontade para ajudar.

Aos amigos dos curso de pós-graduação da UFV: André, Camila, Daniele, Daniela, Danilo, Diego, Felipe, Gustavo Sessa, Maristela e Marcus Antônio.

À professora Marisa de Andrade, pela concessão de utilização do laboratório de Biofarmacos.

Aos amigos de república em Viçosa, Antônio, Carlos e Henrique.

A todos os professores do Centro de Ciências Agrárias de Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), do Centro Federal de Educação Tecnológica do Espírito Santo (CEFETES-Uned Colatina), da Escola Família Agrícola (EFA-Barra de São Francisco) e da Escola Municipal Pluridocente Córrego da Sapucária, meus francos agradecimentos pelos valiosos ensinamentos, que possibilitou minha formação.

Ao povo brasileiro, que sempre pagou seus impostos, os quais possibilitaram minha formação acadêmica.

Enfim, a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a condução e elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

GUSTAVO DIAS DE ALMEIDA, filho de José Elias de Almeida e Marlene Dias de Almeida, agricultores familiares, nasceu em Barra de São Francisco, Espírito Santo no dia 04 de abril de 1985.

No ano de 2000, ingressou no Centro Federal de Educação Tecnológica do Espírito Santo (CEFETES-Uned Colatina).

Em 2003, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), tendo colado grau em agosto de 2007.

Em agosto de 2007, ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em nível de Mestrado, defendendo dissertação em fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
CAPÍTULO I:	
Citotoxicidade no tecido epitelial e redução da síntese de proteínas no corpo gorduroso de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae) produtos derivados de <i>Azadirachta indica</i>.....	
	11
Resumo.....	11
Introdução.....	13
Material e Métodos.....	14
Resultados.....	19
Discussão.....	22
Conclusão.....	30
Referências Bibliográficas.....	30
CAPÍTULO II:	
Consumo foliar e mortalidade larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuide) em plantas de soja tratadas com produtos derivados de <i>Azadirachta indica</i>	
	56
Resumo.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	58
Resultados.....	61

Discussão.....	62
Conclusão.....	64
Referências Bibliográficas.....	65

RESUMO

ALMEIDA, Gustavo Dias, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2009. **Potencial de produtos derivados de *Azadirachta indica* no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).** Orientador: José Cola Zanuncio. Co-orientadores: José Eduardo Serrão, Dirceu Pratissoli, Paulo Roberto Cecon e Teresinha Vinha Zanuncio.

A soja [*Glicine max* (L.) Merr.] é uma das mais importantes plantas cultivadas no mundo com grande valor econômico e social. Insetos pragas podem reduzir a produção dessa cultura, destacando-se *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), como o desfolhador mais importante da soja nas Américas do Sul e Norte. O nim indiano, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), é a planta com maior potencial inseticida do mundo. A azadiractina, sintetizada principalmente nos frutos dessa planta, é o principal composto responsável pela ação letal e subletal dessa substância. Os efeitos da azadiractina sobre *A. gemmatalis* não foram, ainda, estudados, mas, essa praga demonstrada elevada suscetibilidade à inseticidas sintetizados por plantas. Os objetivos desse trabalho foram avaliar o potencial de produtos derivados de *A. indica* sobre *A. gemmatalis* em condições de laboratório e casa de vegetação. Lagartas de terceiro estágio de *A. gemmatalis* foram alimentadas por quatro dias com dieta artificial contendo extrato etanólico de sementes de *A. indica* e óleo comercial, Azamax[®]. A mortalidade, consumo alimentar, produção de fezes, ganho de peso vivo, peso e deformação de pupas com 24 horas após o início desse estágio e sobrevivência e a quantidade de ovos produzidos por fêmea emergida a após a exposição ao extrato de nim na fase jovem foram avaliados em laboratório. Os efeitos da aplicação de extrato de sementes de nim e do óleo comercial, Azamax[®] sobre a mortalidade e consumo alimentar de lagartas de *A. gemmatalis* em plantas de soja, em casa de vegetação foram, também, avaliados. O extrato de sementes de nim

e óleo comercial, Azamax, causaram efeitos deletérios nas lagartas de *A. gemmatalis*, como mortalidade larval e pupal, redução do consumo alimentar e do ganho de peso, desorganização nas células do intestino médio, modificações no corpo gorduroso e redução da síntese de proteínas no corpo gorduroso. Mariposas *A. gemmatalis* expostas ao extrato de nim apresentaram redução na quantidade de ovos produzidos. A pulverização de plantas de soja com produtos derivados de *A. indica* causou elevada mortalidade e reduziu os danos por *A. gemmatalis* nessa cultura. Isto torna possível a utilização desses produtos em programas de manejo integrado de *A. gemmatalis* na cultura da soja.

ABSTRACT

ALMEIDA, Gustavo Dias, M.Sc. Universidade Federal of Viçosa, February, 2009.
Potential of products derived from *Azadirachta indica* in control of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Adviser: José Cola Zanuncio. Co-advisers: José Eduardo Serrão, Dirceu Pratissoli, Paulo Roberto Cecon and Teresinha Vinha Zanuncio.

The soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is an important crop in the world with high economic and social value. The carterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is the most important defoliator of soybean in North and South Americas and the search for useful insecticides to control this pest has been studied. The neem, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) is the plant with high insecticide potential of the world. The azadirachtin, synthesized mainly in the fruits of this plant is the main component responsible for the lethal and sub-lethal action of the extracts obtained from neem. The objective of this study was evaluate the potential of products derived from *A. indica* on *A. gemmatalis* in the laboratory and greenhouse conditions. Third stage larvae of *A. gemmatalis* were fed for four days with artificial diet containing neem seed ethanol extract and oil trade, AzamaxTM. Mortality, food consumption, feces production, weight gain, weight and deformation of pupae at 24 hours old and the number of eggs per female emerged from larvae fed on sub-lethal doses of azadirachtin were evaluated in laboratory. The effects of neem seed extract and the oil trade on mortality and food consumption of larvae of *A. gemmatalis* in soybean plants in the greenhouse were also evaluated. The neem seed extract and trades Azamax, caused deleterious effects on the *A. gemmatalis* larvae, as larval and pupal mortality, reduction of food intake and weight gain, disruption of midgut cells and changes in the fat body. Lower dosages of neem seed extract reduced the egg productions of the *A. gemmatalis* moths. Soybean plants sprayed with both products from *A. indica* caused high mortality and reduced the

damages by *A. gemmatalis* in greenhouse conditions. The neem products can be used in integrated program management of *A. gemmatalis* in the soybean crop.

INTRODUÇÃO GERAL

A lagarta desfolhadora de soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie de clima tropical e subtropical com ampla distribuição geográfica, da Argentina aos Estados Unidos da América (Homrich et al., 2008). Esse inseto desfolha e consome partes de plantas de soja (Nascimento et al., 2003) e também, em algodoeiro, alfafa, pastagens, arroz e trigo (Turnipseed e Kogan, 1976).

O desfolhamento compromete o enchimento das vagens e reduz a produção de grãos de soja (Fugi et al., 2005). O ataque inicial de *A. gemmatalis* é na forma de pequenos buracos nas folhas e à medida que o desfolhamento aumenta, estes se unem até a perda total da folha, inclusive das nervuras e do pecíolo, podendo ocasionar até 100% de desfolha (Praça et al., 2006).

O adulto de *A. gemmatalis* é uma mariposa de coloração variada e hábito noturno, mais, comumente, pardo acinzentada, com 40 mm de envergadura e pousa com as asas abertas, quando se nota uma listra transversal escura unindo as pontas das asas (Gallo et al., 2002). São, freqüentemente, encontradas durante o dia em locais sombreados, principalmente na base das plantas, mas acasalam se durante o período a noite (Schmidt et al., 2001), com pico de oviposição entre 21 e 23 horas (Greene et al., 1973).

Ovos de *A. gemmatalis* são colocados, isoladamente, na face inferior das folhas, mas é comum a presença desses em todas as partes das plantas de soja, incluindo hastes e vagens (Greene et al., 1976). São esféricos, de coloração verde, escurecem gradualmente até a coloração marrom avermelhada, medem em torno de 0,5 mm, e o período de incubação é, geralmente, de dois a cinco dias (Praça et al., 2006). Lagartas recém eclodidas começam a raspar as folhas e o período larval tem de cinco a seis estádios, com, até, 25 dias de duração (Andrade et al., 2004),

dependendo da fonte de alimento e temperatura (Panizzi et al., 2004). Lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com folhas de diferentes genótipos de soja apresentaram período larval de 11,9 e 13,6 a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $60 \pm 10\%$ umidade relativa e fotoperíodo de 14 h (Fugi et al., 2005). A temperatura, também, afeta o número de estádios, com cinco a seis estádios acima de $18,3^\circ\text{C}$ e até sete a temperaturas menores (Fugi et al., 2003).

Lagartas de *A. gemmatalis* apresentam coloração verde, verde claro ao escuro, pardo avermelhado e até preta em condições de alta população, em especial após o segundo estágio, com cinco listras longitudinais de cor branca e até 40-50 mm de comprimento. Possuem quatro pares de falsas pernas e se jogam no solo quando tocadas (Gallo et al., 2002). Ao final do último estágio, as lagartas param de se alimentar, ficam encolhidas com aspecto umedecido e coloração rósea no dorso, descem ao solo onde formam um casulo, unindo partículas de fezes por uma de teia a uma profundidade variável em função da textura do mesmo e se transformam em pupas. Esse período dura em média de um a dois dias (Praça et al., 2006).

A pupa de *A. gemmatalis* apresenta, inicialmente, coloração verde-clara e com um dia de formada, torna-se marrom escura e brilhante, ficando quase preta próxima a emergência dos adultos e medem entre 17 a 20 mm de comprimento (Praça, 2006). O período pupal é, inversamente, proporcional à temperatura, com valores de 22,2, 10,0, 9,5 e 6,9 dias a 20, 25, 30 e 35°C de temperatura em folhas de soja (Fugi, 2003).

O controle de pragas com bioinseticidas de origem vegetal foi uma das primeiras formas para regular populações de insetos a mais de três milênios, na China, Egito, Grécia e Índia (Wan et al., 1996). Com o advento dos pesticidas organossintéticos, entre 1930 e 1950, esses passaram a ser empregados na agricultura, com menor custo, fácil manejo e alta eficiência contra pragas. Entretanto, a utilização intensiva desses pesticidas tem provocado problemas, como intoxicações aguda e crônicas dos aplicadores e consumidores, contaminação de águas subterrâneas, mortalidade de peixes, pássaros, entomofauna benéfica, ressurgimento de novas pragas e intoxicações crônicas e agudas de trabalhadores e consumidores (Isman, 2006; Almeida et al., 2008; Vianna et al., 2009).

O nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) e nativo da Índia é difundido em países da Ásia, África, América do Sul e Austrália (Srivastava et al., 1997) e se destaca entre as espécies de plantas com maior potencial para a produção de bioinseticidas no mundo. Essa planta tem boa adaptação em locais com pH do solo de 5,0 a 7,0, precipitação anual de 400 a 800 mm e temperatura entre 21 e 32°C, podendo tolerar secas severas, solos pobres e salinos. No entanto, não tolera temperaturas mínimas inferiores a 14°C e geadas (Schmutter, 1990).

A azadiractina, um tetranotriterpenóide, é o principal composto dessa planta com ação em mais de 400 espécies de pragas no mundo (Nathan et al., 2005; Isman, 2006). Esse composto é sintetizado principalmente nos frutos de *A. indica*, na proporção de 10g/kg de amêndoas, dependendo de fatores ambientais, genéticos e dos processos de extração (Schmutterer, 1990). Esse aleloquímico afeta a sobrevivência, causa repelência e deterrência alimentar, regula o crescimento e reduz a fertilidade de fêmeas (Mordue e Nisbet, 2000; Bruce et al., 2004; Isman, 2006), causa anormalidades anatômicas e provoca efeitos histopatológicos detrimen-

tecidos celulares de insetos, como glândulas produtoras de neurohormônios (Sayah, 2002), tecidos reprodutivos (Sayah et al., 1996; Lucatoni, 2006) e células epiteliais do intestino (Nogueira et al., 1997; Ndione et al., 2007). Além disso, afeta o metabolismo de proteínas em insetos (Huang et al., 2004; Huang et al., 2007; Yasmin et al., 2008).

Insetos da ordem Lepidoptera são mais sensíveis aos efeitos da azadiractina (Koul et al., 2003). Lagartas de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) alimentadas por 24 horas com folhas de *Cedrela odorata*, tratadas com diferentes dosagens de óleo de sementes de *A. indica*, apresentaram mortalidade crescente com o aumento da dosagem (Mancebo et al., 2002). *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) foi controlada em plantas de repolho, com redução na eclosão de lagartas em plantas tratadas e elevada mortalidade das mesmas após a eclosão (Seljasena e Meadowb, 2006). Fato semelhante foi observado para *Earias vittella* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) (Gajmer et al., 2002). Além dos efeitos letais da azadiractina, doses subletais, também reduzem o consumo alimentar, causam deformidade de pupas, aumentam o ciclo biológico e redução da taxa de crescimento relativo em *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) (Martinez e Emden, 2001) e *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) (Rharrabe et al., 2008) e redução da oviposição de *Spodoptera exempta* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (Tanzubil e McCaffery, 1990) após a ingestão de azadiractina por larvas dessas espécies.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial de produtos derivados de *Azadirachta indica* no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Considerando os efeitos letais e subletais desses produtos sobre os

parâmetros biológicos e fisiológicos de *A. gemmatalis*, em laboratório, e sobre a mortalidade e danos de *A. gemmatalis* em plantas de soja, em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida, G.D., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Vicentini, V.B.; Holtz, A.M., Serrão, J.E. 2008. Calcium silicate and organic mineral fertilizer applications reduce phytophagy by *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) on eggplants (*Solanum melongena* L.). **Interciencia** 33: 835-838.
2. Andrade, F.G., Negreiro, M.C.C., Falleiros, Â.M.F. 2004. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arquivos do Instituto Biológico** 71: 391-398.
3. Bruce, Y.A., Gounou, S., Chabi-Olaye, A., Smith, H., Schulthess, F. 2004. The effect of nim (*Azadirachta indica* A. Juss) oil on oviposition, development and reproductive potentials of *Sesamia calamitis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) and *Eldana saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Agricultural and Forest Entomology** 6: 223-232.
4. Fugi, C.G.Q. 2003. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos. Dissertação (mestrado) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP. 59 p.
5. Fugi, C.G.Q., Lourenção, A.L., Parra, J.R.P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola** 62: 31-35.

6. Gajmer, T., Singh, R., Saini, R.K., Kalidhar, S.B. 2002. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach* L) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology** 126: 238-243.
7. Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p.
8. Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69: 487-488.
9. Greene, G.L., Reid, J.C., Blount, V.N., Riddle, T.C. 1973. Mating and oviposition of the velvetbean caterpillar in soybeans. **Environmental Entomology** 2: 1113-1115.
10. Homrich, M.S., Passaglia, L.M.P., Pereira, J.F., Bertagnolli, P.F., Pasquali, G., Zaidi, M.A., Altosaar, I., Bodanese-Zanettini, M.H. 2008. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill., Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology** 31: 522-531.
11. Huang, Z., Shi, P., Chen, C., Du, J. 2004. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 80: 85-93.

12. Huang, Z., Shi, P., Chen, C., Du, J. 2007. Effects of azadirachtin on hemolymph protein expression in *Ostrina furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Entomological Society of America** 100: 245-250.
13. Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45–66.
14. Koul, O.K., Multani, J.S., Singh, G., Daniewski, W.M., Berlonzek, S. 2003. 6 β -Hydroxygedunin from *Azadirachta indica*. Its potentiation effects with some non-azadirachtin limonoids in neem against lepidopteran larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 2937-2942.
15. Lucatoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Esposito, F., Lupetti, P., Habluetzel, A. 2006. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensis* Liston (Diptera: Culicidae). **Tissue and Cell** 38: 361-371.
16. Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A., Salazar, R. 2002. Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. **Crop Protection** 21: 107-112.
17. Martinez, S.S., Van Emden, H.F. 1999. Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research** 89: 65-71.
18. Mordue, A.J.L., Nisbet, A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil** 29: 615-632.

19. Nascimento, I.R., Murata, A.T., Bortoli, S.A., Lopes, L.M.X. 2003. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. **Pest Management Science** 60: 413-416.
20. Nathan, S.S., Kalaivani, K., Murugan, K., Chung, P.G., 2005. The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaffolder. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 81: 113-122.
21. Ndione, R.D., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A., Afoutou, J.M. 2007. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. **African Journal of Biotechnology** 6: 2846-2854.
22. Nogueira, N.F., Gonzáles, M., Garcia, E.M., Souza, W. 1997. Effects of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology** 69: 58–63.
23. Panizzi, A.R., Oliveira, L.J., Silva, J.J. 2004. Survivorship, larval development and pupal weight of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on potential leguminous host plants. **Neotropical Entomology** 33: 563-567.
24. Praça, L.B., Neto, S.P.S., Monnerat, R.G. 2006. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, **1818 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 196, 18p.).
25. Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., Sayah, F. 2008. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research** 44: 290-294.

26. Sayah, F. 2002. Ultrastructural changes in the corpus allatum after azadirachtin and 20-hydroxyecdysone treatment in adults females of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue and Cell** 34: 53-62.
27. Sayah, F., Fayet, C., Idaomar, M., Karlinsky, A. 1996. Effects of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue and Cell** 28: 741-749.
28. Schmidt, F.G.V., Monnerat, R., Borges, M., Carvalho, R. 2001. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).
29. Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology** 35: 271-127.
30. Seljasen, R., Meadow, R. 2006. Effects of neem on oviposition and egg and larval development of *Mamestra brassicae* L: Dose response, residual activity, repellent effect and systemic activity in cabbage plants. **Crop Protection** 25: 338–345.
31. Srivastava, M., Paul, A.V.N., Rengasamy, S., Kumar, J., Pamar, B.S. 1997. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds kernel extracts on the larval parasitoid *Bracon brevicornis* Wesm. (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Applied Entomology** 121: 51-57.
32. Turnipseed, S.G., Kogan, M. 1976. Soybean entomology. **Annual Review Entomology** 24: 247-282.
33. Tanzubil, P.B., Mccaffery, A.R. 1990. Effects of azadirachtin on reproduction in the african armyworm (*Spodoptera exempta*). **Entomologia Experimentalis et Applicata** 57: 115-121.

34. Vianna, U.R., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Lima, E.R., Brunner, J., Pereira, F.F., Serrão, J.E. 2009. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effects on descendent generation. **Ecotoxicology** 18: 180-186.
35. Wan M.T., Watts, R.G., Isman, M.B., Strub, R. 1996. An evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific Northwest salmon of azadirachtin, neem extract and neem-based products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 56: 432–39.
36. Yasmin, N., Khan, F., Channa, Z.A. 2008. Effects of a neem sample on protein patterns of *Bactrocera cucurbitae*. **Turkish Journal of Zoology** 32: 1-5.

Citotoxicidade no tecido epitelial e redução da síntese de proteínas no corpo gorduroso de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) por produtos derivados de *Azadirachta indica*

Resumo

Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) apresenta grande potencial inseticida, principalmente sobre lepidópteros. *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma importante praga da cultura da soja. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de produtos derivados de *A. indica* sobre os parâmetros biológicos e fisiológicos de *A. gemmatalis* em laboratório. Lagartas de terceiro estágio de *A. gemmatalis* foram alimentadas, durante quatro dias, com dieta artificial contendo diferentes dosagens de extrato de sementes de *A. indica* e do óleo comercial de nim, Azamax[®]. A mortalidade larval, o consumo alimentar, produção de fezes, ganho de peso vivo, anomalias na fase pupal e os efeitos de doses não letais no peso de pupas e capacidade reprodutiva das mariposas emergidas foram avaliados. Cortes histopatológicos do intestino médio e corpo gorduroso de lagartas de *A. gemmatalis*, após alimentação em dieta artificial contendo doses dos produtos derivados de nim que causaram 100% de mortalidade foram feitos. A expressão de proteínas na hemolinfa e corpo gorduroso de lagartas de *A. gemmatalis* quatro dias após a alimentação, foram analisadas por eletroforese. Os parâmetros biológicos foram negativamente afetados após a ingestão da dieta com os bioinseticidas derivados de

nim. Doses maiores que 500 ppm de extrato de sementes de nim e 200 ppm de Azamax causaram 100% de mortalidade nas lagartas de *A. gemmatalis*. Valores menos que esses provocaram deterrência alimentar, deformidade de pupas e redução na capacidade reprodutiva da próxima geração desse inseto. As células do epitélio do intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* apresentaram inchaço, descolamento da membrana basal e completa disruptura após a exposição aos produtos derivados de nim. No corpo gorduroso, não foi observado citotoxicidade, mas redução da quantidade do tecido de reserva, lipídeos e proteínas, no entanto, síntese de proteínas no corpo gorduroso das lagartas de *A. gemmatalis* foi reduzida. Produtos derivados de *A. indica* afetaram negativamente os parâmetros biológicos e fisiológicos de *A. gemmatalis*, avaliados.

Palavras-chaves: Azadiractina, alterações morfológicas, intestino médio, corpo gorduroso, expressão de proteínas.

1. Introdução

A lagarta desfolhadora da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é a praga desfolhadora mais importante da cultura da soja nas Américas do Sul e Norte (Nascimento et al., 2003). Infestações desse inseto podem comprometer a produção da soja (Fugi et al., 2005).

O controle químico (Silva et al., 2003), biológico, com inimigos naturais (Foerster e Butnariu, 2004), patógenos, como *Bacillus thuringiensis* e *Baculovirus anticarsia* (Miklos et al., 2007; Cordeiro et al., 2008), além de plantas geneticamente modificadas expressando toxinas (Homrich et al., 2008), podem ser utilizados no controle da lagarta desfolhadora da soja. O manejo integrado de pragas deve incluir mais de estratégia de controle, para a sustentabilidade do agroecossistema agrícola. A adoção de, apenas, uma estratégia pode ocasionar ressurgência de pragas, surtos de pragas secundárias, seleção de linhagens resistentes de insetos, alimento com altos níveis de resíduos tóxicos, contaminação ambiental e intoxicação de pessoas e animais (Almeida et al, 2008; Vianna et al., 2009).

Azadirachta indica é a planta com maior potencial inseticidas do mundo (Caboni et al., 2002; Isman, 2006) por apresentar efeitos negativos insetos praga (Nathan et al., 2005ab) e ácaros (Mourão et al., 2004), sendo a ordem Lepidoptera mais sensíveis aos efeitos dessa planta (Calvo e Molina, 2003; Kuol et al., 2003).

A azadiractina, um tetranoterpenoide, sintetizada principalmente nos frutos de *A. indica*, é principal composto responsável pela ação inseticida dessa planta (Sharma et al., 2003; Nathan et al., 2008a). Essa substância inibe o crescimento de insetos, afeta a sobrevivência, causa repelência e deterrência alimentar, reduz a

fertilidade de fêmeas e causa anormalidades anatômicas em diversas espécies de insetos (Martinez e Emdein, 1999; Ismam, 2006).

Os efeitos reguladores de crescimento da azadiractina sobre insetos se manifestam em anormalidades no crescimento e mudas com distúrbios no sistema neuroendócrino como o bloqueio da liberação de peptídeos neurosecretores, que regulam a síntese e liberação do ecdisônio e hormônio juvenil (Mordue et al., 1998). A azadiractina tem efeitos citotóxicos diretos sobre células das glândulas produtoras de hormônios (Sayah et al., 2002), tecidos reprodutivos (Sayah et al., 1996; Nathan et al., 2008b) e células epiteliais do intestino (Nasiruddin e Mordue, 1993; Nogueira et al., 1997; Ndione et al., 2007). Além disso, afeta o metabolismo de proteínas (Huang et al., 2004, Huang et al., 2007, Yasmin et al., 2008) e a síntese de enzimas em insetos (Lowery e Smirle, 2000; Nathan et al., 2006a; Rharrabe et al., 2008).

O efeito de produtos derivados de *A. indica* têm sido pouco estudados em lagartas desfolhadoras da soja, mas, essa praga é suscetível a outros inseticidas sintetizados por plantas, como diterpenos e ligninas originários de *Aristolochia malmeana* (Nascimento et al., 2003; Messiano et al., 2008) e isobutil amidas isolados de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) (Navickiene et al., 2007).

Dessa forma, o objetivo foi avaliar os efeitos de doses de produtos derivados de *A. indica* sobre parâmetros biológicos e fisiológicos de *A. gemmatalis* em laboratório.

2. Material e Métodos

2.1 Criação de *Anticarsia gemmatalis*

A lagarta desfolhadora de soja, *A. gemmatalis*, foi criada no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária

(BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Adultos dessa espécie foram acondicionados em gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm) com as laterais teladas com náilon e tampa de vidro, recebendo solução nutritiva embebida em algodão (Tabela 1). As posturas de *A. gemmatalis*, com 48 horas, foram coletadas em folhas de papel branco e colocados em potes plásticos (15cm de diâmetro e 10cm de altura). Lagartas de *A. gemmatalis*, após a eclosão, foram alimentadas com dieta artificial (Tabela 2) (Greene et al., 1976) em condições controladas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

2.2 Preparação do extrato etanólico

Frutos senescentes de *A. indica* foram coletados em uma propriedade rural no município de Barra de São Francisco, Estado do Espírito Santo, Brasil, despulpados em água corrente, colocados à sombra para retirada do excesso de água e armazenados a -2°C . A preparação do extrato etanólico de sementes de *A. indica* foi realizada no Laboratório de Biofarmácios do Departamento de Bioquímica da UFV, da seguinte forma: 500g de amêndoas de nim descongeladas foram trituradas em 1,5L de etanol. A solução etanólica foi filtrada com papel filtro e o solvente removido por evaporação à vácuo com rotavaporizador ($50 \pm 5^\circ\text{C}$), cinco dias após o início do processo de extração. Esse processo foi repetido por três vezes, obtendo-se 90ml de um extrato escuro semi-líquido, em temperaturas maiores que 5°C , para preparação da solução padrão (Nathan, 2006).

2.3 Preparação da solução padrão

Dez mililitros (ml) do extrato semi-líquido de *A. indica* foram diluídos em 100 ml de etanol (30%) e agitado por 30 minutos até a completa homogeneização, obtendo uma solução a 10% (v/v) para a obtenção das concentrações (Nathan, 2006).

2.4 Quantificação de azadiractina no extrato

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC), detector ultra violeta (UV) com comprimento de ondas de 217 nm, no Laboratório de Química do Departamento de Química da UFV, de acordo com a metodologia de Schaaf et al. (2000). Uma coluna em fase reversa (C18), com fluxo de 0,6 ml/minuto, pressão na coluna de 97 Kgf foi utilizada. O solvente utilizado foi composto por metanol e água (1:1). Injetou-se 20 µl de uma solução contendo 20% de extrato de sementes de *A. indica*.

A presença de azadiractina no extrato bruto de sementes de nim foi constatada com 14,132 minutos em HPLC, seguindo o mesmo padrão da azadiractina pura (SigmaAldrich-Alemanha). Obteve-se uma relação de 12,18 µg de azadiractina por µl de solução contendo 20% de extrato bruto de sementes de *A. indica*. Assim, o extrato bruto de nim contém em média 0,061g de azadiractina por ml, proporcionando uma solução padrão com 6,1gL⁻¹ de azadiractina.

2.5 Efeitos no desenvolvimento larval e pupal de *Anticarsia gemmatalis*

As avaliações dos efeitos dos derivados de *A. indica*, na fase larval e pupal de *A. gemmatalis*, foram adaptadas de Schmidt et al. (1997), Nathan e Sheoon (2006) e Santiago et al. (2008). Vinte lagartas de terceiro estágio desses insetos, com, aproximadamente, seis dias de idade e peso corporal de 60 a 80 mg, ficaram sem alimento por quatro horas e individualizados em placas de Petri (9,5 cm de diâmetro). Diariamente, um pedaço de dieta, 1,2 ± 0,3 g, com 0, 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 ppm do extrato etanólico de sementes de *A. indica* (0,061 g de azadiractina por ml) e com 0, 50, 100 e 200 ppm do óleo comercial de *A. indica*, Azamax[®] (0,012g de azadiractina por ml) foi fornecidos às lagartas, durante quatro dias. Após esse período, as lagartas de *A. gemmatalis* receberam dieta sem

bioinseticidas. Esse estudo foi conduzido em câmara climatizada com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

A mortalidade, consumo alimentar, produção de fezes, ganho de peso vivo de lagartas de *A. gemmatalis* foram avaliados da seguinte forma:

Consumo alimentar (CA):

$$\text{CA} = (\text{Pai} - \text{Psa}) + \text{Pag}$$

Onde: **Pai**: peso do alimento fornecido inicialmente

Psa: peso da sobra de alimento

Pag: peso da massa de água perdida por grama de dieta

A produção de fezes foi obtida pelo peso direto das fezes produzidas. O consumo alimentar e a produção de fezes de *A. gemmatalis* foram avaliados, apenas, durante o período de exposição das lagartas à dieta artificial com os produtos derivados de *A. indica*.

O ganho de peso vivo da fase larval (GPD):

$$\text{GPD} = (\text{Pf} - \text{Pi})/\text{D}$$

Onde: **Pf**: peso vivo final do último estágio larval

Pi: peso vivo inicial no terceiro estágio larval

D: período em dias entre o terceiro e o último estágio larval

O peso e a deformação de pupas foram obtidos 24 horas após o início desse estágio.

2.6 Determinação dos parâmetros reprodutivos

Vinte casais adultos emergidos a partir de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas, por quatro dias, com dieta artificial em diferentes concentrações (0, 10, 50, 100 ppm) do extrato etanólico de semente de nim, foram individualizados em tubos de PVC com 25 cm de diâmetro, para se determinar o número de ovos por

fêmea desse inseto (Tanzubil et al., 1990). A contagem do número de ovos por fêmea foi feita, entre o terceiro e sexto dia após a emergência desse inseto, por ser o pico de postura da *A. gemmatalis* (Greene et al., 1973). Esse teste foi realizado apenas com extrato de nim, por não ter havido emergência de adultos nos tratamentos com óleo comercial, Azamax.

2.7 Histologia

Lagartas de terceiro estágio de *A. gemmatalis* foram alimentadas com dieta artificial nas concentrações dos produtos derivados de nim, que causaram 100% de mortalidade, e após dois, três e quatro dias, três lagartas por concentração foram imersas em solução de Zamboni por 24 horas (Stefanini et al., 1976). O intestino médio e o corpo gorduroso das lagartas de *A. gemmatalis* foram retirados em solução salina (125µM), desidratados em série alcoólica e incluídos em historesina. Secções do intestino médio e corpo gorduroso com 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas e fotografadas em microscópio óptico (Sarmiento et al., 2004).

2.8 Análise de Proteína

A análise da expressão de proteínas na hemolinfa e no corpo gorduroso de lagartas de *A. gemmatalis* foi adaptada de Huang et al. (2004), Huang et al. (2007). Lagartas de terceiro estágio de *A. gemmatalis* foram alimentadas com dieta artificial, com 500 ou 100 ppm do extrato etanólico de *A. indica* e 50 ppm do óleo comercial de nim, Azamax, durante quatro dias. Amostras da hemolinfa e do corpo gorduroso de quarenta lagartas de *A. gemmatalis* por concentração foram coletados e colocadas em solução anticoagulante e congeladas a -20°C. Essas amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para dosagens de proteína pelo método de Bradford (1976) com albumina bovina como padrão. O

gel de poliacrilamida, com amostras de proteína da hemolinfa e corpo gorduroso foi corrido, em voltagem constante (120 V) (Laemmli, 1971). O gel foi fixado e corado por 15 minutos com 0,2% de Azul de Comassie R 250 e lavado com ácido acético (7%) por quatro horas.

2.9 Análise estatística

A mortalidade larval, a deformidade de pupas e a emergência de adultos foram submetidas à análise de regressão de logit. O consumo alimentar, produção de fezes, ganho de peso vivo, peso de pupas e número de ovos por fêmea foram analisados por modelos de regressão.

3. Resultados

A mortalidade larval de *A. gemmatalis* aumentou, proporcionalmente, com as concentrações do extrato etanólico de sementes de *A. indica* e do óleo comercial Azamax na dieta artificial. Dosagens maiores que 500 ppm de extrato de *A. indica* e 200 ppm de Azamax provocaram 100% de mortalidade nas lagartas de *A. gemmatalis* (Figura 1). A mortalidade larval de *A. gemmatalis*, aumentou independente da dose, após a ingestão de dieta artificial contendo produtos derivados de *A. indica*, porém após oito dias do início da exposição não foi observado aumento no número de insetos mortos (Figura 2).

O consumo alimentar das lagartas de *A. gemmatalis* foi reduzida com todas as doses do extrato etanólico e óleo comercial de sementes de nim, Azamax. Cada ppm de extrato de sementes nim e Azamax adicionada à dieta artificial, reduziu o consumo alimentar das lagartas de *A. gemmatalis* em uma taxa de 0,12% e 0,33% respectivamente (Figura 3).

A produção de fezes de lagartas de *A. gemmatalis* teve redução drástica durante os quatro dias de observação (Figura 4), mas essa redução foi maior que a redução do consumo alimentar. Cada ppm de extrato de nim adicionado à dieta reduziu em 0,12% o consumo alimentar (Figura 3A) e em 0,23% as fezes produzidas (Figura 4A). Lagartas alimentadas com dieta o óleo comercial de nim, Azamax, apresentaram resultados semelhantes, no entanto, com dosagens menores que a do extrato de sementes de nim (Figuras 3B e 4B).

O ganho de peso vivo médio diário, durante a fase larval de *A. gemmatalis* foi drasticamente reduzido com doses letais e subletais de bioinseticidas à base de azadiractina (Figura 5). Lagartas alimentadas com dieta contendo extrato de semente de *A. indica* apresentaram redução linear, de 4,6% no ganho de peso vivo por ppm de extrato de nim adicionado à dieta, com valores negativos com 1000 ppm (Figura 5A). Aquelas lagartas alimentadas com dieta artificial com o óleo comercial, Azamax, apresentaram redução exponencial de 1,27% do ganho de peso vivo por ppm óleo de nim, Azamax, adicionado à dieta, mas sem valores negativos (Figura 5B).

As diferentes concentrações do extrato de sementes de *A. indica* reduziram o peso de pupas de *A. gemmatalis*. O peso médio de pupas no controle foi 240 mg, já com a adição do extrato de sementes de nim esse valores decresceram exponencialmente a uma taxa de 3,5% para cada ppm do extrato adicionado à dieta (Figura 6). O número de pupas, no tratamento com o produto comercial Azamax, não foi suficiente para a análise de regressão, mostrando ser necessário se explorar melhor o efeito das doses subletais desse produto.

A alimentação de lagartas de *A. gemmatalis* em dieta contendo doses do extrato de sementes de *A. indica*, menores que o necessário provocar 10% de mortalidade na fase larval, aumentou drasticamente o número de pupas com

deformações (Figuras 7). Lagartas expostas à dieta com 250 ppm de extrato de nim apresentaram 100% de pupas deformadas, com relação inversa, entre a deformação de pupas e a emergência de adultos de *A. gemmatalis*. Pupas deformadas não apresentaram emergência de adultos (Figura 7). As deformidades de pupas de *A. gemmatalis* foram de pequena a intensa má formação na região torácica (Figura 8 B, C, D e E) até a incompleta formação da pupa (Figuras 8 F e G), sendo proporcional ao aumento da dosagem de extrato de sementes de nim.

Mariposas de *A. gemmatalis* apresentaram reduzida capacidade de oviposição após a exposição da fase larval à dose do extrato de sementes de nim. Fêmeas adultas emergidas a partir de dieta controle colocaram em média, 85 ovos durante os três dias de avaliação, mas, cada ppm de extrato de nim adicionado na dieta resultou em redução de 10% a capacidade de oviposição desse inseto, chegando a valores quase nulos com 100 ppm (Figura 9).

Lagartas de *A. gemmatalis*, alimentadas com dieta contendo doses letais de bioinseticidas à base de azadiractina, apresentaram alterações morfológicas no intestino médio, enquanto no controle, as células do epitélio do intestino estavam bem formadas e uniformes com bordas estriadas evidentes (Figura 10 A). As células do epitélio aparecem inchadas e com pequeno descolamento da lâmina basal, dois dias após a ingestão de dieta com extrato de nim (Figura 10 B). Com três dias, há uma completa destruição celular em algumas regiões do epitélio intestinal (Figura 10 C). Após quatro dias, além do descolamento da parede e completa disruptura das células epiteliais, algumas lagartas apresentaram atrofia do intestino, evidenciado pela redução do tamanho do lúmen (Figura 10 D).

O corpo gorduroso de lagartas de *A. gemmatalis*, no controle, apresentou grandes glóbulos de lipídios e proteína, pigmentos azuis (Figura 11 A). As células do

corpo gorduroso das lagartas alimentadas com bioinseticidas à base de azadiractina apresentaram poucos glóbulos de lipídeos e ausência de acúmulo de proteína (Figura 11 B e C).

A alimentação com dieta contendo doses do extrato de nim e Azamx não afetou, após quatro dias, o padrão da expressão de proteínas na hemolinfa de lagartas de *A. gemmatalis* (Figura 12 B, C, D, E). No entanto, a expressão de proteínas no corpo gorduroso, local de síntese da maior parte das proteínas em lepidópteros, foi inibida com 500 ppm do extrato de sementes de nim (Figura 12 G), já com 100 ppm do extrato de sementes e 50 ppm de óleo comercial foram semelhantes ao padrão de proteínas nas lagartas controle (Figura 12 H e I).

4. Discussão

A eficiência dos produtos derivados de *A. indica* no controle da lagarta desfolhadora da soja, deve-se aos seus efeitos antialimentares e tóxicos durante diferentes fases do ciclo biológico dessa praga. Esses efeitos foram, elevada mortalidade larval e pupal, redução do consumo alimentar, ganho de peso larval e pupal, deformação em pupas e menor capacidade reprodutiva. Isto é semelhante ao observado para *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) (Martinez e Emden, 2001), *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae) (Huang et al., 2004), *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae) (Nathan et al., 2006b), *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) (Rharrabe et al., 2008), *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Kumar et al., 2008).

A ação antialimentar da azadiractina e outros limonoides de *A. indica*, presentes no extrato etanólico e no óleo comercial de nim, Azamax, pode ser a causa da redução do consumo alimentar e da produção de fezes e ganho de peso vivo de

lagartas de *A. gemmatalis*. A adição de 6 β -hidroxigedunin, gedunin, nimbinene, salanina e azadiractina, isoladamente, causou deterrência alimentar e reduziu os índices nutricionais de *H. armigera* e *S. litura*, porém a azadiractina foi a substância com maior atividade, em dosagens menores que os outros compostos (Kuol et al., 2003). Assim como constatado em lagartas de *C. medinalis*, que foram afetadas negativamente por outros compostos sintetizados por *A. indica*, apenas em dosagens superiores à da azadiractina (Natahan et al., 2006b). Os efeitos observados nas lagartas de *A. gemmatalis* podem ser atribuídos, principalmente, à presença de azadiractina nos produtos utilizados, pois esses outros limonóides são efetivos apenas em dosagens superiores à azadiractina, no entanto, as quantidades dessas substâncias nos bioinseticidas utilizados, são menores que a de azadiractina, já que azadiractina é o composto sintetizado em maior quantidade pelas plantas de *A. indica* (Caboni et al., 2002). Esses efeitos antialimentares da azadiractina em insetos podem ser primários, pela ação nos quimiorreceptores alimentares dos insetos, estímulo de células de deterrência alimentar e/ou bloqueio das células estimuladoras de alimentação ou secundários pelos efeitos fisiológicos após a ingestão ou contato com a azadiractina (Mordue e Nisbet, 2000). O desarranjo celular no intestino médio das lagartas de *A. gemmatalis*, indica que a ação antialimentar dos bioinseticidas à base de azadiractina, está relacionada os efeitos fisiológicos após da ingestão desses compostos.

A hipertrofia nas células do intestino médio de *A. gemmatalis*, dois dias após o início da alimentação com dieta contendo produtos derivados de *A. indica*, descolou as células do epitélio da parede muscular e rompeu a membrana peritrófica, o que reduz a capacidade digestiva em insetos (Barbeta et al., 2008). Essa hipertrofia pode ser devido à vacuolização do citoplasma, fragmentação do retículo

endoplasmático, disruptura das microvilosidades e da membrana plasmática (Rharrabe et al., 2007), como observado em células do intestino de *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae) e *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acrididae) após injeção de azadiractina (Nasiruddin e Mordue, 1993), em *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) após ingestão de sangue com doses de azadiractina (Nogueira et al., 1997) e *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) após exposição em água tratada com óleos de *A. indica* (Ndione et al., 2007). O mecanismo de ação de compostos derivados de *A. indica* nas células intestinais de insetos não está, ainda, completamente entendido. A azadiractina foi responsável pela desestruturação celular do intestino de *R. prolixus*, com possíveis alterações no transporte iônico, devido à drástica redução das dobras da membrana basal e desaparecimento da mitocôndria basal nas células intestinais desse inseto (Nogueira et al., 1997). Esta hipótese pode ser suportada por observações de que a azadiractina e outros nim limonoides reduzem a atividade de enzimas transportadora do intestino de insetos, como a ATPase (adenosina trifosfato), que foi 60% menor após a ingestão de dieta artificial contendo 1 ppm de azadiractina pura, em lagartas de *S. litura* (Nathan et al., 2005a) e *C. medinalis* (Nathan et al., 2005b). A mesma tendência de redução da atividade dessa enzima em lagartas de *C. medinalis* foi observada com 1 ppm de salannina, deacetylgeduni, gedunin, 17-hidroxiiazadiradione e deacetilnimbina, porém, essa redução foi menos acentuada, que com a azadiractina, na mesma concentração. A ATPase utiliza a energia liberada pela hidrólise de uma molécula de ATP para conduzir o entrada de dois íons de K^+ e, concomitantemente, a saída de três íons de Na^+ para o citosol da célula. Essa bomba é o maior contribuinte pelo diferencial de concentração de Na^+ e K^+ nas células e tem a função principal de manter o volume celular pela entrada de outros solutos (McMullen e Storey, 2008).

O gradiente de potencial entre membranas é dissipado, quando ocorre alguma limitação nessa bomba, o que conduz a uma série de eventos que podem resultar na morte da célula (Sanchez e O'Donnell, 2007). Assim, a desestruturação celular no intestino de *A. gemmatalis* pode estar relacionada ao aumento de Na⁺ no interior das células, o que promove a entrada excessiva de água e causa a morte celular. No entanto, a azadiractina pura não apresentou citotoxicidade, *in vitro*, à células humanas (143B.TK) e de insetos (Sf9), mas sim, outra substância sintetizada por *A. indica*, o nimbolide e epoxyazadiradione, que causaram desestruturação na membrana plasmática e inchaço das células (Cohen et al., 1996). A exposição de culturas de células (3T6) ao extrato etanólico do óleo de sementes de *A. indica* causou forte redução na viabilidade de células, já apenas a azadiractina pura não causou nenhum efeito sobre essas células, nesse mesmo trabalho foi verificado que frações não identificadas do extrato de nim induziram à apoptose celular (Ilio et al., 2006). Como o extrato etanólico de sementes de *A. indica* e o óleo comercial de nim, utilizados possuem outros limonóides, é possível que os efeitos citotóxicos no tecido epitelial seja decorrente da ação conjunta de todos os compostos presentes nesses bioinseticidas. Assim, é necessário mais estudos para entender a ação de produtos derivado de *A. indica*, em nível celular, afim de se conhecer qual composto é eficiente no controle de pragas e que possua menor impacto sobre células de mamíferos.

Os efeitos citotóxicos no epitélio do intestino das lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial contendo bioinseticidas à base de azadiractina podem ser responsáveis pela redução do ganho de peso vivo de larvas e pupas desse inseto. Lagartas de *A. gemmatalis* apresentaram redução na quantidade gotas de lipídeos e grânulos de proteínas do corpo gorduroso, esse efeito, pode ser decorrente da

redução na capacidade dessas lagartas converterem o alimento ingerido em tecido de reserva do corpo gorduroso. Esse processo é devido a ação de enzimas digestivas, que são secretadas nas células epiteliais do intestino de insetos (Nathan et al., 2008b), assim, a disruptura dessas células pode alterar a capacidade de síntese e liberação dessas enzimas (Rharrabe et al., 2007). Essa hipótese é sustentada pelas observações de que a azadiractina reduziu a atividade de enzimas digestivas de insetos da ordem Lepidoptera, como a inibição de tripsina no intestino médio de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) (Timmins e Reynolds, 1992), redução da atividade de enzimas digestivas em *S. litura* e *C. medinalis* (Nathan et al., 2005a,b) e atividade da α -amilase em lagartas de *P. interpunctella* (Rharrabe et al., 2008).

As alterações no corpo gorduroso das lagartas de *A. gemmatalis* expostas ao bioinseticidas à base de azadiractina, podem ser devido aos efeitos antialimentares da *A. indica* sobre insetos. Ao contrário das células epiteliais do intestino, o corpo gorduroso não apresentou desestruturação celular, mas, apenas redução na quantidade de lipídeos e proteínas. No entanto, a alimentação de lagartas de *A. gemmatalis*, por quatro dias, em dieta com 500 ppm de extrato de sementes de nim, reduziu a expressão de proteínas no corpo gorduroso dessas lagartas. A capacidade da azadiractina de afetar a expressão de proteínas em insetos, após a ingestão ou contato, foi observada em *S. litura* (Huang et al., 2004), *Ostrinia furnacalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) (Huang et al., 2007) e *Bactrocera cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) (Yasmim et al., 2008). Isto leva à especulação de o possível sítio de ação da azadiractina seja o corpo gorduroso, por ser o principal órgão de síntese e armazenamento de proteínas na fase jovem de Lepidoptera (Salvador e Cônsoli, 2008). No entanto, a redução na capacidade de síntese de proteína do corpo

gorduroso de lagartas de *A. gemmatalis* pode ser decorrente da redução na quantidade de substâncias de reserva, devido aos efeitos antialimentares provocadas pela azadiractina, pois nenhum efeito citotóxico dos produtos derivados de nim foi observado sobre as células do corpo gorduroso das lagartas de *A. gemmatalis*.

A alteração na expressão de proteínas do corpo gorduroso de *A. gemmatalis* pode ter causado alterações na metamorfose de lagartas e pupas e redução na oviposição de mariposas de *A. gemmatalis* alimentadas com os bioinseticidas à base de azadiractina. Proteínas de reservas são sintetizadas na fase de alimentação de lepidópteros e são utilizadas como precursoras da metamorfose, produção de ovos e fonte de nutrientes durante a vida adulta desses insetos (Canavoso et al., 2001). Assim, insetos tratados com bioinseticida à base de azadiractina que escaparam dos efeitos letais dessa substância e emergiram como adultos, frequentemente, apresentam redução na capacidade reprodutiva (Huang et al., 2004). Essa hipótese foi constatada, pela redução drástica no número de ovos produzidos pelas fêmeas de *A. gemmatalis* que emergiram a partir de doses subletais do extrato de *A. indica*. A aplicação tópica de azadiractina em lagartas de *Spodoptera exempta* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) afetou a ovogênese e a maturação reprodutiva em fêmeas adultas dessa espécie, devido à redução da síntese de proteínas no corpo gorduroso na fase adulta (Tanzubi e McCaffery, 1990). A injeção de azadiractina em fêmeas adultas de *Labidura riparia* Pallas (Dermaptera: Labiduridae) inibiu a síntese de vitelogenina no corpo gorduroso (Sayah et al., 1996). Contudo, a azadiractina apresenta efeitos citotóxicos no tecido do aparelho reprodutor de *L. riparia* (Sayah et al., 1998), *Anopheles stephensis* Liston (Díptera: Culicidae) (Lucatoni et al., 2006), o que reduz a capacidade reprodutiva de insetos, no entanto, esses efeitos são observados apenas quando fêmeas adultas são expostas à essa substância,

evidenciado, que a redução na oviposição de *A. gemmatalis* pode ser devido à redução dos tecidos de reserva no corpo gorduroso desses insetos.

Produtos derivados de *A. indica* causaram deformidades em pupas de *A. gemmatalis*, o que impediu que esses insetos atingissem a fase adulta. Essas deformidades foram mais intensas com dosagem maiores dos desse produtos. Efeitos semelhantes foram observados em lagartas de *S. litoralis* alimentadas em dieta artificial contendo 0,1, 0,5 e 1,0 ppm de azadiractina, sendo a quantidade de insetos deformados proporcional ao aumento da dosagens, chegando a 100% de pupas deformadas com 1 ppm de azadiractina (Martinez e Emden, 2001). Ninfas de *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera: Delphacidae) alimentadas com folhas de arroz tratadas com extrato etanólico de sementes de *A. indica* ou azadiractina pura, provocou anomalias nas fases jovem e adulta (Nathan et al., 2007). As deformidades e a incapacidade de muda podem ser atribuídas à ação reguladora de crescimento da azadiractina em insetos (Nathan et al., 2006b), que ocorre devido à disrupções na síntese e liberação de hormônio de muda (Mordue e Nisbet, 2000). Essa ação reguladora do crescimento pode estar associada a mortalidade larval e pupal de *A. gemmatalis*, devido à falhas na muda, pois o aumento drástico da mortalidade a partir do quarto dia de início da alimentação das lagartas com dieta contendo os bioinseticidas coincide como o período de muda da fase larval para pupal. Essa metamorfose depende de uma grande quantidade de hormônios de muda, por ser uma transformação drástica na morfologia dos insetos (Adel e Sehnal, 2000). Essa capacidade bloqueadora da síntese de hormônios de muda pode ser atribuída aos efeitos citotóxicos da azadiractina sobre as células secretoras de neurohormônios, inibindo a produção do ecdisônio (Sayah et al., 2002). Esses efeitos citotóxicos sobre diversos tecidos celulares, são atribuídos à capacidade da azadiractina se ligar a

β -actina, causando a má formação das estruturas das células (Kumar et al., 2007). Esse composto apresenta elevada afinidade com a β -actina, que o é o principal constituinte do citoesqueleto de insetos e baixa afinidade com a α -actina, principal constituinte do citoesqueleto de mamíferos (Anuradha et al., 2007).

A quebra do ciclo biológico de *A. gemmatalis* em diferentes fases, pelos bioinseticidas à base de azadiractina, contribui para a redução da quantidade de princípio ativo que deve ser aplicado, diminuindo a pressão de seleção desses inseticidas sobre essa praga. Pois, lagartas de *A. gemmatalis* que se alimentaram com dieta contendo 100 ppm de extrato de nim apresentaram mortalidade inferior a 20%, mas o consumo alimentar foi 40% menor que as controle, além da elevada taxa de pupas com deformidade, quer reduziu o número de adultos emergidos. Além disso, os adultos de *A. gemmatalis* emergidos desse tratamento apresentaram redução no número de ovos por fêmea, fato que limita o crescimento populacional no próximo ciclo dessa praga. Assim, a utilização de bioinseticidas à base de azadiractina torna-se importante no manejo da *A. gemmatalis* devido aos efeitos letais e subletais, como observado em lagartas de *S. litorallis* após alimentação em dieta artificial contendo doses subletais de azadiractina (Martinez e Emden, 1999, 2001).

O extrato etanólico de sementes de *A. indica* e o óleo comercial de nim, Azamax[®], foram eficientes no controle das lagartas desfolhadora da soja, no entanto, o Azamax foi mais efetivo com dosagens menores que o extrato de nim. Isto pode ser devido ao processo de extração, que no caso do Azamax é com solvente e apolar, que extrai uma maior quantidade de compostos das sementes de *A. indica* (Jaglan et al., 1997). Esse produto também é um concentrado emulsionável disperso em óleo de gergelim. Isto aumenta a capacidade de dispersão e a aderência desse produto na dieta artificial, além de aumentar a penetração no tecido dos insetos, como

constatado para o óleo comercial de nim, Margosan-O[®], que foi 30% menos efetivo no controle de *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphidoidea) quando desprovido de óleo (Stark e Walter, 1995).

5. Conclusão

O extrato etanólico e o óleo comercial de sementes de *A. indica* causaram mortalidade, reduziram o consumo alimentar e o ganho de peso larval e pupal, inibiram a muda, causaram deformidade em pupas, reduziram a fertilidade de fêmeas, causaram alterações morfológicas nas células do intestino médio e corpo gorduroso e alteraram a síntese de proteínas no corpo gorduroso de lagartas de *A. gemmatalis*.

6. Referências Bibliográficas

1. Adel, M.M., Sehnal, F. 2000. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Physiology** 46: 267-274.
2. Almeida, G.D., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Vicentini, V.B.; Holtz, A.M., Serrão, J.E. 2008. Calcium silicate and organic mineral fertilizer applications reduce phytophagy by *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) on eggplants (*Solanum melongena* L.). **Interciencia** 33: 835-838.
3. Anuradha, A., Annadurai, R., Shashidhara, L.S. 2007. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 37: 627-634.

4. Barbeta, B.L., Marshal, A.T., Gillon, A., Craik, D.J., Marlyn, A.A. 2008. Plant cyclotides disrupt epithelial cell in the midgut of Lepidoptera larvae. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States** 105: 1221-1225.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248–254.
6. Caboni, P., Cabras, M., Angioni, A., Russo, M., Cabras, P. 2002. Persistence of azadiractin residues on olives afeter field treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50: 3491-3494.
7. Calvo, D., Molina, J.M. 2003. Effects of a commercial neem (*Azadirachta indica*) extract on streblote panda larvae. **Phytoparasitica** 31: 365-370.
8. Canavoso, L. E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington J.E., Wells, M.A. 2001. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition** 21: 23-46.
9. Cohen, E., Quistad, G.B., Casida, J.E. 1996. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazariradione and other limonoids from neem insecticide. **Life Science** 58: 1075-1081.
10. Cordeiro, B.A., Tiburcio, V.H.S., Hallwass, M., Paes, H., M.N. Ribeiro, Bao, S.N. 2008. Structural and ultrastructural alterations of malpighian tubules of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology** 98: 7–19.

11. Foerster, L.A., Butnariu, A.R. 2004. Development, reproduction, and longevity of *Telenomus cyamophylax*, egg parasitoid of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, in relation to temperature. **Biological Control** 29: 1–4.
12. Fugì, C.G.Q., Lourenção, A.L., Parra, J.R.P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola** 62: 31-35.
13. Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69: 487-488.
14. Greene, G.L., Reid, J.C., Blount, V.N., Riddle, T.C. 1973. Mating and oviposition of the velvetbean caterpillar in soybeans. **Environmental Entomology** 2: 1113-1115.
15. Ilio, V., Pasquariello, N., van der Esch, A.S., Cristofaro, M., Scarsella, G., Risuleo, G. 2006. Cytotoxic and antiproliferative effects induced by a non terpenoid polar extract of *A. indica* seeds on 3T6 murine fibroblasts in culture. **Molecular and Cellular Biochemistry** 287: 69-77.
16. Homrich, M.S., Passaglia, L.M.P., Pereira, J.F., Bertagnolli, P.F., Pasquali, G., Zaidi, M.A., Altosaar, I., Bodanese-Zanettini, M.H. 2008. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology** 31: 522-531.
17. Huang, Z., Shi, P., Chen, C., Du, J. 2004. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 80: 85-93.

18. Huang, Z., Shi, P., Chen, C., Du, J. 2007. Effects of azadirachtin on hemolymph protein expression in *Ostrina furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Entomological Society of America** 100: 245-250.
19. Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45–66.
20. Jaglan, M., Khokhar, K.S., Malik, M.S., Ran, S. 1997. Evaluation of (*Azadirachta indica* A. Juss) extracts against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45: 3262-3268.
21. Koul, O.K., Multani, J.S., Singh, G., Daniewski, W.M., Berlonzek, S. 2003. 6 β -hydroxygedunin from *Azadirachta indica*. Its potentiation effects with some non-azadirachtin limonoids in neem against lepidopteran larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 2937-2942.
22. Kumar, N.S., Muragan, K., Zhang, W. 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. **BioControl** 53: 869-880.
23. Kumar, R.P., Manoj, M.N., Kush, A., Annadurai, R.S. 2007. *In silico* approach of azadirachtin binding with actins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 37: 635-640.
24. Laemmli, U.K. 1971. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

25. Lowery, D.T., Smirle, M.J. Toxicity of insecticides to obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*, larvae and adults exposed previously to neem seed oil. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 95: 201-207.
26. Lucatoni, L., Giusti, F., Cristofaro, M., Pasqualini, L., Espósito, F., Habluetzel, A. 2006. Effects of neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensis* Liston (Diptera: Culicidae). **Tissue and Cell** 361-371.
27. Martinez, S.S., van Emden, H.F. 1999. Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research** 89: 65-71.
28. Martinez, S.S., van Emden, H.F. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology** 30: 113-125.
29. McMullen, D.C., Storey, K.B. 2008. Suppression of Na⁺K⁺-ATPase activity by reversible phosphorylation over the winter in a freeze tolerant insect. **Journal of Insect Physiology** 54: 1023-1027.
30. Messiano, G.B., Vieira, L., Machado, M., Lopes, L.M.X., Bortoli, S.A., Schpector, J.Z. 2008. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56: 2655-2659.
31. Miklos, J.A., Alibhai, M.F., Bledig, S.A., Connorward, D.C., Gao, A.G., Holmes, B.A., Kolacz, K.H., Kabuye, V.T., Macrae, T.C., Paradise, M.S., Toedebusch, A.S., Harrison, L.A. 2007. Characterization of soybean exhibiting high

- expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* transgene that confers a high degree of resistance to Lepidopteran pests. **Crop Science** 47: 148-157.
32. Mordue, A.J.L, Nisbet, A.J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadiracta indica* its actions against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 29: 616-632.
33. Mordue, A.J., Simmonds, M.S.J., Ley, S.V., Blaney, W.M., Mordue, W., Nasiruddin, M., Nisbet, A. 1998. Actions of azadiractina, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science** 54: 277-284.
34. Mourão, S.A., Zanuncio, J.C., Palini, A.F., Guedes, R.N.C., Camargos, A.B. 2004. Toxicidade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) ao ácaro-vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39: 827-830.
35. Nascimento, I.R., Murata, A.T., Bortoli, S.A., Lopes, L.M.X. 2003. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. **Pest Management Science** 60: 413–416.
36. Nasiruddin, M., Mordue, A.J.L. 1993. The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locust, *Shistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Tissue and Cell** 25: 875-884.
37. Nathan, S.S. 2006. Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 84: 98-108.
38. Nathan, S.S., Sehoon, K. 2006. Effects of *Melia azedarach* L. extracts on the teak defoliator *Hyblea parea* Cramer (Lepidoptera: Hyblaede). **Crop Protection** 25: 287-291.

39. Nathan, S.S., Kalaivani, K., Chung, P.G. 2005a. The effects of azadiractina and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 83: 46-57.
40. Nathan, S.S., Kalaivani, K., Murugan, K., Chung, P.G., 2005b. The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaffolder. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 81: 113-122.
41. Nathan, S.S., Kandaswamy, K., Chung, P.G., Murugan, K. 2006a. Effects of neem limonoids on lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). **Chemosphere** 62: 1388-1393.
42. Nathan, S.S., Kalaivani, K., Sehoon, K., Murugan, K. 2006b. The toxicity and behavioral effects of limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae), the rice leaffolder. **Chemosphere** 62: 1381-1387.
43. Nathan, S.S., Choi, M.Y., Paik, C.H., Kalaivani, K. 2008b. The toxic and physiological effects of goniotalamin, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hübner. **Chemosphere** 72: 1393-1400.
44. Nathan, S.S., Choi, M.Y., Paik, C.H., Seo, H.Y., Kim, J.D., Kang, S.M. 2007. The toxic effects of neem extract and azadiractina on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) BHP (Homoptera: Delphaceidae). **Chemosphere** 67: 80-88.
45. Nathan, S.S., Choi, M.Y., Seo, H.Y., Paik, C.H., Kalaivani, K., Kim, J.D. 2008a. Effects of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal. **Ecotoxicological and Environmental Safety** 70: 244-250.

46. Navickiene, H.M.D., Miranda, J.E. Bortoli, S.A., Kato, M.J. Bolzani, V.S., Furlan, M. 2007. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Management Science** 63: 399-403.
47. Ndione, R.D., Faye, O., Ndiaye, M., Dieye, A., Afoutou, J.M. 2007. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. **African Journal of Biotechnology** 6: 2846-2854.
48. Nogueira, N.F., Gonzáles, M., Garcia, E.M., Souza, W. 1997. Effects of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology** 69: 58–63.
49. Rharrabe, K., Bakrim, A., Ghailani, N., Sayah, F. 2007. Bioinsecticidal effect of harmaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 89: 137–145.
50. Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., Sayah, F. 2008. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and a-amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research** 44: 290– 294.
51. Salvador, G., Cõnsoli, F.L. 2008. Changes in the hemolymph and fat body metabolites of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) parasitized by *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control** 45: 103-110.
52. Sanchez, E., O 'Donnell, M. 2007. Characterization of transepithelial transport of salicylate by the malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* and the effects of changes in fluid secretion rate. **Physiological Entomology** 32: 157–166.

53. Santiago, G.P., Pádua, L.E.M., Silva, P.R.R., Carvalho, E.M.S., Maia, C.B. 2008. Effects of plant extracts on the biology of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) maintained under artificial diet. **Ciência e Agrotecnologia** 32: 792-796.
54. Sarmiento, R.A., Oliveira, H.G., Holtz, A.M., Silva, S.M., Serrão, J.E., Pallini, A. 2004. Fat body morphology of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in function of two alimentary sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 47: 407-411.
55. Sayah, F. 2002. Ultrastructural changes in the corpus allatum after azadirachtin and 20-hydroxyecdysone treatment in adults females of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue and Cell** 34: 53-62.
56. Sayah, F., Fayet, C., Idaomar, M., Karlinsky, A. 1996. Effects of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue and Cell** 28: 741-749.
57. Sayah, F., Idaomar, M., Soranzo, L., Karlinsky, A. 1998. Endocrine and neuroendocrine effects of azadirachtin in adult females of the earwing *Labidura riparia*. **Tissue and Cell** 30: 86-94.
58. Schaaf, O., Jarvis, A.P., van der Esch, S.A., Giagnacovo, G., Oldham, N.J. 2000. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography** 886: 89-97.
59. Sharma, V., Walia, S. Kumar, J., Nair, M.G., Parmar, B.S. 2003. An efficient method for the purification and characterization of nematioidal azadirachtins A,

- B, and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 3966-3972.
60. Silva, M.T.B., Costa, E.C., Boss, A. 2003. Controle de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento. **Ciência Rural** 33: 601-605.
61. Stark, J.D., Walter, J.F. 1995. Neem oil and neem components affect the efficiency of commercial neem insecticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43: 507-512.
62. Stark, J.D., Banks, J.E. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review Entomology** 48: 505-19.
63. Stefanini, E., Fadda, F., Medda, L., Gessa, G.L. 1976. Selective inhibition of serotonin uptake by trazodone, a new antidepressant agent. **Life Science** 8: 1459-1466.
64. Tanzubil, P.B., McCaffery, A.R. 1990. Effects of azadirachtin on reproduction in the African armyworm (*Spodoptera exempta*). **Entomologia Experimentalis et Applicata** 57: 115-121.
65. Timmins, W.A., Reynolds, S.E. 1992. Azadirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars: reduced growth due to impaired protein digestion. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 63: 47-54.
66. Vianna, U.R., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Lima, E.R., Brunner, J., Pereira, F.F., Serrão, J.E. 2009. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effects on descendent generation. **Ecotoxicology** 18: 180-186.

67. Yasmin, N., Khan, F., Channa, M.S., Ali, Z. 2008. Effects of neem sample on protein patterns of *Bractrocera cucurbitae*. **Turkish Journal of Zoology** 32: 1-5.

Tabela 1. Solução nutritiva para alimentação de adultos de *Anticarsia gemmatalis*
(Lepidoptera: Noctuidae)

Componentes	Unidade	Quantidade
Mel	g	10,50
Água destilada	L	1,05
Cerveja	ml	350,00
Sacarose	g	60,00
Ácido ascórbico	g	1,05
Nipagin	g	1,05

Tabela 2. Composição da dieta artificial para criação de *Anticarsia gemmatalis*
(Lepidoptera: Noctuidae)

Componente	Unidade	Quantidade
Feijão mulatinho	g	125,00
Levedo de cerveja	g	62,00
Gérmen de trigo	g	100,00
Proteína de soja	g	100,00
Caseína	g	50,00
Agar	g	5,00
Nipagin	g	5,00
Ácido ascórbico	g	6,00
Ácido sórbico	g	3,00
Formol (40%)	ml	6,00
Solução vitamínica	ml	10,00

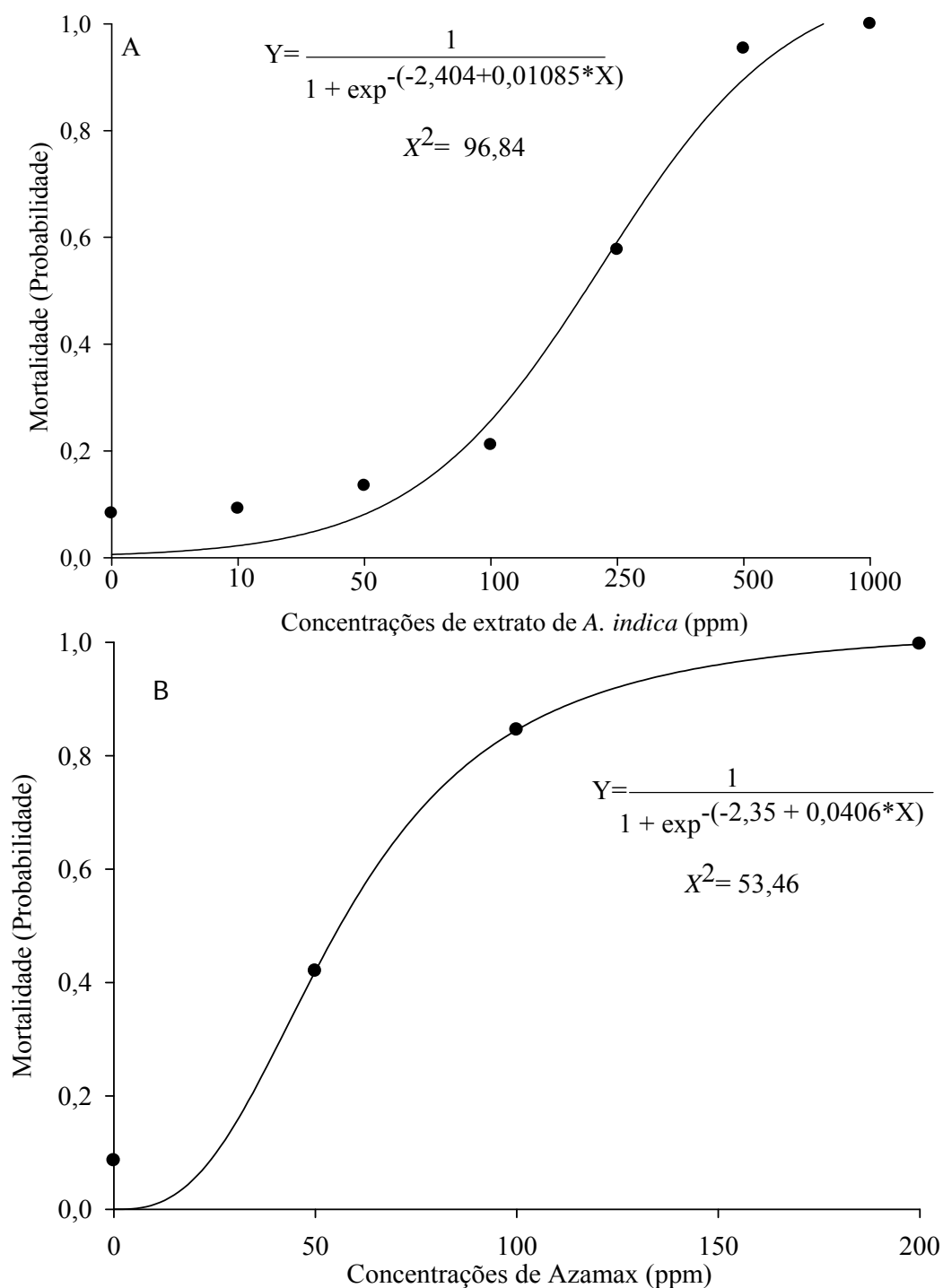


Figura 1. Mortalidade total da fase larval de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações de extrato de sementes de *Azadirachta indica* (0,061 g ml⁻¹ de azadiractina) (A) e óleo comercial, Azamax (0,012 g ml⁻¹ de azadiractina) (B). 25 ± 1°C de temperatura, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

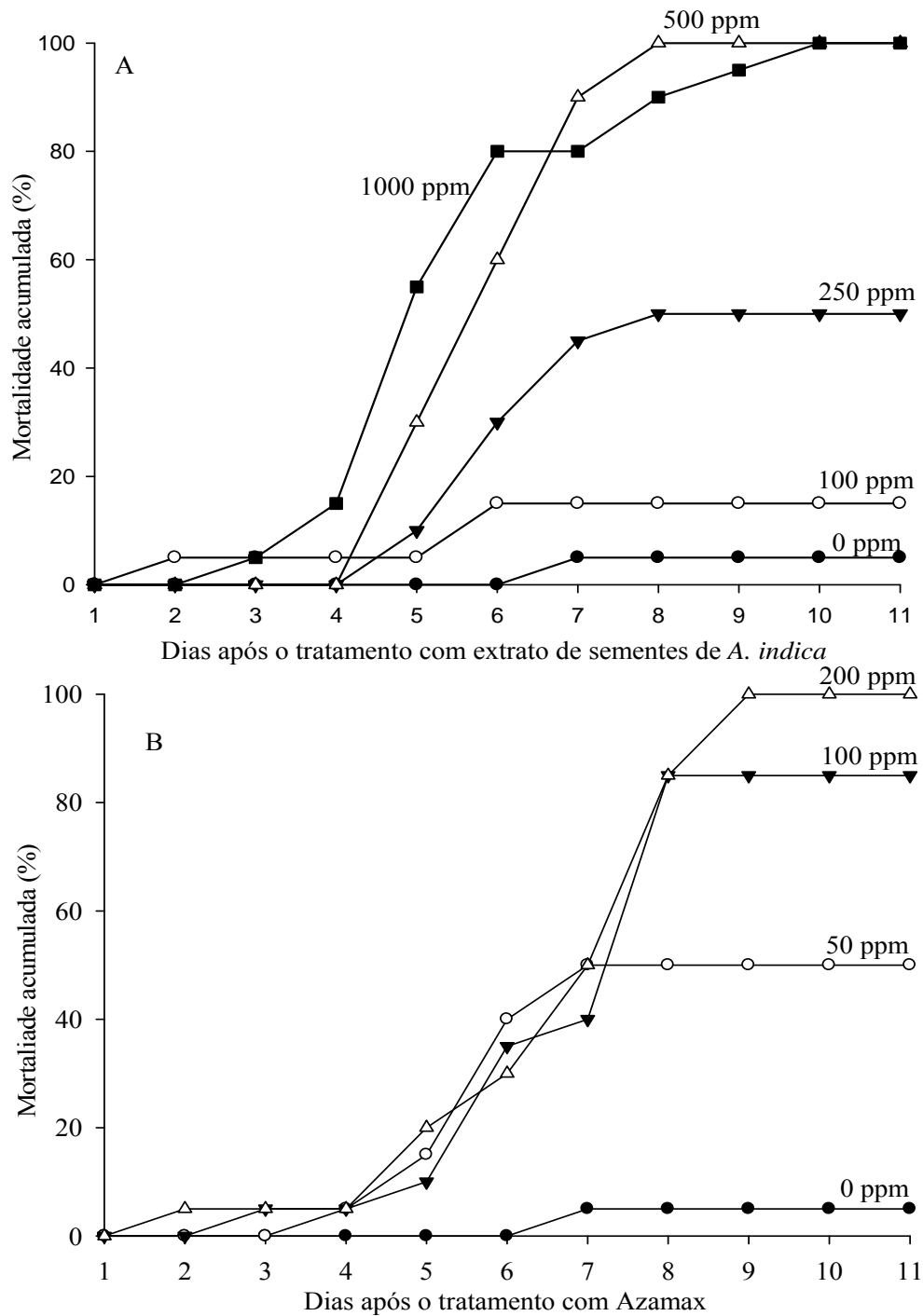


Figura 2. Mortalidade diária de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial com extrato de sementes de nim (0,061 g·ml⁻¹ de azadiractina) (A) e óleo comercial, Azamax (0,012 g·ml⁻¹ de azadiractina) (B). 25 ± 1°C de temperatura, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

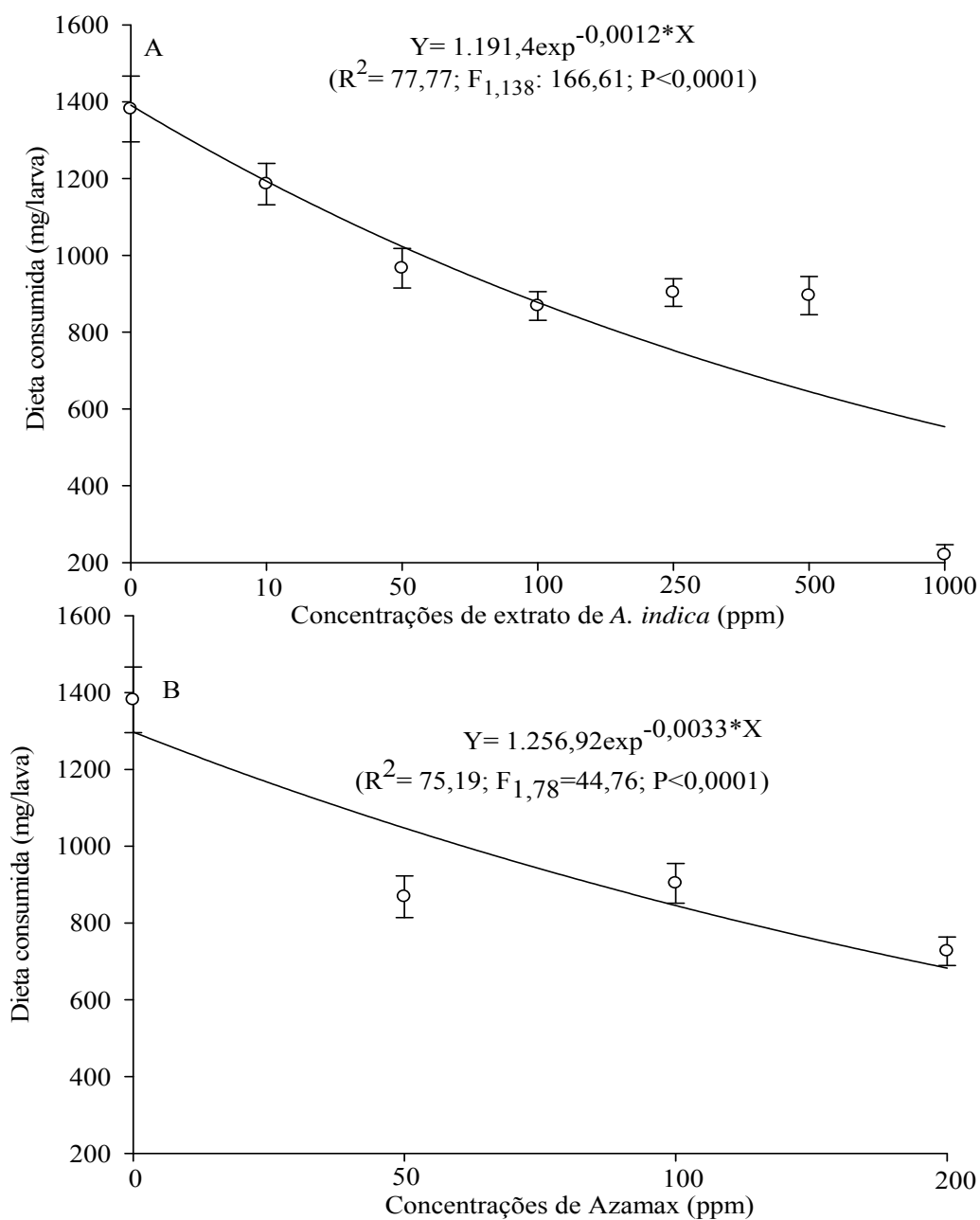


Figura 3. Consumo alimentar de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial contendo extrato de sementes *Azadirachta indica* (0,061 g ml⁻¹ de azadiractina) (A) e óleo comercial de *A. indica*, Azamax (0,012 g ml⁻¹ de azadiractina) (B). (A) e óleo comercial de *A. indica*, Azamax (B), durante quatro dias. 25 ± 1°C de temperatura, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

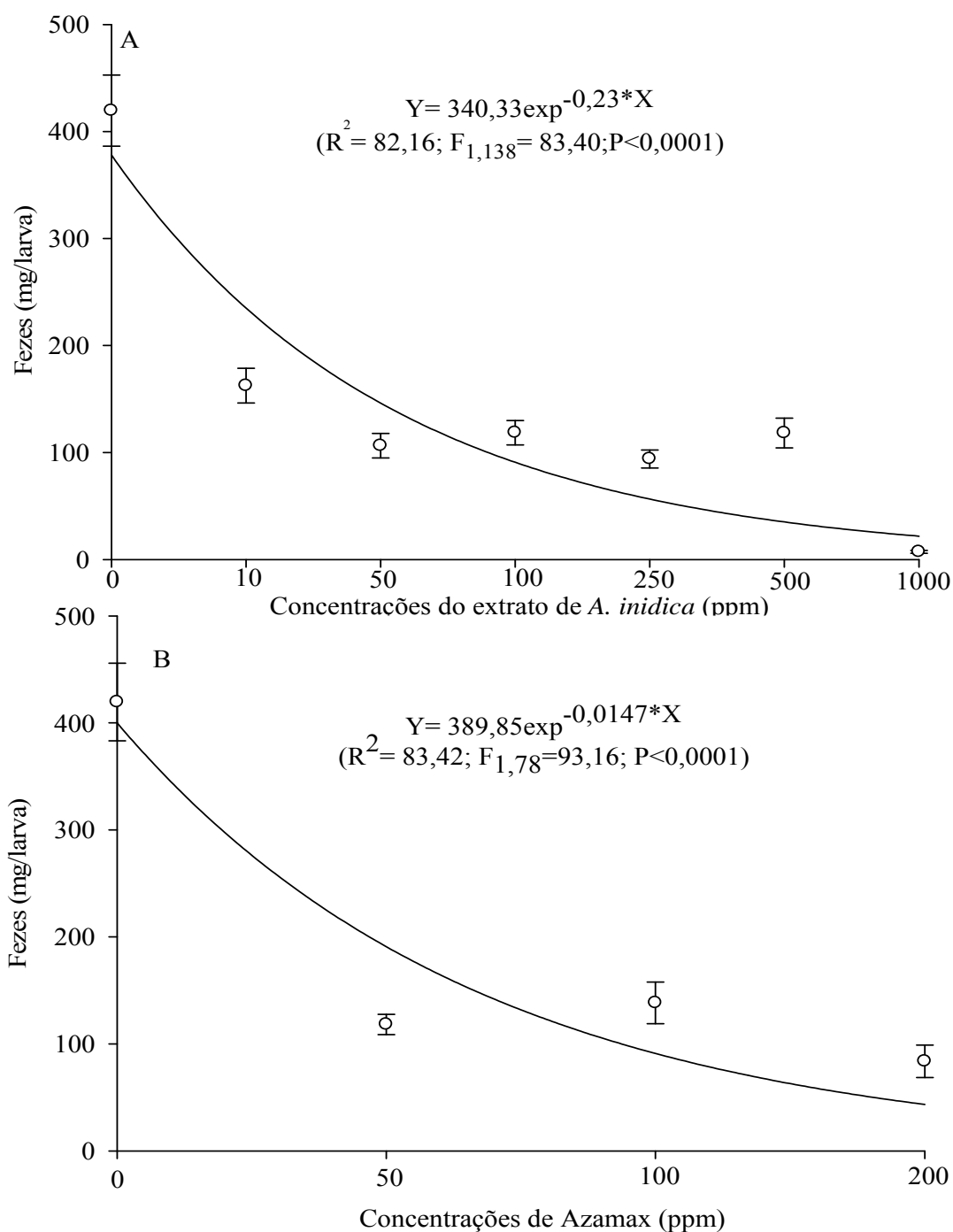


Figura 4. Massa fecal produzida por lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial contendo extrato de sementes *Azadirachta indica* (0,061 g ml⁻¹ de azadiractina) (A) e óleo comercial de *A. indica*, Azamax (0,012 g ml⁻¹ de azadiractina) (B), durante quatro dias. 25 ± 1°C de temperatura, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

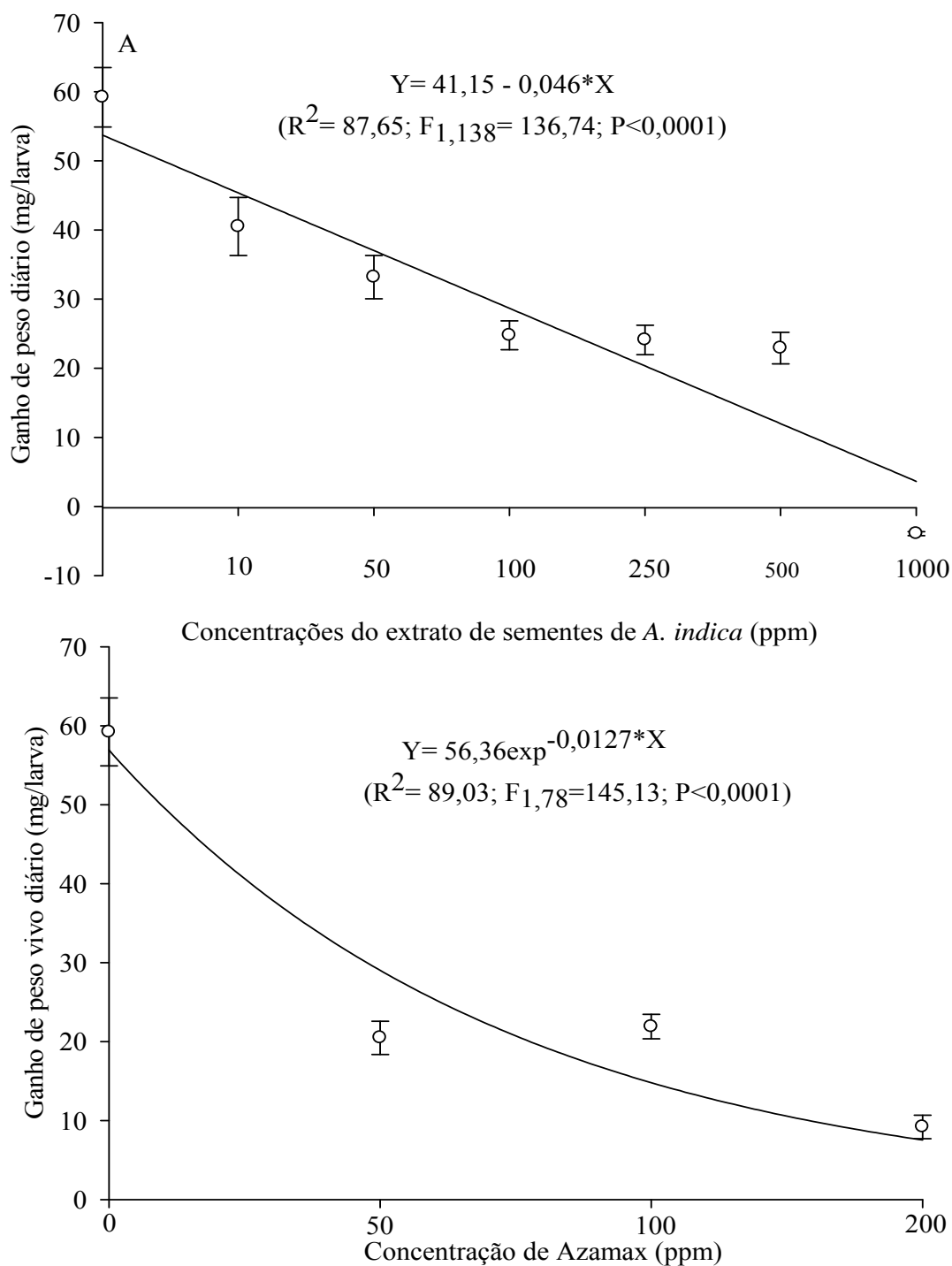


Figura 5. Ganho de peso vivo durante a fase larval de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial contendo extrato de sementes extrato de sementes *Azadirachta indica* (0,061 g ml⁻¹ de azadiractina) (A) e óleo comercial de *A. indica*, Azamax (0,012 g ml⁻¹ de azadiractina) (B). (A) e óleo comercial de *A. indica*, Azamax (B), durante quatro dias.

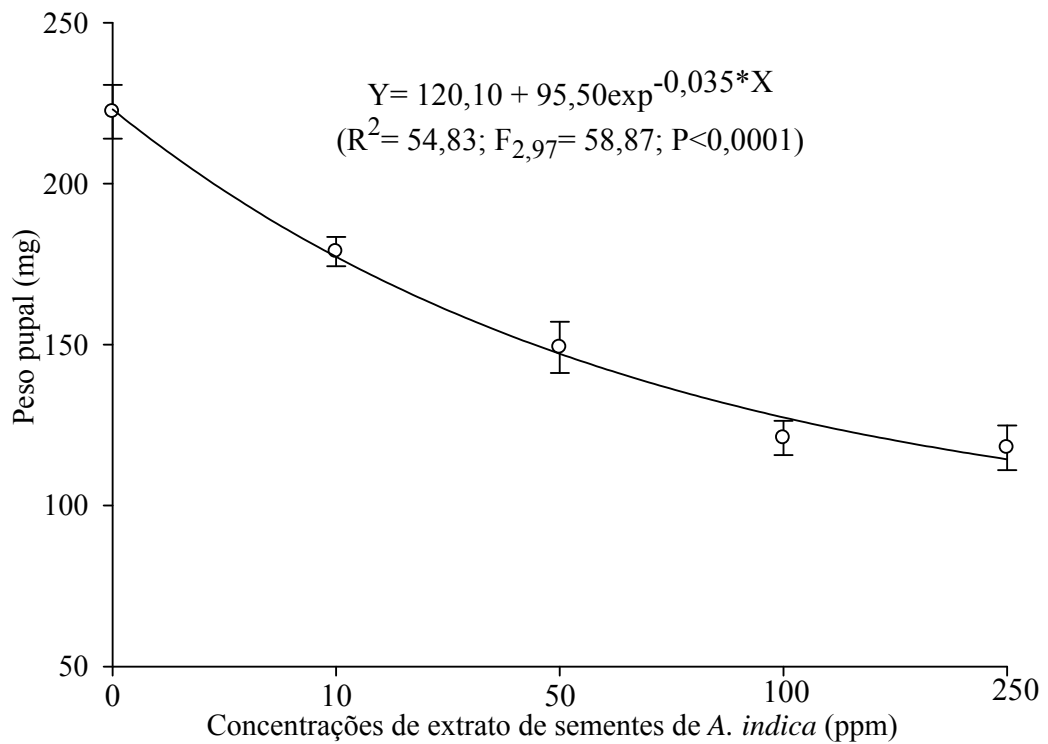


Figura 6. Peso de pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) quando lagartas foram alimentadas, por quatro dias, com dieta artificial contendo doses subletais de extrato de sementes de *Azadirachta indica*. 25 ± 1°C de temperatura, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

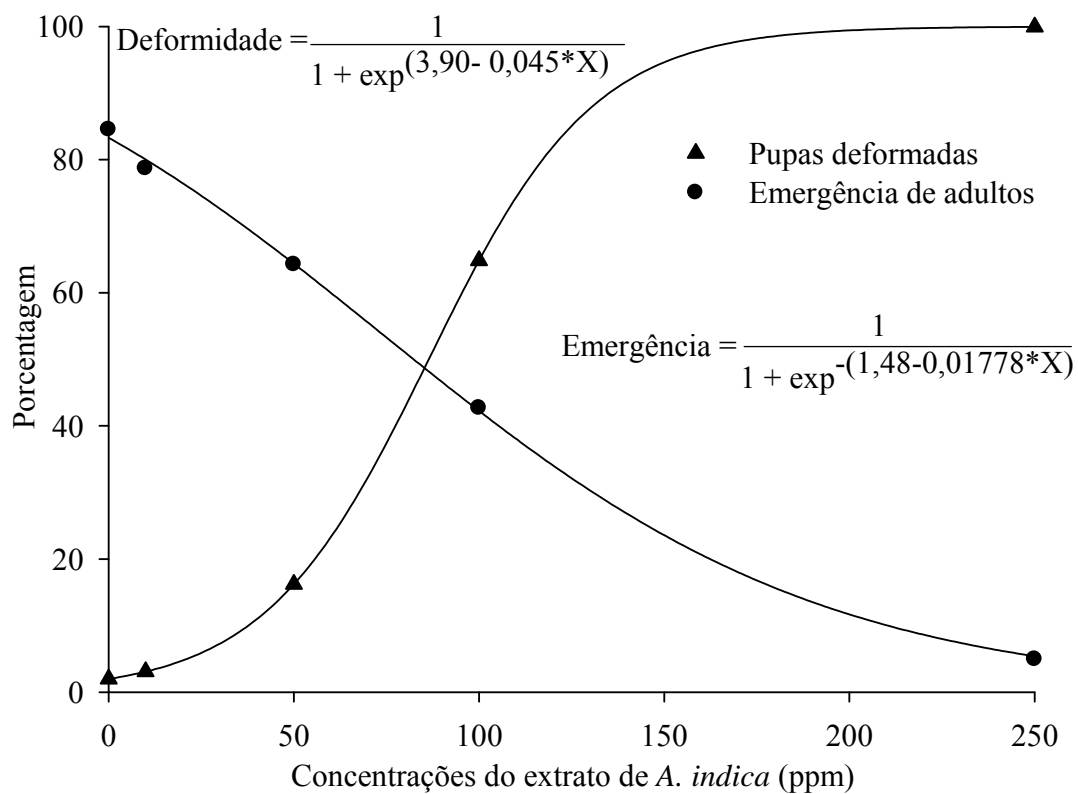


Figura 7. Deformidade pupal e emergência de adultos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após alimentação de lagartas, por quatro dias, com dieta artificial contendo doses subletais de extrato de sementes *Azadirachta indica*. $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

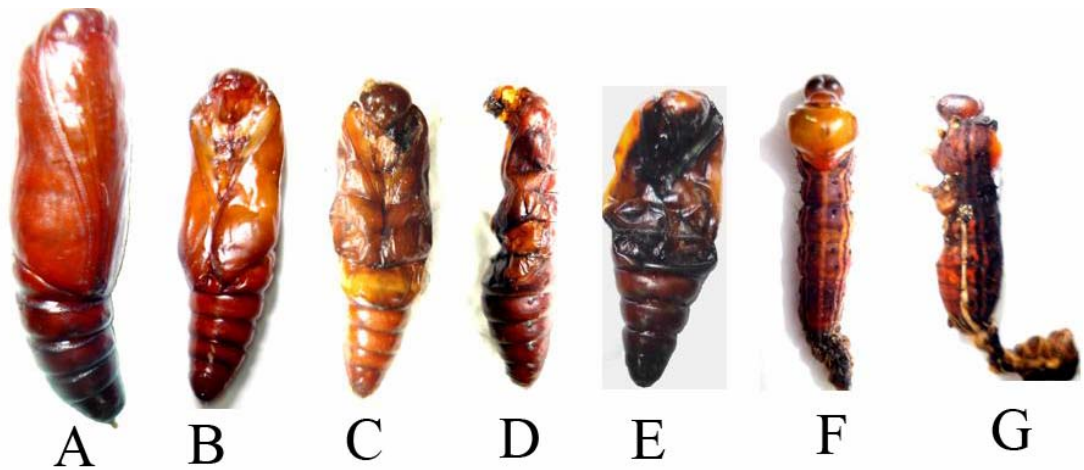


Figura 8. Deformidade em pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após alimentação com dieta artificial com extrato de sementes de *Azadirachta indica* (ppm). A-controle, B- 10, C- 50, D- 100, E- 250, F- 500 e G- 1000. $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

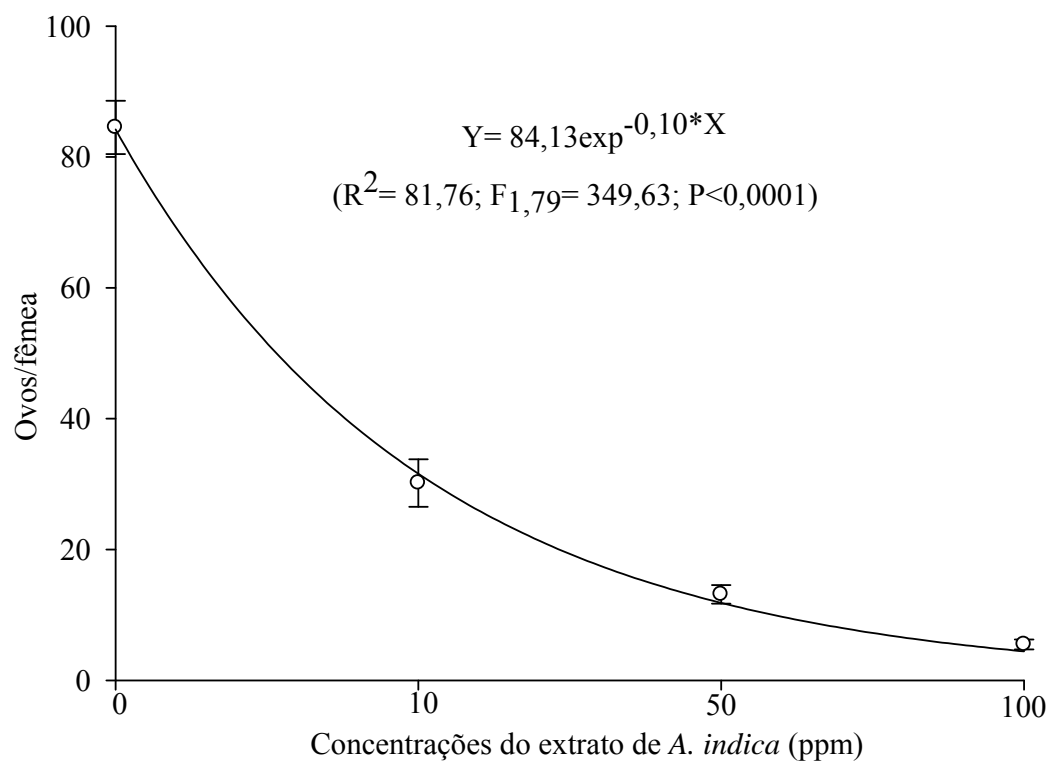
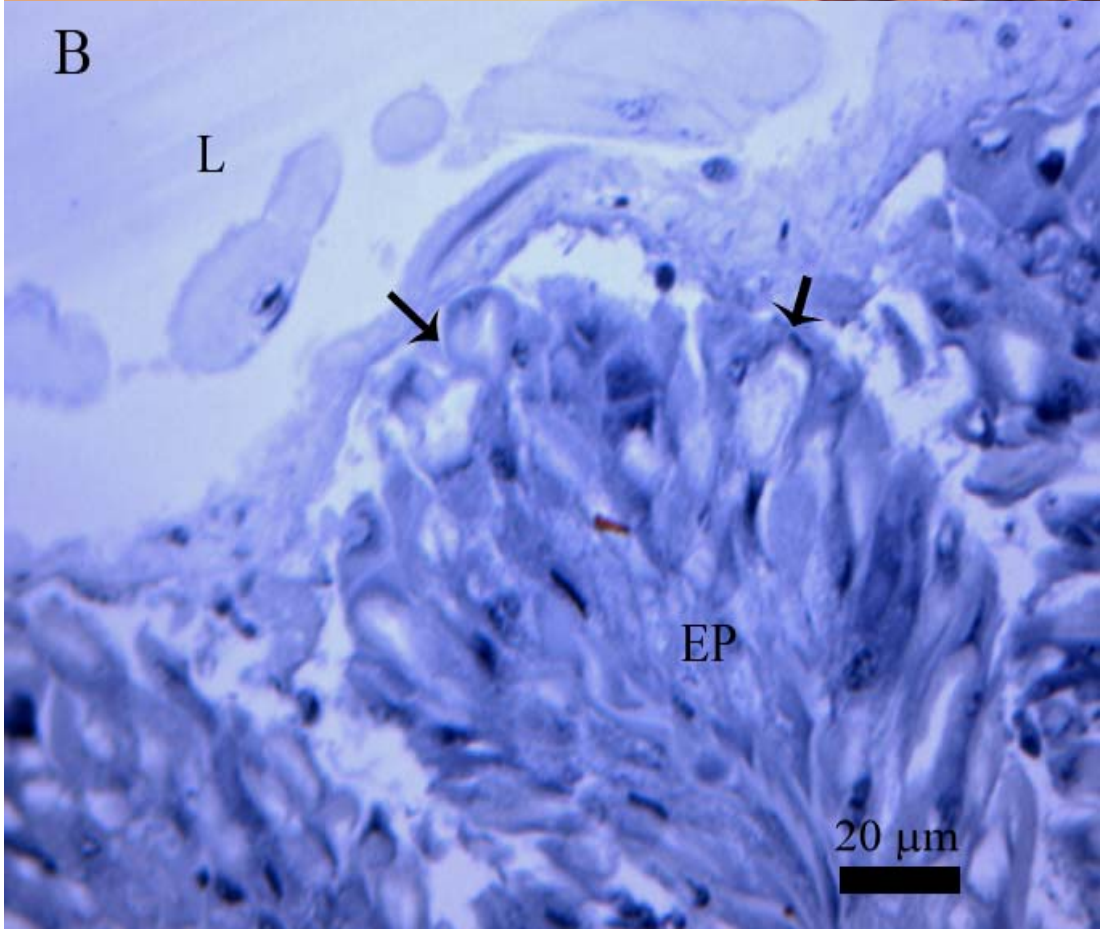
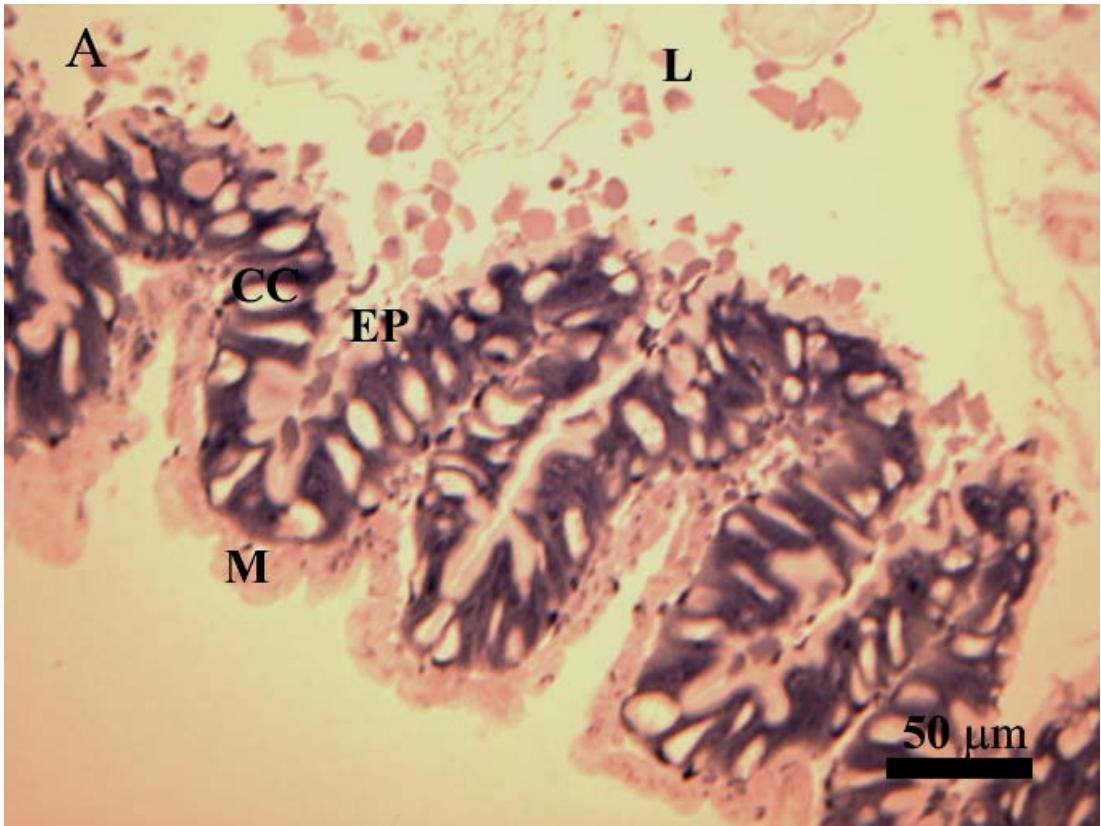


Figura 9. Oviposição de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), após a alimentação de lagartas, por quatro dias, com dieta artificial contendo doses não letais de extrato de sementes de *Azadirachta indica*. 25 ± 1°C de temperatura, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E).



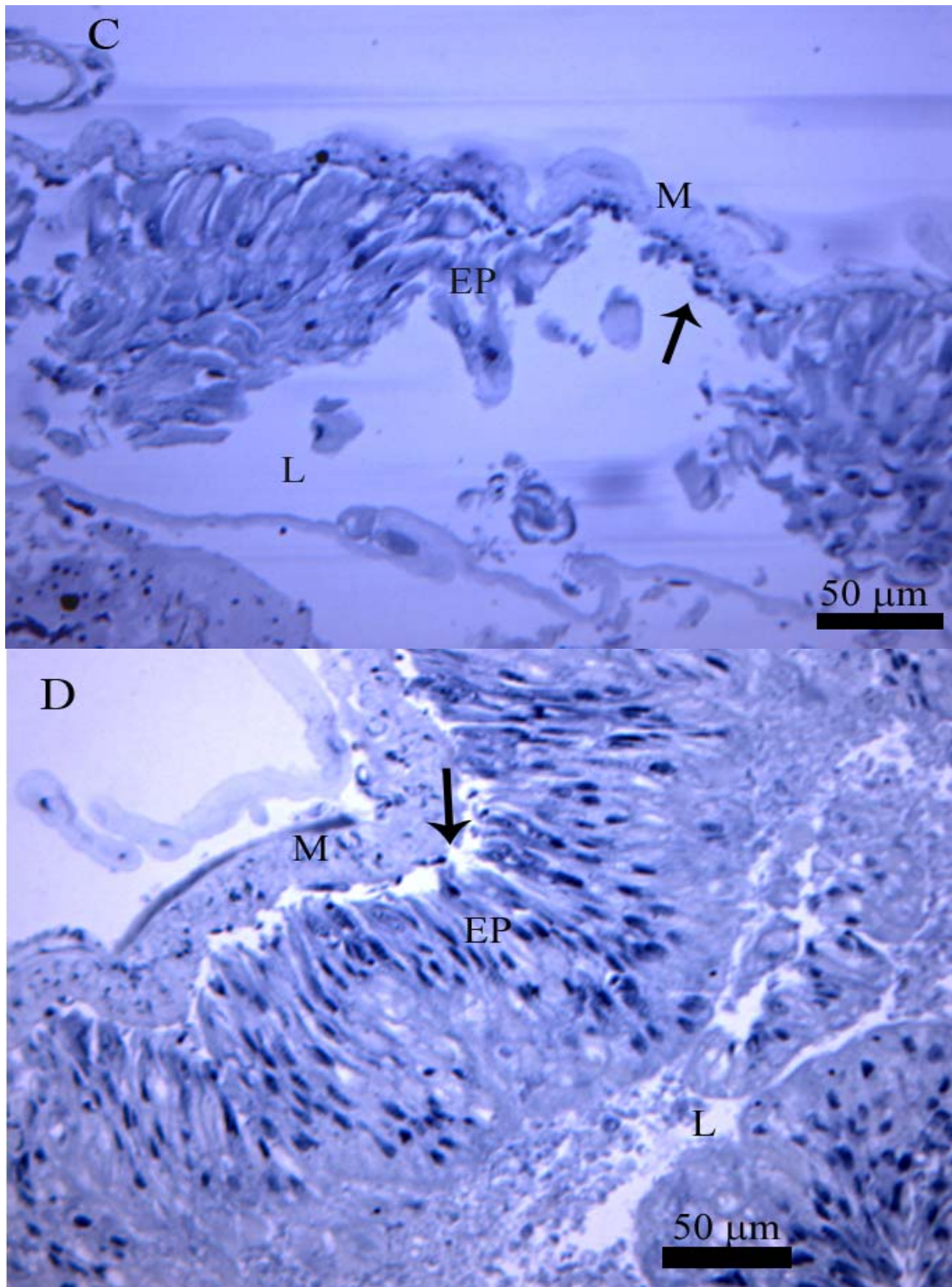
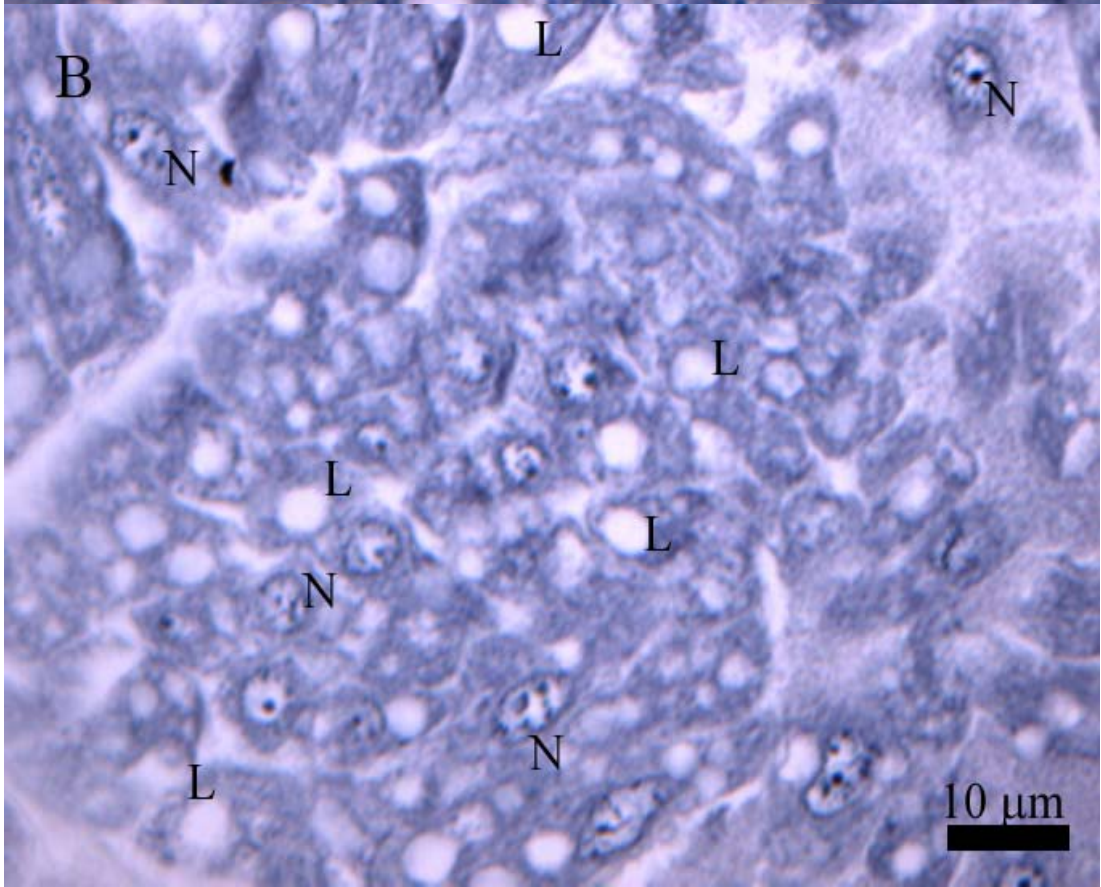
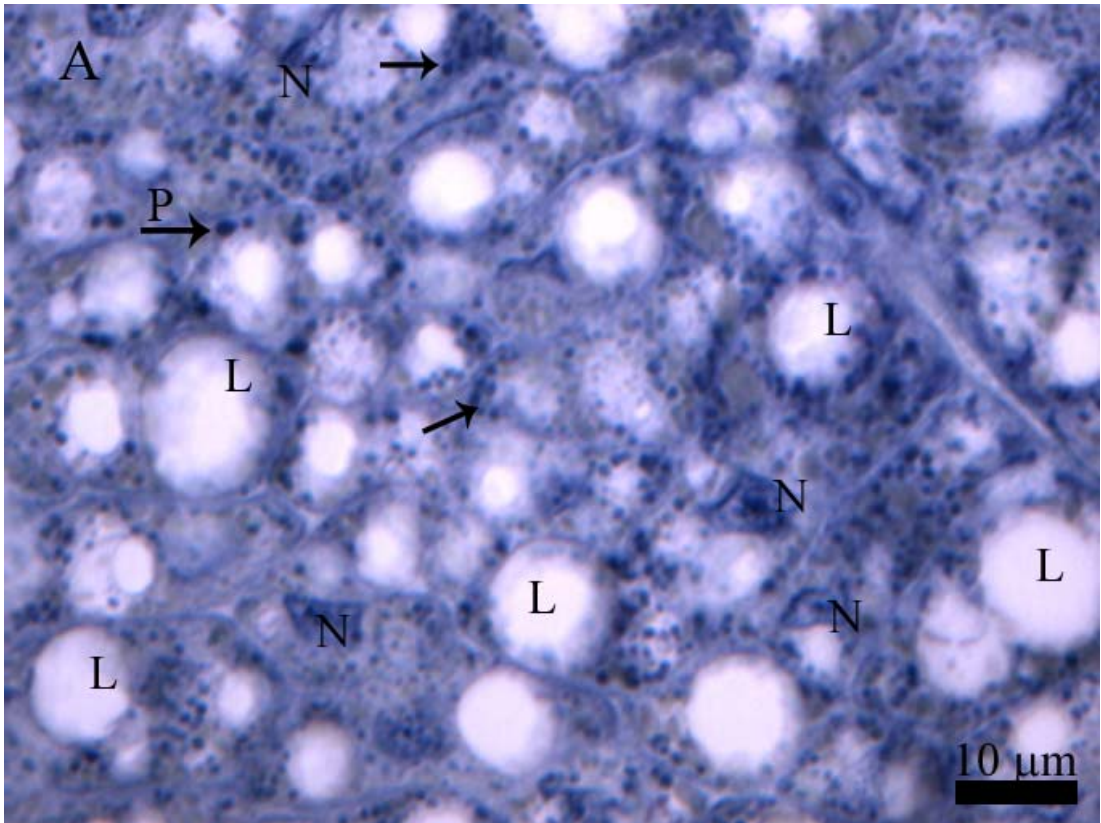


Figura 10. Alterações morfológicas no intestino médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após alimentação com dieta controle (A), um dia (B), dois dias (C), três dias (C) e quatro dias (D) com dieta contendo produtos derivados de *A. indica*. L-lúmem, EP- eptélio, M- parede muscular. $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E)



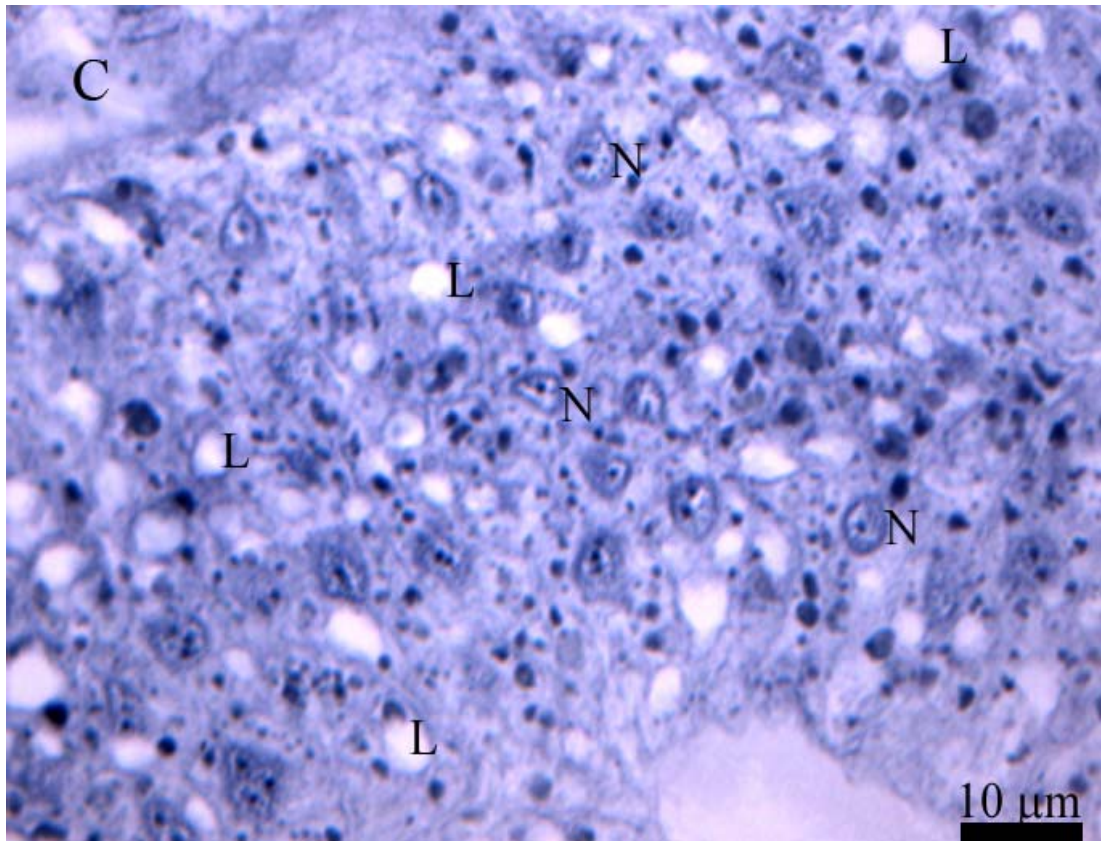


Figura 11. Corpo gorduroso de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), quatro dias após a alimentação em dieta controle (A) com produtos derivados de *A. indica* (B e C). P-proteínas, N-núcleo, L-lipídeos. $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 (L:E)

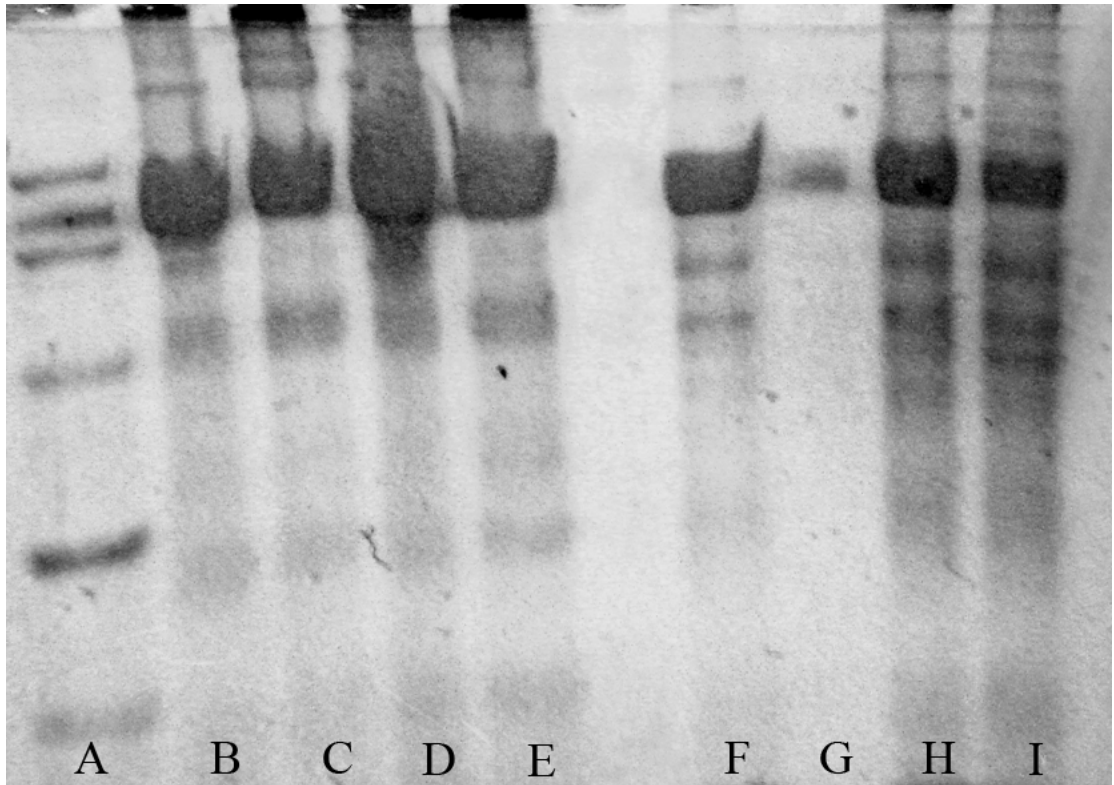


Figura 12. Expressão de proteínas na hemolinfa (B, C, D e E) e corpo gorduroso (F, G H e I) de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), quatro dias após a alimentação com dieta artificial com produtos derivados de *A. indica*. A- padrão de peso molecular conhecido, B- controle, C- 500 ppm extrato de sementes de nim, D- 100 ppm do extrato de sementes de nim, E- 50 ppm de Azamax, F- controle, G- 500 ppm extrato de sementes de nim, H- 100 ppm do extrato de sementes de nim, I- 50 ppm de Azamax.

Consumo foliar e mortalidade larval de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuide) em plantas de soja tratadas com produtos derivados de *Azadirachta indica*

Resumo

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) tem grande potencial para reduzir a produtividade da cultura da soja. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos da aplicação produtos derivados de *Azadirachta indica* na mortalidade de *A. gemmatalis* e danos em plantas de soja por esse inseto. Plantas de soja, em estágio vegetativo V-6, foram pulverizadas com extrato etanólico de sementes de *Azadirachta indica* ($6,1\text{gL}^{-1}$ de azadiractina) nas concentrações 0,5, 1,0, 2,5 ou 5,0% e com o produto comercial Azamax[®] 1,2CE ($12,0\text{gL}^{-1}$ de azadiractina) nas concentrações de 0,5 e 1,0%. Plantas controle foram pulverizadas, apenas, com água destilada. Lagartas de terceiro estágio de *A. gemmatalis* foram confinadas nas plantas de soja, após as pulverizações. O consumo foliar e a mortalidade larval diária de *A. gemmatalis* foram avaliados. Os produtos derivado de *A. indica* reduziram o consumo foliar e causaram elevada mortalidade em lagartas dessa espécie. No entanto, plantas pulverizadas com extrato de sementes de *A. indica* a 0,5% apresentaram desfolha superior a 30% e menos de 80% de mortalidade larval, enquanto as demais concentrações dos dois produtos reduziram a porcentagem de desfolha nas plantas de soja e aumentaram a mortalidade das lagartas de *A. gemmatalis*. Produtos derivados de *A. indica* podem ser utilizados no controle da lagarta desfolhadora da soja.

Palavras chave: *Azadirachta indica*, azadiractina, *A. gemmatalis*, soja, desfolha.

1. Introdução

A soja [*Glicine max* (L.) Merr.] é uma das mais importantes plantas cultivadas no mundo, com grande valor econômico e social, por ser fonte de proteína e óleo vegetal para alimentação humana e animal a baixo custo (Fortunato et al., 2007) e matéria prima para produção de biocombustíveis (Silva e Freitas, 2008).

A lagarta desfolhadora da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie de clima tropical e subtropical com ampla distribuição geográfica, da Argentina aos Estados Unidos da América (Homrich et al., 2008). Esse inseto causa danos à lavoura de soja e para completar seu desenvolvimento, cada lagarta pode consumir até 110 cm² de folha, podendo causar a destruição completa da planta em altas infestações (Walker et al., 2000). O desfolhamento compromete a produção, devido à diminuição da área foliar responsável pela fotossíntese, com conseqüente redução da produção de grãos (Fugi et al., 2005).

A cultura da soja no Brasil exige grande quantidade de produtos químicos para o controle de pragas (Neto et al., 2002). Esses produtos podem causar diversos problemas, como poluição ambiental, desenvolvimento de insetos resistentes, toxicidade a inimigos naturais e intoxicações aguda e crônica de trabalhadores e consumidores (Zanuncio et al., 2003; Pereira et al., 2005; Isman, 2006; Almeida et al., 2008; Zanuncio et al., 2008, Vianna et al., 2009).

Plantas sintetizam compostos químicos envolvidos nas interações planta-insetos (Rharrabe et al., 2008). Aleloquímicos sintetizados por *Azadiracta indica* A. Juss (Meliaceae) são efetivos contra mais de 400 espécies de insetos pragas (Koul et al., 2003; Mourão et al., 2004ab), além de efeitos contra nematóides, fungos, vírus e protozoários (Sharma et al., 2003, Javed et al., 2007). A azadiractina, principal composto responsável pela ação inseticida dessa planta é sintetizada em grandes

quantidades nos frutos de *A. indica* (Schmutter, 1990; Sharma et al., 2003; Nathan et al., 2005). Esse aleloquímico apresenta forte ação antialimentar, reguladora de crescimento, inibição da muda, deformações anatômicas e distúrbios na reprodução de insetos (Venzon et al., 2008), principalmente os da ordem Lepidoptera (Calvo e Molina, 2003). Bioinseticidas à base de azadiractina são importantes para o manejo integrado de pragas, por apresentarem baixo impacto sobre inimigos naturais (Liang et al., 2003; Venzon et al., 2005). A azadiractina não persiste no ambiente, por ser um composto rapidamente degradado pela luz ultra violeta (fotossensível) (Charbonneaul et al., 2007), mas essa substância apresenta ação sistêmica em plantas, o que prolonga os efeitos sobre insetos fitófagos (Pavela e Barnet, 2005).

Bioinseticidas à base de azadiractina causaram mortalidade e reduziram o consumo alimentar de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) (Mancebo et al., 2002), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Liang et al., 2003), *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) (Seljasen e Meadow, 2006) e *Cnaphalocrocis medinalis* Gueneé (Lepidoptera: Pyralidae) (Nathan et al., 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de produtos derivados de *A. indica* sobre a mortalidade e danos em plantas de soja ocasionados por *A. gemmatalis*.

2. Material e Métodos

2.1 Criação das lagartas

A lagarta desfolhadora da soja *A. gemmatalis* foi criada no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais,

Brasil em folhas da variedade de soja UFV-16, a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12:12 (L:E).

2.2 Preparação do extrato etanólico

Frutos senescentes de *A. indica* foram coletados em uma propriedade rural do município de Barra de São Francisco, Estado do Espírito Santo, Brasil, despulpados em água corrente, colocados à sombra para retirada do excesso de água e armazenados a -2°C . A extração foi realizada no Laboratório de Biofarmacos do Departamento de Bioquímica da UFV, da seguinte forma: 500g de amêndoas de nim descongeladas foram trituradas com 1,5L de etanol. A solução etanólica foi filtrada com papel filtro e o solvente removido por evaporação à vácuo com rotavaporizador ($70 \pm 5^\circ\text{C}$), cinco dias após o início do processo de extração. Esse processo foi repetido por três vezes, obtendo-se 90ml de um extrato escuro semi-líquido, que foi utilizado na preparação da solução padrão (Schmidt et al., 1997; Nathan e Sehoon, 2006).

2.3 Preparação da solução padrão

Dez mililitros (ml) do extrato semi-líquido de *A. indica* foram diluídos em 100 mL de etanol (30%) e agitado por 30 minutos até a completa homogeneização, obtendo-se uma solução a 10% (v/v), utilizada para a formulação das soluções aplicadas nas plantas de soja (Schmidt et al., 1997; Nathan e Sehoon, 2006).

2.4 Quantificação de azadiractina no extrato

A azadiractina foi quantificada em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC), detector ultravioleta (UV) com comprimento de ondas de 217 nm, no Laboratório de Química do Departamento de Química da UFV, de acordo com a metodologia de Schaaf et al. (2000). Uma coluna em fase reversa (C18), com fluxo de 0,6 ml/minuto, pressão na coluna de 97 Kgf foi utilizada. A fase móvel foi

composta por metanol e água (1:1). Injetou-se 20 µl de uma solução contendo 20% de extrato de sementes de *A. indica*.

A presença de azadiractina no extrato bruto foi constatada com 14,13 minutos em HPLC seguindo o mesmo padrão da azadiractina pura (SigmaAldrich-Alemanha). Uma relação de 12,18 µg de azadiractina por µl de solução com 20% de extrato bruto de sementes de *A. indica* foi obtida. Assim, o extrato bruto de nim contém, em média 0,061g de azadiractina por ml, proporcionando uma solução padrão com 6,10 gL⁻¹ de azadiractina.

2.5 Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos em casa de vegetação do Programa Soja do Departamento de Fitotecnia da UFV, com fotoperíodo natural de 12 horas, temperaturas máximas de 29,01 ± 7,50 e mínimas de 19,77 ± 2,81 °C e umidade relativa de 65,15 ± 19,18%. Plantas de soja da variedade UFV-16 foram cultivadas em vasos plásticos, com 5 L de substrato contendo 60% de solo, 20% de areia e 20% de matéria orgânica.

Plantas de soja, no estágio vegetativo V-6 (Neto et al., 2002), foram pulverizadas com, extrato etanólico de sementes de *A. indica*, nas concentrações de 0,5 1,0, 2,5 e 5,0%, obtidas a partir da diluição da solução padrão (10% v/v), 6,10 gL⁻¹ de azadiractina, e óleo comercial de nim, Azamax com 12,0 gL⁻¹ de azadiractina (DVA Especialidade-Comércio, Importação e Exportação de Insumos Agropecuários LTDA) na concentrações de 0,5 e 1,0%. Plantas controle foram pulverizadas, apenas, com água destilada. As aplicações foram realizadas com mini-pulverizador manual e volume de calda de 300 litros/ha (Bueno et al., 2008).

Dez lagartas de *A. gemmatilis*, de terceiro estágio (60-80 mg) foram confinadas por repetição, após 30 minutos de exposição ao ar para secagem do

excesso de umidade nas plantas de soja, pela pulverização. Cada repetição foi constituída por um vaso com três plantas de soja. Uma gaiola de tecido organza, com uma extremidade presa na base do vaso e a outra em um tutor de madeira acima do ápice da planta de soja, foi montada por repetição, para o confinamento das lagartas.

A mortalidade larval de *A. gemmatalis* foi avaliada, diariamente, pela subtração do número de indivíduos mortos dividido pelo inicial, multiplicado por cem. Os danos nas plantas de soja foram avaliados após a pulverização com bioinseticidas à base de azadiractina. A porcentagem de desfolha foi medida pela subtração da área foliar inicial pela final, até que esses insetos atingissem a fase de pupa ou a mortalidade total da repetição. O percentual de desfolha foi adaptado da metodologia de Pratisoli et al. (2007), por fotografia digital e o programa QUANT (1.0.1).

2.6 Análise estatística

Os experimentos foram montadas em delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos e seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.0 Resultados

Todas as concentrações do extrato de sementes de *A. indica* e do Azamax reduziram a desfolha por *A. gemmatalis* nas plantas de soja e, apenas, naquelas tratadas com 0,5% de extrato de nim apresentaram desfolha superior a 30%, que é o limite tolerável para essa cultura no período vegetativo. As dosagens de 1,0, 2,5 e 5,0 % do extrato de sementes de nim e 0,5% e 1,0% de Azamax reduziram ($F_{6,35} = 62,214$, $P < 0,0001$) a desfolha nas plantas de soja para valores inferiores à 20% (Figura 1).

A mortalidade larval de *A. gemmatalis* foi alta com todas as dosagens do extrato de sementes de *A. indica* e Azamax, mas com menores valores com o extrato de nim a 0,5% ($F_{6,35} = 62,202$; $P < 0,0001$). Todas as concentrações de Azamax proporcionaram 100% de mortalidade e com valores semelhantes aos do extrato de nim a 1,0, 2,5 e 5,0% (Figura 2).

Lagartas de *A. gemmatalis*, após a alimentação nas folhas de soja tratadas com extrato de nim e Azamax, apresentaram anomalias na muda, como dificuldade na perda da velha cutícula e a incapacidade de se transformar em pupas (Figura 3).

4. Discussão

A redução dos danos em plantas de soja e a elevada mortalidade larval de *A. gemmatalis* pelos bioinseticidas à base de azadiractina mostra que esses produtos podem ser efetivos no controle dessa praga na cultura da soja. Isto é semelhante à redução dos danos da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) após aplicações de óleo comercial de nim, durante quatro safras consecutivas (Montes-Molina et al., 2008). Soluções com 0,1, 0,5 e 1,0 ppm de azadiractina reduziram a área foliar consumida de algodoeiro (*Gossypium hirsutum ad libitum*) e causaram elevada mortalidade de lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Kumar et al., 2008). Lagartas de *Streblote panda* Hübner (Lepidoptera: Lasiocampidae), alimentadas, durante 24 horas, com folhas de morango tratadas com diferentes concentrações de óleo comercial de nim apresentaram menor consumo foliar e elevada mortalidade (Calvo e Molina, 2003), e lagartas de *H. grandella* tiveram menor consumo foliar e maior mortalidade de acordo com o aumento da dosagem de óleos comerciais de nim (Mancebo et al., 2002).

A redução do consumo foliar e a mortalidade de *A. gemmatalis* em plantas de soja pode ser atribuída à azadiractina e a outros limonóides sintetizados por plantas de *A. indica* (Kuol et al., 2003). No entanto, a azadiractina é a substância mais efetiva no controle de insetos, e esses efeitos são proporcionais à sua quantidade no bioinseticida (Nathan et al., 2005). O menor consumo foliar e mortalidade larval de *A. gemmatalis*, em plantas pulverizadas com extrato de nim a 0,5% comparado ao Azamax a 0,5%, pode ser devido à menor concentração de azadiractina na solução padrão do extrato de sementes de nim, $6,1\text{gL}^{-1}$, que no óleo comercial Azamax, $12,0\text{gL}^{-1}$. A mortalidade de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) variou de 6,3% até 97,5% com soluções a 1,0% de concentração de três formulações comerciais de óleos emulsionáveis de nim, disponíveis no mercado brasileiro (Brito et al., 2006). A recomendação de bioinseticidas derivados de *A. indica*, deve ser baseado no teor de azadiractina do produto, pois a falta de padronização nos processos de extração desses produtos pode reduzir sua eficiência. Solventes apolares são mais eficientes na extração da azadiractina (Jaglan et al., 1997), além de que, produtos emulsionáveis em óleo possuem maior capacidade de dispersão e a aderência nas plantas e penetração no tecido dos insetos (Stark e Walter, 1995).

O menor desfolhamento de plantas de soja tratadas com bioinseticida à base de azadiractina, pode ser devido à ação da azadiractina sobre o sistema fisiológico das lagartas de *A. gemmatalis*. A azadiractina possui uma forte ação inibidora de alimentação e reguladora de crescimento em insetos (Kraiss e Cullen, 2008). A ação antialimentar pode ser primária ou secundária. Os efeitos primários são devidos à ação nos quimiorreceptores alimentares dos insetos pelo estímulo de células de deterrência alimentar e/ou pelo bloqueio das células estimuladoras de alimentação. Os secundários são devido a distúrbios fisiológicos após a ingestão ou contato com a

azadiractina (Mordue et al., 1998). Como as lagartas de *A. gemmatalis* estavam confinadas e, mesmo em condições de campo esses insetos não são capazes de percorrerem grandes distancias, é possível que essa ação seja devido aos efeitos secundários provenientes da ingestão da azadiractina. Esta hipótese é sustentada pela ocorrência de anomalias no processo de muda das lagartas de *A. gemmatalis*, que é devido à ação reguladora de crescimento da azadiractina (Sharma et al., 2006), o que indica que as lagartas se alimentaram das folhas pulverizadas com bioinseticidas a base de azadiractina e não morrem, apenas, devido á fome.

O percentual de desfolha, nas plantas de soja tratadas com 1,0, 2,5, e 5,0% do extrato de nim e 0,5 e 1,0% de Azamax ficou abaixo do nível de dano tolerável para cultura da soja, que é de 30% na fase vegetativa (Board et al., 2007). Isto mostra que, dosagens menores, podem ser utilizadas, para se reduzir os custos e possíveis impactos sobre inimigos naturais. Dosagens capazes de manter populações de insetos pragas abaixo do nível de dano econômico são importantes, pela manutenção de hospedeiros de inimigos naturais, o que pode favorecer o controle biológico natural (Ferreira et al., 2008).

5. Conclusão

Produtos derivados de *A. indica* tem potencial para o controle da *A. gemmatalis*, por reduzir a sobrevivência e a capacidade desse inseto de desfolhar plantas de soja.

6. Referências Bibliográficas

1. Almeida, G.D., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Vicentini, V.B.; Holtz, A.M., Serrão, J.E. 2008. Calcium silicate and organic mineral fertilizer applications reduce phytophagy by *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) on eggplants (*Solanum melongena* L.). **Interciencia** 33: 835-838.
2. Board, J.E., Makaa, V., Priceb, R., Knightc, D., Baurd, M.E. 2007. Development of vegetation indices for identifying insect infestations in soybean. **Agronomy Journal** 99: 650-656.
3. Brito, H.M., Gondim Jr., M.G.C., Oliveira, J.V., Câmara, C.A.G. 2006. Toxicidade de formulações de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao àcaro-rajado e a *Euseius alatus* De Leon e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology** 35: 500-505.
4. Bueno, A.F., Bueno, R.C.O.F., Parra, J.R., Vieira, S.S. 2008. Effects of pesticides used in soybean crops to the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ciência Rural** 38: 1495-1503.
5. Calvo, D., Molina, J.M. Effects of a commercial neem (*Azadirachta indica*) extract on streblote panda larvae. **Phytoparasitica** 31: 365-370.
6. Charbonneau, C., Côtéd, R., Charpentier, G.J. 2007. Effects of azadirachtin and of simpler epoxy-alcohols on survival and behaviour of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Journal of Applied Entomology** 131: 447-452.
7. Ferreira, J.A.M., Zanuncio J.C., Torres, J.B., Molina-Rugama, A.J. 2008. Predatory behaviour of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) on different densities of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology** 18: 711-719.

8. Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., Moreira, M.A. 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Journal of Pest Science** 80: 241-247.
9. Fugi, C.G.Q., Lourenção, A.L., Parra, J.R.P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agrícola** 62: 31-35.
10. Homrich, M.S., Passaglia, L.M.P., Pereira, J.F., Bertagnolli, P.F., Salvadori, J.R., Nicolau, M., Santos, E.K., Alves, L.B., Zanettini, M.H.B. 2008b. Agronomic performance, chromosomal stability and resistance to velvetbean caterpillar of transgenic soybean expressing *cryIAc* gene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43: 801-807.
11. Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45–66.
12. Jaglan, M., Khokhar, K.S., Malik, M.S., Ran, S. 1997. Evaluation of (*Azadirachta indica* A. Juss) extracts against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45: 3262-3268.
13. Javed, N., Gowena, S.R., Inam-ul-Haqa, M., Abdullaha, K., Shahinab, F. 2007. Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. **Crop Protection** 26: 911-916.
14. Koul, O.K., Multani, J.S., Singh, G., Daniewski, W.M., Berlonzek, S. 2003. 6β-Hydroxygedunin from *Azadirachta indica*. Its potentiation effects with some

- non-azadirachtin limonoids in neem against lepidopteran larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 2937-2942.
15. Kraiss, H., Cullen, E.M. 2008. Insect growth regulator effects of azadirachtin and neem oil on survivorship, development and fecundity of *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) and its predator, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Pest Management Science** 64: 660-668.
 16. Kumar, N.S., Murugan, K., Zhang, W. 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. **BioControl** 53:869–880.
 17. Liang, G.M., Chen, W., Liu, T.X. 2003. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection** 22: 333-340.
 18. Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A., Salazar, R. 2002. Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. **Crop Protection** 21: 107-112.
 19. Montes-Molina, J.A., Guido, L.L., Paz, N.E., Govaerts, B., Miceli, F.A.G., Dendooven, L. 2008. Are extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (L.)) and *Gliricidia sepium* (Jacquin) an alternative to control pests on maize (*Zea mays* L.)?. **Crop Protection** 27: 763–774.
 20. Mordue, A.J.L, Simmonds, M.S.J., Ley, S.V., Blaney, W.M., Mordue, W., Nasiruddin, M., Nisbet, A. 1998. Actions of azadiractina, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science** 54: 277-284.
 21. Mourão, S.A., Zanuncio, J.C.; Palini, A.F., Guedes, R.N.C., Camargos, A.B. 2004a. Toxicidade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) ao ácaro-vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39: 827-830.
 22. Mourão, S.A. Silva, J.C.T., Guedes, R.N.C., Venzon, M., Jham, G.N., Oliveira, C., Zanuncio, J.C. 2004b. Seletividade de extratos de nim (*Azadirachta indica* A.

- Juss.) ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* (Denmark & Muma) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology** 33: 613-617.
23. Nathan, S.S., Sehoon, K. 2006. Effects of *Melia azedarach* L. on the teak defoliator *Hyblaea purea* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae). **Crop Protection** 25: 287-291.
24. Nathan, S.S., Kalaivani, K., Sehoon, K., Muragan, K. 2006. The toxicity and behavioural effects of limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae), the rice leaffolder. **Chemosphere** 62: 1381-1387.
25. Nathan, S.S., Kalaivani, K., Muragan, K., Chung, P.G. 2005. Efficacy of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Gueneé) (Lepidoptera: Pyralidae) the rice leaffolder. **Crop Protection** 24: 760-763.
26. Neto, F.C.M., Zanuncio, J.C., Picanço, M.C., Cruz, I. 2002. Reproductive characteristics of the predator *Podisus nigrispinus* fed with an insect resistant soybean variety. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 917-924.
27. Pavela, R., Barnet, M. 2005. Systemic applications of neem in the control of *Cameraria ohridella*, a pest of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). **Phytoparasitica** 33: 49-56.
28. Pereira, A.I.A., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C. 2005. Susceptibility of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidea) to gamma-cyhalothrin under laboratory conditions. **Scientia Agrícola** 62: 478-482.
29. Pratissoli, D., Almeida, G.D., Jesus Jr, W.C., Vicentini, V.B., Holtz, A.M., Cochetto, J.G. 2007. Fertilizante organomineral e argila silicatada como indutores de resistência à varíola do mamoeiro. **Idesia** 25: 63-67.
30. Rharrabe, K., Amri, H., Bouayad, N., Sayah, F. 2008. Effects of azadirachtin on post-embryonic development, energy reserves and a-amylase activity of *Plodia*

31. Schaaf, O., Jarvis, A.P., van der Esch, S.A., Giagnacovo, G., Oldham, N.J. 2000. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography** 886: 89-97.
32. Schmidt, G.H., Ahmed, A.I., Breuer, M. 1997. Effect of *Melia azedarach* extract on larval development and reproduction parameters of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) (Lep. Noctuidae). **Journal of Plant Diseases and Protection** 70: 4-12.
33. Schmutter, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology** 35: 271-127.
34. Seljassen, R., Meadow, R. 2006. Effects of neem on oviposition and egg and larval development of *Mamestra brassicae* L: Doses response, residual activity, repellent effect and systemic activity in cabbage plants. **Crop Protection** 25: 338-345.
35. Sharma, V., Walia, S. Kumar, J., Nair, M.G., Parmar, B.S. 2003. An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 3966-3972.
36. Sharma, V., Walia, S., Dhingra, S., Kumar, J., Parmar, B.S. 2006. Azadirachtin-A and tetrahydroazadirachtin-A concentrates: preparation, LC-MS characterization and insect antifeedant/IGR activity against *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Pest Management Science** 62: 965-975.

37. Silva, P.R.F., Freitas, T.F.S. 2008. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural** 38: 843-851.
38. Stark, J.D., Walter, J.F. 1995. Neem oil and neem components affect the efficiency of commercial neem insecticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43: 507-512.
39. Venzon, M., Rosado, M.C., Fadini, M.A.M, Ciociola, A.I., Pallini, A. 2005. The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests. **Crop Protection** 24: 213-219.
40. Venzon, M., Rosado, M.C., Molina-Rugama, A.J., Duarte, V.S., Dias, R., Pallini, A. 2008. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). **Crop Protection** 27: 869–872.
41. Vianna, U.R., Pratisoli, D., Zanuncio, J.C., Lima, E.R., Brunner, J., Pereira, F.F., Serrão, J.E. 2009. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effects on descendent generation. **Ecotoxicology** 18: 180-186.
42. Walker, D.R., All, J.N., Mcpherson, R.M., Boerma, H.R., Parrott, W.A. 2000. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cryIAc* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology** 93: 613-622.
43. Zanuncio, J.C., Silva, C.A., Lima, E.R., Pereira, F.F., Ramalho, F.D., Serrão, J.E. 2008. Predation rate of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with and without defense by *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 51: 121-125.

44. Zanuncio, T.V., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C. 2003. Permethrin-induced hormesis on the predator *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). **Crop Protection** 22: 941-947.

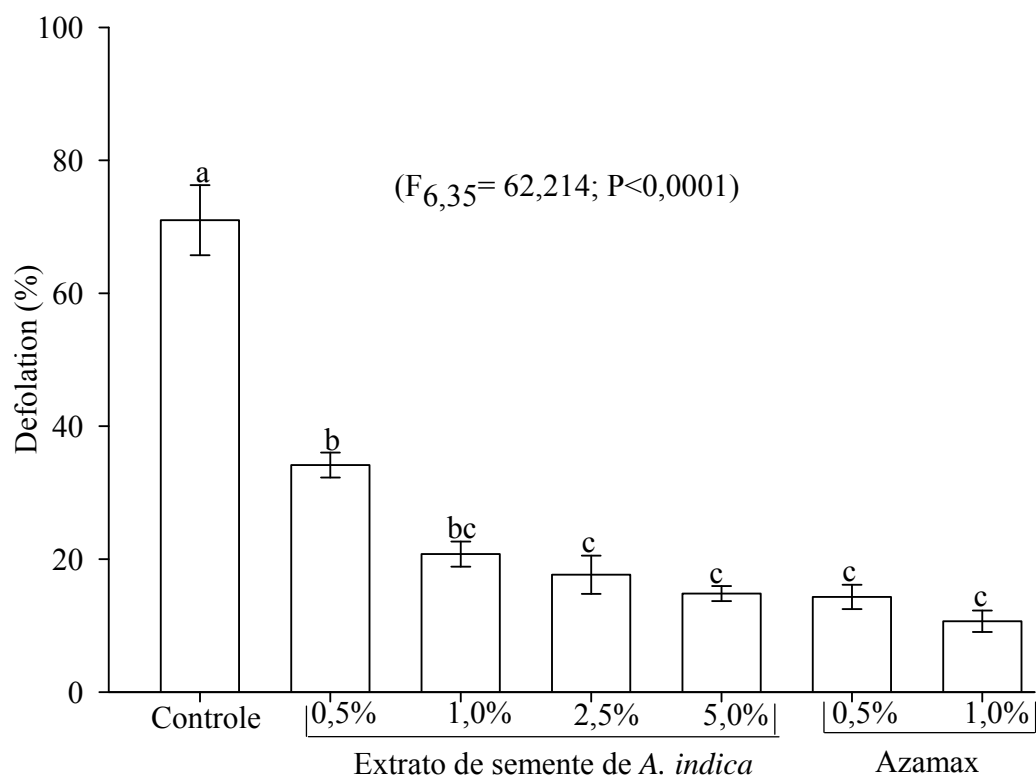


Figura 1. Desfolhamento em plantas de soja por *Anitacarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após aplicação de extrato etanólico de sementes *Azadirachta indica* e óleo comercial de nim, Azamax.

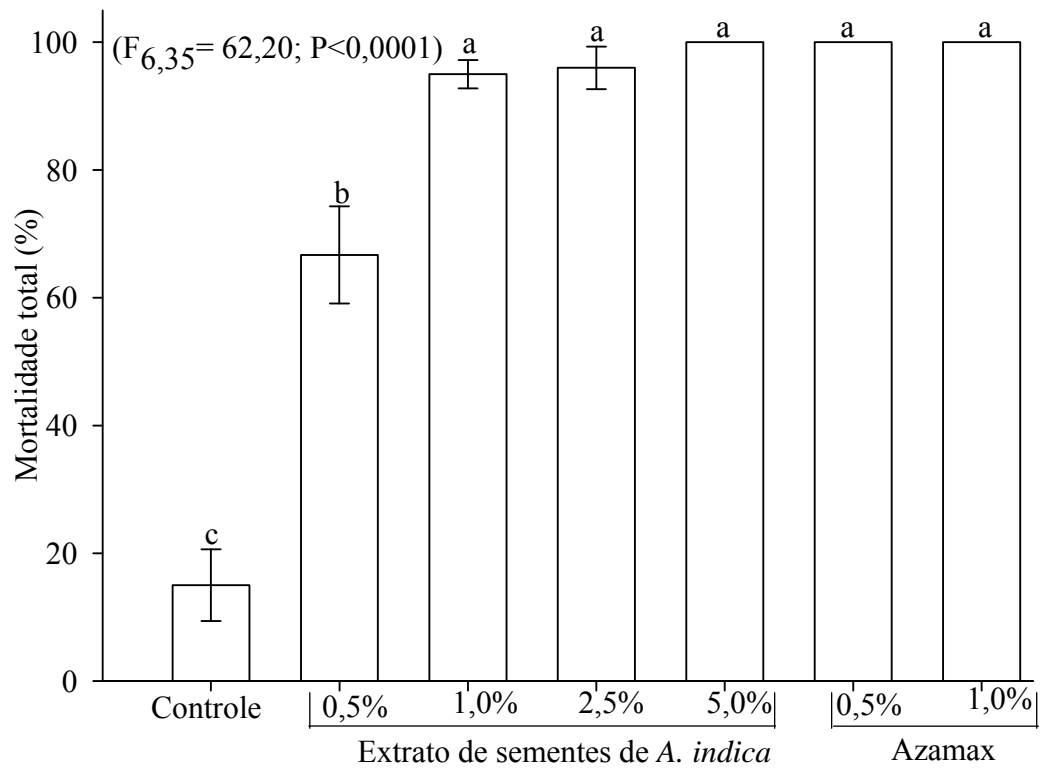


Figura 2. Mortalidade larval total de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) em plantas de soja tratadas com extrato de sementes de *Azadirachta indica* e óleo comercial de nim, Azamax.



Figura 3. Deformidade em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) após alimentação em plantas de soja controle (A) e tratadas com extrato de sementes de *Azadirachta indica* e óleo comercial, Azamax (B,C,D, E).