

EXTRATOS VEGETAIS

Efeito de Extratos Aquosos de *Azadirachta indica* e de *Trichilia pallida* sobre Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho

MARCOS R. CONCESCHI¹, THIAGO F. ANSANTE², FÁBIO MAZZONETTO¹, JOSÉ D. VENDRAMIM³, VERA L.M. SOSSAI¹, LUIZ C. PIZETTA¹, RENATO Z. CORBANI¹

¹ Universidade Camilo Castelo Branco - Av. Hilário da Silva Passos, 950, Jardim Universitário – Descalvado/SP – CEP: 13690-000. E-mail: marcosrconceschi@yahoo.com.br

² Universidade Estadual Paulista - Julio de Mesquita Filho. R. Nelson Brihi Badur, 430 - Vila Tupy – Registro/SP – CEP: 11900-000

³ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP. Av. Pádua Dias, 11 – Piracicaba/SP – CEP: 13418-900

BioAssay 6:1 (2011)

Effect of Aqueous Extracts from *Azadirachta indica* and *Trichilia pallida* on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize

ABSTRACT – Insecticidal plants have been studied as an alternative to control *Spodoptera frugiperda*, an important pest on maize. This work aimed to evaluate the effectiveness of the aqueous extracts from *Azadirachta indica* (EAI) and *Trichilia pallida* (ETP) on *S. frugiperda* fed on maize leaves (hybrid ZB 710) on different forms of application. Pieces of leaves (16 cm²) were immersed by 4 seconds and/or the caterpillars were sprayed with the extracts at the concentration of 5%, and thus transferred to glass tubes and the leaves and/or caterpillars were replaced every 24 h. The biological variables assessed were daily mortality, larval weight, measurements of head capsule width and lengths at the 5th day of evaluation. The design was wholly randomized, composed by seven treatments (control, leaves immersed in EAI, caterpillars sprayed with EAI, leaves immersed and caterpillars sprayed with EAI, leaves immersed in ETP, caterpillars sprayed with ETP, caterpillars sprayed and leaves immersed in ETP), with 40 repetitions per treatment. Results based on survival analysis and multivariate statistics showed that the values of larval mortality, weight, length, **and head capsule width** were significantly affected when submitted to treatment with immersed leaves and caterpillars sprayed with extract from *A. indica* and with leaves immersed in this extract.

KEYWORDS – Neem, catigua, insecticidal plants, fall armyworm, botanical extract.

RESUMO – Plantas inseticidas vêm sendo pesquisadas como uma alternativa para o controle de *Spodoptera frugiperda*, importante praga do milho. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência dos extratos aquosos de folhas de *Azadirachta indica* (EAI) e de *Trichilia pallida* (ETP) sobre lagartas de *S. frugiperda* alimentadas em folhas de milho (híbrido ZB 710) sob diferentes formas de aplicação. Pedacos de folhas (16 cm²) foram imersos por 4 segundos e/ou lagartas pulverizadas com os extratos na concentração de 5%, e então transferidos para tubos de vidro e as folhas e/ou lagartas foram tratadas a cada 24 h. As variáveis biológicas avaliadas foram mortalidade diária, peso larval, largura da cápsula cefálica e comprimento das lagartas no 5^o dia de avaliação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos (testemunha, folhas imersas em EAI, lagartas pulverizadas com EAI, folhas imersas e lagartas pulverizadas com EAI, folhas imersas em ETP, lagartas pulverizadas com ETP, folhas imersas e lagartas pulverizadas com ETP), e 40 repetições por tratamento. A partir dos resultados da análise de sobrevivência e estatística multivariada, verificou-se que a mortalidade, peso e comprimento das lagartas e a largura da cápsula cefálica foram significativamente afetados, quando submetidas aos tratamentos com folhas imersas e lagartas pulverizadas com extrato de *A. indica* e com folhas imersas neste extrato.

PALAVRAS-CHAVE – Nim, catiguá, plantas inseticidas, lagarta-do-cartucho, extrato botânico.

O gênero *Spodoptera* inclui a maioria das espécies pragas que constitui importância econômica para as diferentes culturas, nos diferentes países. No Brasil, a principal espécie é *S. frugiperda*, a qual pode causar redução na produção na ordem de 38% a 60% na produção de grãos (Bianco, 1991). Já segundo Ávila *et al.* (1997) as perdas podem chegar a até 100% da produção.

De acordo com Carvalho *et al.* (2008), inseticidas químicos têm sido empregados na agricultura com frequência e relativo sucesso, no entanto, podem provocar contaminação ambiental, presença de resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre inimigos naturais e seleção de populações de insetos resistentes.

O controle de pragas com a utilização de métodos de controle alternativos, especificamente com extratos vegetais, vem sendo estudado para minimizar o uso de inseticidas químicos. Tais métodos podem favorecer principalmente o pequeno agricultor, já que são de fácil utilização, não exigindo pessoal qualificado, são mais baratos e não afetam o meio ambiente, além de poderem ser produzidos na própria propriedade, facilitando a sua utilização (Mazzonetto & Vendramim, 2003).

Entre as principais plantas utilizadas com sucesso como fonte de substâncias inseticidas, destacam-se os gêneros *Nicotiana* (Solanaceae), produtor de nicotina e nornicotina; *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Leguminosae), produtores de rotenóides; *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtor de piretrinas e *Azadirachta* (Meliaceae), produtor de azadiractina (Lagunes & Rodríguez Hernández, 1992).

Pesquisas envolvendo plantas inseticidas evoluíram muito nas últimas décadas em todo o mundo, sendo que a de maior destaque é o nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae), com efeito comprovado sobre aproximadamente 400 espécies de insetos (Martinez, 2002). Embora a casca e as folhas desta planta também possuam compostos com atividade inseticida, é dos frutos e, especialmente das sementes, que se extrai o óleo, a principal fonte de azadiractina, que é o composto com maior ação sobre os insetos (Bruneton, 1995).

Prates *et al.* (2003) avaliaram a atividade inseticida do extrato aquoso das folhas de nim sobre *S. frugiperda*, e verificaram que algumas concentrações provocaram mortalidade de até 100% das lagartas.

Estudando o efeito de extratos aquosos de ramos e folhas de seis espécies de *Trichilia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. clausenii*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*) sobre lagartas de *S. frugiperda*, Bogorni & Vendramim (2003) verificaram, pelo menos uma das estruturas (ramos ou folhas), afetou o desenvolvimento do inseto. Os autores também verificaram que o extrato de folhas de *T. pallens* causou mortalidade larval semelhante à causada pelo extrato de nim, e que os extratos de ramos de *T. pallens* e de ramos e de folhas de *T. pallida*, embora menos eficientes, também reduziram a sobrevivência e o peso larval de *S. frugiperda*.

Já Tafur *et al.* (2007), utilizando extratos intra e extracelular de nim sobre *S. frugiperda* em folhas de milho, verificaram que o extrato intracelular inibiu em 100% a alimentação de lagartas de segundo ínstar e o extrato extracelular inibiu em cerca de 39,3% a alimentação das lagartas, prejudicando assim o desenvolvimento das mesmas.

O objetivo deste trabalho é comparar o efeito de diferentes formas de aplicação de extratos aquosos de *A. indica* e de *T. pallida* na sobrevivência e desenvolvimento da lagarta-do-cartucho *S. frugiperda* em folhas de milho.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Plantas Inseticidas, no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Para realização dos bioensaios, foram mantidas criações-estoque de lagarta-do-cartucho, em dieta artificial, seguindo a metodologia proposta por Greene *et al.* (1976).

Os materiais vegetais testados foram provenientes de coleta na área experimental da ESALQ. As folhas foram secas em estufa a 40°C , por 48h, sendo posteriormente trituradas em moinho de facas até obtenção de pó, que foi armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados. O preparo dos extratos foi realizado pela imersão de 5 g do pó em 100 mL de água destilada, agitação para homogeneização da amostra, manutenção em repouso por 24h, e posterior filtragem com tecido fino de *voile* para retirada do material sólido. Os extratos prontos foram utilizados em um período não superior a 24h após o preparo.

As plantas de milho (híbrido ZB 710) também foram cultivadas na referida área experimental, sendo que se deu preferência para a colheita da terceira folha pós-emergida, da qual foram cortadas seções de 16 cm^2 .

Os tratamentos utilizados foram: 1) testemunha (folhas imersas em água destilada); 2) folhas imersas em extrato de *A. indica*; 3) lagartas pulverizadas com extrato de *A. indica*; 4) folhas imersas e lagartas pulverizadas com extrato de *A. indica*; 5) folhas imersas em extrato de *T. pallida*; 6) lagartas pulverizadas com extrato de *T. pallida*; 7) folhas imersas e lagartas pulverizadas com extrato de *T. pallida*.

Depois de imersas, as folhas foram acondicionadas sobre papel filtro, deixando-se eliminar o excesso do extrato/água, sendo posteriormente colocadas em tubos de vidro de 8,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, juntamente com uma lagarta de primeiro ínstar, a qual havia anteriormente permanecido por um dia em dieta artificial.

As pulverizações das lagartas foram realizadas em placas de Petri com o fundo contendo papel filtro, com o auxílio de borrifador, para evitar o afogamento das

mesmas. A quantidade de solução foi padronizada para todos os experimentos.

As seções de folhas fornecidas às lagartas eram substituídas diariamente, ocasião em que se avaliava a mortalidade, o que foi feito até o quinto dia após a aplicação. No último dia de avaliação, as lagartas remanescentes foram pesadas, medidas em relação ao seu comprimento e à largura da cápsula cefálica através do aparelho medidor Wild (modelo-MMS 235).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e 40 repetições (tubos contendo uma lagarta) por tratamento.

Para a construção e comparação das curvas de sobrevivência, utilizou-se o estimador Kaplan-Meier não paramétrico, ao nível de 5%. A comparação entre essas curvas foi feita pelos testes de Log-rank, Wilcoxon e Tarone-Ware, considerado-se o nível de 5% de probabilidade. Para realização dessas análises foi utilizado o software estatístico XLSTAT versão 2008 (Kaplan & Meier 1958, Gehan 1965, Tarone & Ware 1977).

Uma análise multivariada de agrupamento foi realizada com o objetivo de agrupar os tratamentos semelhantes em relação às variáveis: número de lagartas, peso em gramas, comprimento de cápsula cefálica e comprimento das lagartas sobreviventes no quinto dia. Para a formação dos grupos, adotou-se o método de ligação por vizinho mais distante e a distância euclidiana, utilizando o software estatístico MVSP 3.1 (Mantel 1966, Johnson & Wichern 1992, Kovach 2005).

Para avaliar a significância entre as variáveis analisadas no último dia, foi utilizada a metodologia de Bonferroni (Bland & Altman, 1995). Também foi aplicada a correlação de Spearman entre essas variáveis, e verificada a aceitação pelo teste t de Student ao nível 0,05 de significância.

Resultados e Discussão

Sobrevivência larval. Pela análise de sobrevivência, pode-se verificar que, os tratamentos mais eficientes foram aqueles com *A. indica*, utilizando folhas imersas e lagartas pulverizadas, e somente folhas imersas, que não diferiram entre si, mas diferiram significativamente dos demais tratamentos quando comparadas as curvas de sobrevivência pelos testes de Log-rank, Wilcoxon e Tarone-Ware, sendo que estes testes apresentaram o mesmo resultado. A seguir, em termos de eficiência, situaram-se os tratamentos folhas imersas e lagartas pulverizadas de *T. pallida* e apenas folhas imersas de *T. pallida*. Os demais tratamentos não foram eficientes, já que o número de lagartas sobreviventes nestes tratamentos não diferiu do registrado na testemunha. Os maiores valores de mortalidade foram encontrados nos tratamentos com folhas imersas em extrato de *A. indica* (93%), folhas imersas e lagartas pulverizadas com *A. indica* (90%), folhas imersas e lagartas pulverizadas com *T. pallida* (48%), folhas imersas em extrato de *T. pallida* (33%), lagartas pulverizadas com *T. pallida* (15%), testemunha (13%) e lagartas pulverizadas com *A. indica* (10%) (Tabela 1).

Resultados semelhantes utilizando extrato aquoso de folhas de nim foram verificados por Prates *et al.* (2003), com a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* chegando a 100% quando utilizou-se a concentração de 10 mg mL⁻¹ em dieta artificial. Góes *et al.* (2003) também verificaram que o extrato mais eficiente no controle de *S. frugiperda* foi o de nim, sendo que os autores também concluíram que o extrato impediu a ecdise do inseto. A probabilidade de sobrevivência das lagartas até o dia “t”, evidenciam a redução de sobrevivência larval com o decorrer dos dias de avaliação (Figura 1).

Tabela 1. Mortalidade de lagartas (ML), peso larval (PL), comprimento larval (CL) e largura da cápsula cefálica (LCC) de *Spodoptera frugiperda*, no quinto dia do teste (25±2°C, UR 60±10% e fotofase de 14 h).

Tratamentos	ML (%) ¹	PL (mg) ²	CL (mm) ²	LCC (mm) ²
Folhas imersas <i>A. indica</i>	93 a	0,43 de	3,01 c	0,33 c
Folhas imersas e lagartas pulverizadas <i>A. indica</i>	90 a	0,50 de	2,67 cd	0,43 c
Folhas imersas e lagartas pulverizadas <i>T. pallida</i>	48 b	0,33 e	2,28 d	0,37 c
Folhas imersas <i>T. pallida</i>	33 b	0,51 d	2,48 cd	0,40 c
Lagartas pulverizadas <i>T. pallida</i>	15 bc	1,69 b	3,90 b	0,59 b
Testemunha	13 c	2,64 a	4,43 a	0,64 a
Lagartas pulverizadas <i>A. indica</i>	10 c	1,32 c	3,75 b	0,58 b
CV	12,3%	14,8%	9,8%	11,0%

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelos testes Log-rank, Wilcoxon e Tarone-Ware (P ≤ 0,05). Os três testes apresentaram o mesmo resultado.

² Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Bonferroni (P ≤ 0,05).

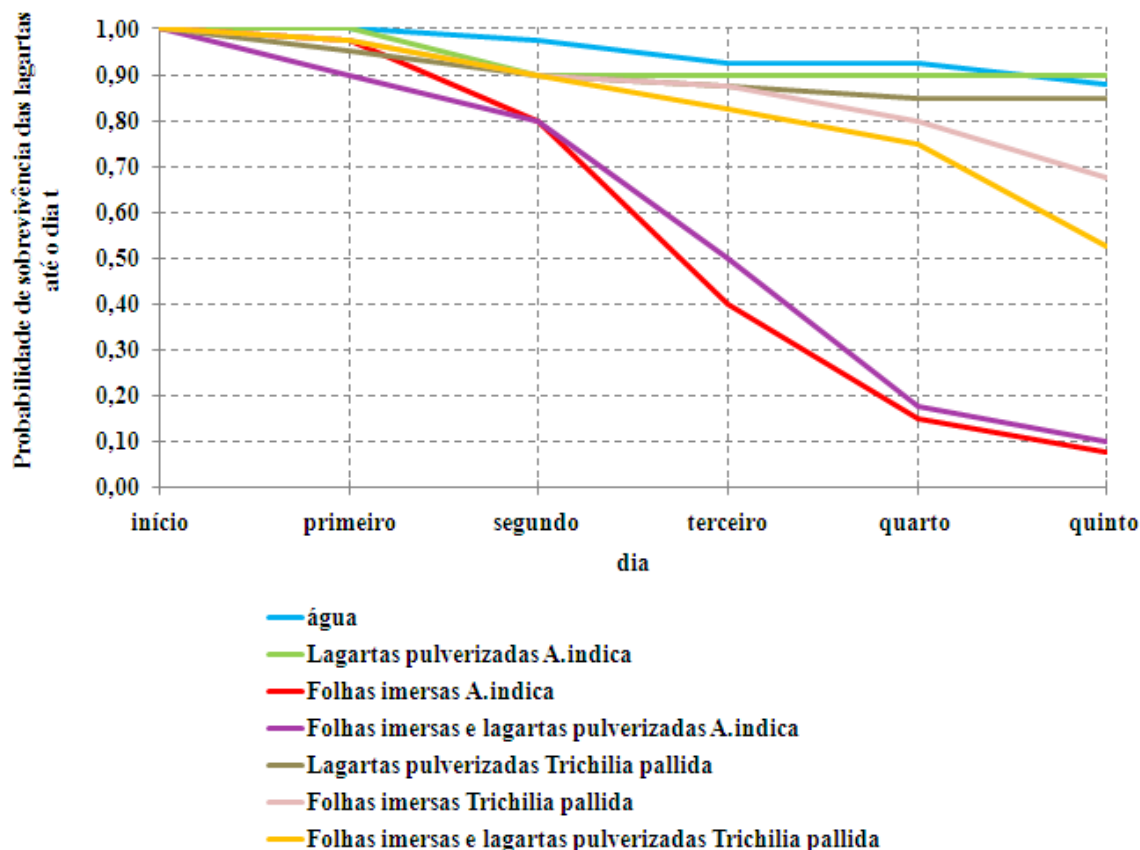


Figura 1. Probabilidade de sobrevivência das lagartas em cada dia de teste segundo o método de Kaplan Meier.

Desenvolvimento larval. Entre as variáveis analisadas no último dia (Tabela 1) observa-se que a testemunha diferiu dos demais tratamentos para peso de lagartas, largura da cápsula cefálica e comprimento de lagartas.

As lagartas menos pesadas, com menor comprimento e com menor largura da cápsula cefálica foram encontradas nos tratamentos folhas imersas e lagartas pulverizadas com extrato de *T. pallida*, folhas imersas em extrato de *A. indica*, folhas imersas e lagartas pulverizadas com *A. indica* e folhas imersas em extrato de *T. pallida* cujos valores médios diferiram significativamente dos demais tratamentos. Num segundo grupo situaram-se as lagartas obtidas nos tratamentos lagartas pulverizadas com *A. indica* e lagartas pulverizadas com *T. pallida*, cujos valores, para os três parâmetros, também foram inferiores aos registrados na testemunha.

Assim, verifica-se uma concordância entre as quatro variáveis utilizadas quando submetidas à análise de Cluster para a discriminação dos tratamentos no último dia de teste. Estes resultados podem ser visualizados pelos coeficientes de correlação de Spearman, ou seja, quando o percentual de mortalidade aumenta, há uma tendência à redução do peso, do comprimento larval, e da largura da cápsula cefálica das lagartas sobreviventes (Tabela 2).

Ao se adotar o método de ligação por vizinho mais distante e a distância euclidiana como uma técnica multivariada para medir o grau de proximidade entre os tratamentos (Figura 2), as distâncias menores indicaram maior similaridade entre os tratamentos com folhas imersas e lagartas pulverizadas com *A. indica* e folhas imersas em *A. indica*, sendo que estas formaram um grupo separado dos demais tratamentos.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Spearman, segundo as variáveis analisadas no quinto dia de teste (25±2°C, UR 60±10% e fotofase de 14 h).

Variáveis	Número de lagartas sobreviventes	Peso (mg)	Largura da cápsula cefálica (mm)
Peso (mg)	0,86 ¹		
Largura da cápsula cefálica (mm)	0,86 ¹	0,93 ¹	
Comprimento (mm)	0,64	0,86 ¹	0,79 ¹

¹ Aceitação da correlação existente entre as variáveis, segundo o teste t de Student (P ≤ 0,05).

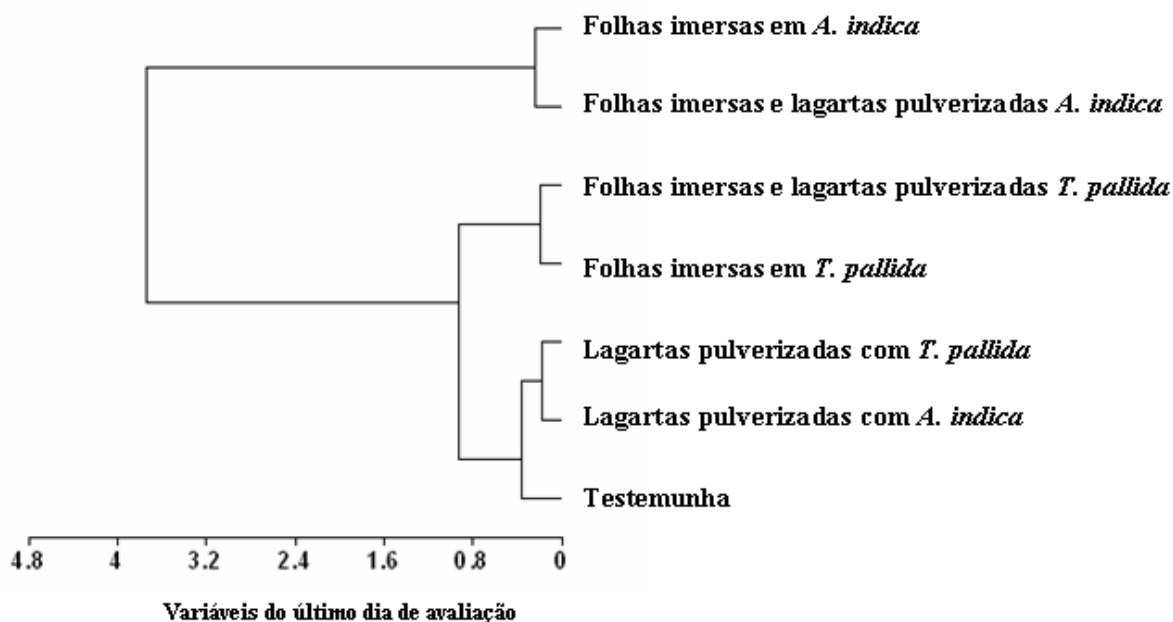


Figura 2. Dendrograma de agrupamento de tratamentos, obtido da análise de agrupamento utilizando o método de ligação por vizinho mais distante e a distância euclidiana das variáveis: número de lagartas, peso em gramas, largura da cápsula cefálica (mm) e comprimento (mm) das lagartas sobreviventes no quinto dia (transformado por \sqrt{x}).

Os resultados obtidos sugerem que o efeito do extrato de nim não se dá devido ao contato com o inseto, mas sim devido ao consumo das folhas tratadas. Schmutterer (1990) descreve que a ação da azadiractina, principal substância presente em plantas de *A. indica*, interfere diretamente no processo de renovação celular, crescimento e ecdise, resultando na mortalidade larval de *S. frugiperda*.

Bioensaios utilizando extratos aquosos, realizados por Torrecillas & Vendramim (2001), mostraram que ramos de *T. pallida* apresentaram forte atividade inseticida sobre *S. frugiperda*, reduzindo a viabilidade larval, com prolongamento desta fase, além da diminuição do peso destas. Resultados semelhantes foram obtidos por Roel et al. (2000), utilizando extratos não aquosos (acetona e metanol), onde o extrato metanólico apresentou melhor efeito sobre a lagarta.

De acordo com os resultados baseados na análise de sobrevivência e análise estatística multivariada, pode-se verificar que a mortalidade das lagartas e os baixos valores obtidos em outras variáveis (peso e comprimento das lagartas e largura da cápsula cefálica) foram significativamente afetados quando estas foram submetidas aos tratamentos com folhas imersas e lagartas pulverizadas com *A. indica* e folhas imersas em extrato de *A. indica*.

Literatura Citada

Ávila, C.J., P.E. Degrande, S.A. Gómez. 1997. Insetos pragas: reconhecimento, comportamento, danos e

controle. EMBRAPA: Milho informações técnicas, 157-180p.

Bianco, R. 1991. A cultura do milho no Paraná. Londrina, IAPAR, Circular Técnico, 68: 290p.

Bland, J. M. & D.G. Altman. 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. British Med. J. 310: 170.

Bogorni, P.C. & J.D. Vendramim. 2003. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Neotrop. Entomol. 32: 665-669.

Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Andover: Intercept/ Paris: Lavoisier. 915p.

Carvalho, G.A., N.M. Santos, E.C. Pedroso & A.F. Torres. 2008. Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. *acephala*. Arq. Inst. Biol. 75: 181-186.

Gehan, E.A. 1965. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. Biometrika 52: 203-223.

Góes, J.B., D.K.P. Neri, J.W.N. Chaves & P.B. Maracajá. 2003. Efeito de extratos vegetais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Caatinga 16: 47-49.

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

- Johnson, R.A. & D.W. Wichern. 1992. Applied multivariate statistical analysis. 3 ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall. 642p.
- Kaplan, E.L., P. Meier. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. J. Am. Stat. Assoc. 53: 457-481.
- Kovach, W.L., 2005. MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
- Lagunes, T.A. & C. Rodríguez-Hernández. 1992. Los extractos acuosos vegetales con actividad insecticida: el combate de la conchuela del frijol. Texcoco: USAID-CONACYT-SIME-CP. 57p. (Temas Selectos de Manejo de Insecticidas Agrícolas, 3).
- Mantel, N. 1966. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemother. Rep. 50: 163-170.
- Martinez, S.S. 2002. O nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, IAPAR, 142p.
- Mazonetto, F. & J.D. Vendramim. 2003. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. Neotrop. Entomol. 32: 145-149.
- Prates, H.T., P.A. Viana & J.M. Waquil. 2003. Atividade de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. Pesq. Agropec. Bras. 38: 437-439.
- Roel, A.R., J.D. Vendramim, R.T.S. Frighetto & N. Frighetto. 2000. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). An. Soc. Entomol. Brasil 29: 799-808.
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- Tafur, J.C., F.O. Sánchez, R.V. Ruiz & R.H. Sánchez. 2007. Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith en condiciones de laboratorio. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 60: 3703-3715.
- Tarone, R.E. & J.H. Ware. 1977. On distribution-free tests for equality for survival distributions. Biometrika. 64: 156-160.
- Torrecillas, S.M. & J.D. Vendramim. 2001. Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. Sci. Agric. 58: 27-31.