

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO PIROLENHOSO OBTIDO DE *Saccharum officinarum* L. (Poaceae)
E ENSAIO BIOLÓGICO SOBRE LAGARTAS *Spodoptera frugiperda* SMITH (LEPIDOPTERA).

Douglas Antunes Freitas Ferreira
Orientador: Carlos Alexandre Carollo

Campo Grande
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO PIROLENHOSO OBTIDO DE *Saccharum officinarum* L. (Poaceae)
E ENSAIO BIOLÓGICO SOBRE LAGARTAS *Spodoptera frugiperda* SMITH (LEPIDOPTERA).

Douglas Antunes Freitas Ferreira

Orientador: Carlos Alexandre Carollo

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Campo Grande

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus onipotente que me guia e me ilumina em todas as horas.

Aos meus pais, Diocir Aparecido e Eunice Maria por me orientar e me amar incondicionalmente.

Ao meu irmão Bruno Antunes, amigo e companheiro e minha cunhada Rosimeri Ferreira.

A minha namorada Carliane Moreira pela paciência, compreensão, amor e pela ajuda com o projeto.

Aos meus avós João Machado e Maria Alice que se orgulham de mim e torcem por minha vitória.

A minhas tias e tios por sempre serem meus parceiros.

Aos meus amigos Paulo Eduardo e Wesley Cristiano por serem amigos verdadeiros e companheiros.

Aos colegas que faço por onde passo, que muito acrescentam na minha vida.

Ao programa de Pós-graduação Biologia Vegetal pela estrutura e condições para realizar minha formação.

Ao Laboratório de Farmacognosia que conheci pessoas que me ajudaram e me orientaram agregando experiência acadêmica.

Ao Professor Doutor Carlos Alexandre Carollo por me orientar, ensinar e ajudar com meu amadurecimento acadêmico, saio da Pós-graduação com limites superados graças a confiança que teve comigo.

Aos doutores Doroty Mesquita Dourado, Rosemary Matias, Silvio Favero, Maria Lígia Rodrigues, Antonio Pancrácio de Souza, Edson dos Anjos dos Santos, Maria Rita Marques por me ajudarem durante o meu estudo e por me darem apoio com espaço físico para a realização do projeto.

Aos técnicos de laboratório Karen dos Santos, Maria Helena, Amanda Boaretto e João Fabri pela ajuda e experiência compartilhada.

RESUMO

O controle do inseto-praga *Spodoptera frugiperda* são realizados por inseticidas sintéticos, levando a um aumento da resistência. Uma alternativa é a utilização do extrato pirolenhoso obtido a partir do bagaço da cana que esta disponível em grande quantidade e se caracteriza pela produção de compostos inseticidas durante sua queima. No presente estudo, o extrato pirolenhoso foi obtido pela pirólise do bagaço da cana e condensamento da fumaça. O extrato bruto foi neutralizado e fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). As três frações foram analisadas em CG/EM, sendo identificados 70 compostos (sendo majoritários da fração hexano: 2,3-diidrobenzofurano (14,64%), 2,6-dimetoxifenol (10,71%), 4-vinil-2-metoxifenol (10,36%); fração clorofórmio: 1-(2-furanyl)-1-propanona (6,37%), 2,3-dimetil-2-ciclopentanona-1 (3,85%), 3-etil-2-hidroxi-2-ciclopentanona-1 (3,05%); fração acetato de etila: ácido tetradecanóico (17,91%), etílico crotonato (13,34%), 1,4-dimetoxibenzeno (12,79%). Subsequentemente, as três frações foram avaliadas quanto a sua atividade inseticida sobre *S. frugiperda* (nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 e 1%). Houve a diminuição da massa corpórea nas três frações induzidas por alterações histomorfológicas principalmente na fração hexano. A mortalidade foi elevada (acima de 94%) nas concentrações 0,5 e 1% da fração hexânica causando diminuição de indivíduos em todas as fases em uma crescente dose-resposta. A fração hexânica demonstrou maior efeito no controle da *S. frugiperda*, possivelmente por ter compostos de menor polaridade, que possuem uma maior facilidade de atravessar barreiras como a membrana plasmática, o que acarreta em uma maior resposta biológica, outro fator pode estar relacionado ao efeito sinérgico dos compostos desta fração.

Palavras-chave: Vinagre da madeira, extrato pirolenhoso, inseticida, *Saccharum officinarum*, lagarta-do-milho

ABSTRACT

The control of insect pest *Spodoptera frugiperda* is made by synthetic insecticides, leading to an increase in resistance. An alternative is to use the pyroligneous extract obtained from sugarcane bagasse which is available in large quantities and is characterized by the production of insecticidal compounds for their burning. In the present study, the pyroligneous extract was obtained by pyrolysis of sugarcane bagasse and condensing the smoke. The crude extract was neutralized and fractionated with solvents of increasing polarity (hexane, chloroform and ethyl acetate). The three fractions were analyzed by GC/MS, 70 compounds were identified majority being the hexane fraction: 2,3- dihydrobenzofurano (14,64 %), 2,6-dimethoxyphenol (10,71 %) 4-vinyl-2-methoxyphenol (10,36 %), chloroform fraction: 1-(2-furanyl)-1-propanone (6,37 %), 2,3-dimethyl-2-cyclopentanone-1 (3,85 %), 3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentenone-1 (3,05 %), the ethyl acetate fraction: tetradecanoic acid (17,91 %), ethyl crotonate (13,34 %), 1,4-dimethoxybenzene (12,79 %). Subsequently, the three fractions were evaluated for their insecticidal activity against *S. frugiperda* (at concentrations of 0,1, 0,25, 0,5 and 1 %). There was a decrease in mass the three body histomorphological changes induced mainly in fractions hexane fraction. Mortality was high (above 94 %) concentrations of 0,5 and 1 % decrease causing hexane fraction of individuals in all stages at an increasing dose-response. The hexane fraction showed a greater effect in the control of *S. frugiperda*, possibly due to less polar compounds, which have a greater ease of crossing barriers such as the plasma membrane, resulting in a greater biological response, another factor may be related to the effect synergistic compounds of this fraction.

Keywords: Wood vinegar, pyroligneous extract, insecticide, *Saccharum officinarum*, fall armyworm

ÍNDICE

Capítulo 1	7
REVISÃO DE LITERATURA	8
Referências Bibliográficas	12
Capítulo 2	18
ARTIGO PUBLICADO	19
Abstract	19
Introdução	19
Material e Métodos	21
Resultados e Discussão	21
Referências Bibliográficas	24
Capítulo 3	31
ARTIGO A PUBLICAR	32
Abstract	32
Introdução	33
Material e Métodos	33
Resultados	35
Discussão	41
Conclusões	42
Agradecimentos	43
Referências Bibliográficas	43
ANEXOS	46
Informação complementar	46
Normas da revista para publicação	48

Capítulo 1

REVISÃO DA LITERATURA

O Brasil se destaca entre os produtores de *commodities*, sendo responsável por aproximadamente 10% da atual produção mundial. Estes produtos incluem café, arroz, tubérculos, trigo e principalmente a cana-de-açúcar com produção anual de 7,2 milhões de toneladas (FAOSTAT 2014). Além disso, o Brasil tem uma demanda por biocombustíveis, forragens e gado cada vez mais elevada, tendo que otimizar a produção por área de plantio (Biello 2008).

Um fator limitante para o aumento da produção agrícola são os insetos-praga que interferem no cultivo, armazenagem e distribuição de produtos agrícolas gerando grandes perdas anuais (Kamaraj et al. 2008). Destaca-se a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho, comum em vários países no continente americano (Sueldo et al. 2010) incluindo Argentina, Brasil, México e Estados Unidos (Figueiredo et al. 2006) que afeta o desenvolvimento da planta em todas as fases (Rios-Díez e Saldamando-Benjumea 2011).

Este inseto polífago, alimenta-se de uma grande variedade de espécies de culturas agrícolas, sendo cerca de 80 espécies de vegetais incluindo o algodão (Gallo et al. 2006), arroz, milho (Fescemyer et al. 2013), sorgo, trigo, alfafa, feijão, amendoim, tomate, batata, espinafre, abóboras e repolho (Figueiredo et al. 2006)

As mariposas fazem posturas em média de 150 ovos esféricos (Santos et al. 2004) em camadas irregulares sobrepostas na superfície superior das folhas dos vegetais (Beserra et al. 2002). Os ovos podem exibir diferentes cores que vão desde cinza-azulada para esverdeada nos recém-postos e marrom-avermelhado no final do desenvolvimento embrionário (Cônsoi et al. 1999) apresentando período de incubação de 2 a 3 dias à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas (Santos et al. 2004).

Com a infestação do inseto na planta é possível observar a presença de agregados de lagartas perto do local da postura dos ovos que se alimentam inicialmente do limbo foliar (Albiero et al. 2006) e em estágios mais tardios se dispersam agressivamente dentro e entre as plantas adjacentes (Ali et al. 1990) alimentando-se também das estruturas de frutificação (Morrill e Greene 1973), diminuindo a produtividade da espécie vegetal cultivada.

Para atenuar os danos causados pelos insetos-praga, geralmente são utilizados inseticidas sintéticos, tais como piretróides e organofosfatos que, apesar de serem eficientes, podem acarretar diversos problemas, como a presença de resíduos nos alimentos acima dos limites permitidos por lei (Roel et al. 2000), intoxicações aos aplicadores (Berlitz 2012), baixa seletividade entre as espécies (Muñoz et al. 2013), surtos de pragas secundárias no ambiente (Abudulai 2001), efeitos colaterais em inimigos naturais (Guedes et al. 2009) e resistência a muitos inseticidas (Virla et al. 2008).

Várias pesquisas sobre interação inseto-planta vêm sendo realizadas buscando novas alternativas para substituir parcial ou integralmente os inseticidas sintéticos (Corzo et al. 2012; Ribeiro et al. 2012). Os vegetais ao longo de todo seu ciclo de vida sofrem interferências abióticas que são relacionadas com o clima, exposição ao sol, chuvas e altas temperaturas, e interferências bióticas que são provocadas por organismos heterotróficos, que dependem da energia fixada pelas plantas autotróficas para se alimentarem. E como os vegetais são organismos sésseis, devem empregar estratégias para se defender de predadores (Mithöfer 2012).

Numerosas estratégias são baseadas na enorme diversidade química dos vegetais, por exemplo, a capacidade de sintetizar mais de 200.000 compostos estimados, a que se refere em metabólitos especializados, que evoluem em resposta a determinadas adversidades ecológicas (Pichersky e Lewinsohn 2011; Suqi et al. 2014).

Estas substâncias pertencem a várias classes químicas, tais como terpenoides incluindo mono-, sesqui-, di-, e triterpenóides, bem como alcaloides e compostos fenólicos incluindo flavonoides, fenilpropanoides e outros (Mithöfer, 2012).

Esses produtos de origem vegetal apresentam como vantagens a baixa toxicidade em mamíferos, ausência de ação neurotóxica, baixa persistência no meio ambiente e alta biodegradabilidade (Céspedes 2005). Atuam em insetos como deterrêntes e reguladores de crescimento, afetando o sistema nervoso, os tecidos do sistema digestório e muscular (Senthil-Nathan et al. 2008), provocando ruptura de membranas, inibição de nutrientes e transporte de íons, inibição dos processos de transdução de sinal, inibição do metabolismo e/ou a interrupção do controle hormonal dos processos fisiológicos (Mumm e Hilker 2006; Wittstock e Gershenzon 2002).

Uma alternativa envolvendo derivados de origem natural são os extratos pirolenhosos (Azevedo et al. 2007), um subproduto orgânico da cultura japonesa (Tsuzuki et al. 2000) resultante da condensação da fumaça expelida no processo de carbonização da madeira (Mendonça et al. 2006), sendo conhecido como vinagre de madeira, ácido pirolenhoso (Bubonja-Sonje et al. 2011) e bio-óleo (Czernik e Bridgwater 2004; Maiti et al. 2006).

Quando materiais de origem vegetal são submetidos a reações de pirólise seguido de condensação, ocorre a conversão de biomassa em produtos líquidos, que pode ser usado como matéria-prima para combustíveis e valiosos produtos químicos (Czernik e Bridgwater 2004; Maiti et al. 2006; Peng e Wu 2010; Putun et al. 2008). Durante a pirólise os metabólitos são quebrados para produzir compostos menores, enriquecendo a fração volátil (Souza 2012). Os dissacarídeos presentes no substrato são degradados termicamente em cetonas, álcoois e derivados furano e pirano (Ninomiya et al. 2004). As ligninas são convertidas em fenóis, guaiacóis, siringois e pirocatecois e seus derivados; também ocorre a formação de água, ácido acético e compostos nitrogenados (Guillén e Manzanos 2002).

Na literatura são encontrados estudos investigando extratos pirolenhosos a partir do eucalipto (Pimenta et al. 2000), carvalho (Guillén e Manzanos 2002), bambu (Kim et al. 2008). O Biopiról® (Biocarbo, Itabirito, MG, Brazil) apresentou efeito bactericida (Steiner et al. 2008), o extrato obtido a partir de *Betula sp.* possui atividade moluscida (Lindqvist et al. 2010), o do bambu atividade germicida em Picornavirus (Marumoto et al. 2012), da *Saccharum officinarum* L. atividade inseticida em *Spodoptera frugiperda* (Ferreira et al. 2013), e o extrato pirolenhoso de *Vitex pubescens* Vahl atividade antifúngica (Oramahi 2013).

Uma forma de o extrato pirolenhoso agir no organismo dos insetos é através do canal alimentar que é o segundo maior órgão no corpo de um inseto. O canal alimentar representa uma área de contato entre o organismo e o meio ambiente, sendo o foco de grande parte das pesquisas para se compreender o mecanismo de interação com o inseticida e controlar o ataque de pragas (Levy et al. 2004).

O canal alimentar (Figura 1) dos insetos da ordem Lepidoptera consiste em três zonas, estomodeu, proctodeu e mesêntero onde as células epiteliais estão envolvidas nos processos de absorção

de nutrientes e secreção de enzimas (células colunares), homeostase iônica (células caliciformes) e na renovação do epitélio (células regenerativas) (Chiang et al. 1986; Hakim et al. 2010; Sousa et al. 2009) com pH alcalino (8 -12) em insetos Lepidoptera (Dow 1992).

O mecanismo de defesa na região do mesêntero contra danos mecânicos, barreira contra toxinas e patógenos é a matriz peritrófica (Hegedus et al. 2009), referida pela primeira vez por Balbiani (1890). A matriz peritrófica esta presente na maioria dos insetos com exceção à ordem Hemiptera e Thysanoptera da classe Insecta (Kitajima 1975; Lane e Harrison 1979; Silva et al. 2004) e ausente em adultos de Lepdopteras (Lehane 1997).

A matriz peritrófica é uma membrana porosa formada pela secreção de proteínas, quitina e glicosaminoglicanos (Hegedus et al. 2009; Toprak et al. 2010a) e são classificada como Tipo I e Tipo II (Ryerse et al. 1992). A do Tipo I é formada por secreção de células espalhadas por toda extensão do mesêntero, sendo encontrados em Coleoptera e larvas de Lepidoptera como na *S. frugiperda* (Waterhouse 1957; Bolognesi et al. 2001). A do Tipo II é formada por células que estão localizadas na porção anterior do mesêntero e são encontrados em alguns Lepidopteras e em larvas de Diptera (Wigglesworth 1930).

A matriz peritrófica está posicionada entre o conteúdo alimentar, chamado de espaço endoperitrófico e abaixo forma o espaço ectoperitrófico preenchido geralmente por enzimas (amilase, carboxipeptidase, aminopeptidase, lipase, quimotripsina e tripsina) (Toprak et al. 2008) e substâncias relacionados com a digestão e defesa. Local de ação primária dos produtos naturais de plantas que podem produzir alterações histológica no mesêntero dos insetos quando incorporados a dieta das lagartas. As alterações no canal alimentar afeta o crescimento e desenvolvimento de insetos como resultado de alterações fisiológicas no qual a absorção e transformação de alimentos estão envolvidos (Sousa et al. 2009).

Uma possibilidade de extrato pirolenhoso é o obtido pela combustão do bagaço de *Saccharum officinarum* L. (Poaceae), conhecida como cana-de-açúcar e por ser a principal matéria-prima utilizada para produzir etanol (Kohlhepp 2010) e o açúcar. Apesar desta fonte de combustível se caracterizar por um baixo impacto ambiental, a larga escala de produção gera uma grande quantidade de resíduos, como o vinhoto (De Resende et al. 2006) que é aplicada ao solo como uma fonte de nutrientes que possui matéria orgânica e água, contribuindo para a produtividade de culturas agrícolas (Santos et al. 2011 e o bagaço da cana-de-açúcar é utilizado como adubo para o solo (Hsu et al. 2010) e na produção de energia elétrica em termoelétricas (Balat et al. 2009).

Quando ocorre a pirólise do bagaço, há a liberação de poluentes na atmosfera, o que é comum na indústria sucroalcooleira. Porém esta fumaça pode ser condensada e dar origem a um extrato pirolenhoso, agregando um novo produto para indústria sucroalcooleira (Goes et al. 2008). Além de reduzir problemas ambientais causados pela emissão de gases (Tsuzuki et al. 2000).

Assim, neste presente trabalho temos como objetivo a avaliação química e caracterização de novas frações (fração hexano, fração clorofórmio e fração acetato de etila) em cromatografia gasosa acoplada em espectrometria de massas, testar o efeito das frações sobre as lagartas observando a massa corpórea das lagartas, a taxa de pupação e de mariposas e o efeito na histomorfologia do mesêntero.

Assim, os resultados deste trabalho servirão de base para um novo produto ao setor sucroalcooleiro e consequentemente contribuirão com a diminuição da emissão de gás carbônico para a atmosfera.

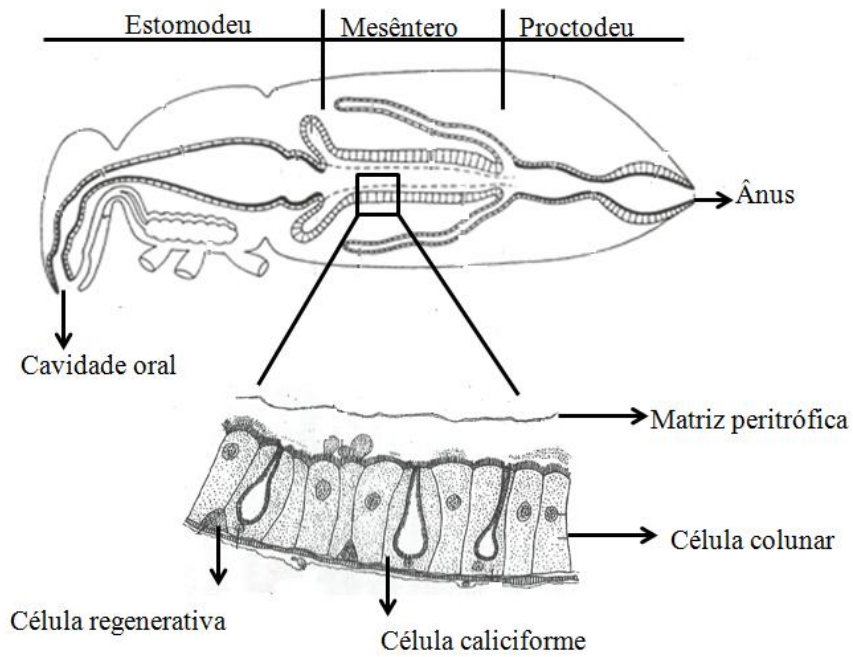


Figura 1: Sistema digestório da lagarta *Spodoptera frugiperda* (Gallo et al. 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abudulai MBM, Shepard PL, Mitchell (2001) Parasitism and predation on eggs of *Leptoglossus phyllopus* (L.) (Hemiptera: Coreidae) in cowpea: impact of endosulfan sprays. *J Agric Urban Entomol* 18:105-115.

Albiero ALM, Paoli AAS, Souza LA, Mourão KSM (2006) Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). *Rev Bras Farmacogn* 16:42-52.

Ali A, Luttrell RG, Pitre HN (1990) Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. *Environ Entomol* 19:1060-1067.

Azevedo FR, Leitão ACL, Lima MAA, Guimarães JA (2007) Eficiência de produtos naturais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fab.) em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) armazenado. *Rev Ciên Agron* 38:182-187.

Balat M, Balat M, Kırtay E, Balat H (2009) Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. *Energy Convers Manage* 50:3147-3157.

Balbani EG (1890) Études anatomiques et histologiques sur le tube digestif des *Cryptops*. *Arch Zoo Exp Gen* 8:1-82.

Berlitz DL, Azambuja AO, Sebben A, Oliveira JV, Fiuza LM (2012) Mortality of *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (J E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae exposed to *Bacillus thuringiensis* and extracts of *Melia azedarach*. *Braz Arch Biol Techn* 55:725-731.

Beserra EB, Dias MD, Parra JRP (2002) Distribution and natural parasitism of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at different phenological stages of corn. *Fla Entomol* 85:588-593.

Biello D (2008) Biofuels are bad for feeding people and combating climate change. *Scientific American*. <http://www.scientificamerican.com/article/biofuels-bad-for-people-and-climate/>. Acessado 17 março 2014.

Bolognesi R, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C (2001) The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol* 47:62-75.

Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M (2011) Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, coco a and rosemary extract polyphenols. *Food Chem* 127:1821-1827.

Céspedes CL, Salazar JR, Martínez M, Aranda E (2005) Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochem* 66:2481-2493.

Cônsoli FL, Kitajima EW, Parra JRP (1999) Ultrastructure of the natural and factitious host eggs of *Trichogramma galloi* Zucchi and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 28:211-229.

Chiang AS, Yen DF, Peng WK (1986) Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 47:333-339.

Corzo FL, Gilabert M, Alcaide MF, Bardón A (2012) Toxicity of Porella chilensis Sesqui- and Diterpenoids against Larvae of the Corn Pest *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop Entomol* 41:414-419.

Czernik S, Bridgwater AV (2004) Overview of applications of biomass fast pyrolysis oil. *Energy & Fuels* 18:590-598.

De Resende AS, Santos A, Xavier RP, Coelho CH, Gondim A, Oliveira OC, Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S (2006) Efeito da queima da palhada da cana-de-açúcar e de aplicações de vinhaça e adubo nitrogenado em características tecnológicas da cultura. *R Bras Ci Solo* 30:937-941.

Dow JAT (1992) pH gradients in the Lepidopteran midgut. *J exp Biol* 172: 355-375.

Ferreira DAF, Ferreira MB, Favero S, Carollo CA (2013) Biological activity of sugarcane pyrolygneous acid against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Afr J Biotechnol* 12:6241-6244.

Fescemyer HW, Sandoya GV, Gill TA, Ozkan S, Marden JH, Luthe DS (2013) Maize toxin degrades peritrophic matrix proteins and stimulates compensatory transcriptome responses in fall armyworm midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 43:280-291.

Figueiredo MLC, Dias AMPM, Cruz I (2006) Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. *Pesqui Agropecu Bras* 41:1693-1698.

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical (2014) Production. Publicado FAOSTAT 2014. http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/*E. Acessado 17 março 2014

Gallo D, Nakano O, Silveira NS, Carvalho RPL, Batista GC, Berti FE, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB (2002) *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, FEALQ, pp 919

Gallo MBC, Rocha WC, Da Cunha US, Diogo FA, Da Silva FC, Vieira PC, Vendramim JD, Fernandes JB, Da Silva MFGF, Pereira LGB (2006) Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vivex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneuena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 62:1072-1081.

Goes T, Marra R, Silva GS (2008) Setor sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas. *Rev Pol Agr* 17:39-51.

Guedes RNC, Magalhães LC, Cosme LV (2009) Stimulatory Sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormesis, hormoligosis, or homeostatic regulation? *J Econ Entomol* 102:170-176.

Guillén MD, Manzanos MJ (2002) Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chem* 79:283-292.

Hakim RS, Baldwin K, Smagghe G (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu Rev Entomol* 55:593-608.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol* 54:285-302.

Hsu DD, Inman D, Heath GA, Wolfrum EJ, Mann MK, Aden A (2010) Life cycle environmental impacts of selected US ethanol production and use pathways in 2022. *Env Sc & Tech* 44:5289-5297.

Kamaraj C, Rahuman AA, Bagavan A (2008) Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. **Parasitol Res** 103:325-331.

Kim DH, Seo HE, Lee SC, Lee KY (2008) Effects of wood vinegar mixed with insecticides on the mortalities of *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Anim Cells Syst* 12:47-52.

Kitajima EW (1975) A peculiar type of glycocalyx on the microvilli of the midgut epithelial cells of the thrips *Frankliniella* sp. (Thysanoptera, Thripidae). *Cytobiology* 11:299-303.

Kohlhepp G (2010) Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. *Estudos Avançados* 68: 223-253.

Lane NJ, Harrison JB (1979). An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *J Cell Sci* 39:355-372.

Lehane MJ (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42:525-550.

Levy SM, Falleiros AMF, Gregório EA, Arrebola NR, Toledo LA (2004) The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz J Biol* 64:633-638.

Lindqvist I, Lindqvist B, Tiilikkala K, Hagner M, Penttinen O-P, Pasanen T, Setälä H (2010) Birch tar oil is an effective mollusc repellent: field and laboratory experiments using *Arianta arbustorum* (Gastropoda: Helicidae) and *Arion lusitanicus* (Gastropoda: Arionidae). *Agric Food Sci* 19:1-12.

Maiti S, Dey S, Purakayastha S, Ghosh B (2006) Physical and thermochemical characterization of rice husk char as a potential biomass energy source. *Bioresour Technol* 97:2065-2070.

Morgan ED (2009) Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg Med Chem* 17:4096-4105.

Marumoto S, Yamamoto SP, Nishimura H, Onomoto K, Yatagai M, Yazaki K, Fujita T, Watanabe T (2012) Identification of a Germicidal Compound against Picornavirus in Bamboo Pyrolytic Acid. *J Agric Food Chem* 60: 9106-9111.

Mendonça JMA, Carvalho GA, Guimarães RJ, Reis PR, Rocha LCD (2006) Produtos naturais e sintéticos no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) e seus efeitos sobre a predação por vespas. *Ciênc agrotec* 30:892-899.

Mithöfer A, Boland W (2012) Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu Rev Plant Biol* 63:431-50.

Morrill WL, Greene GL (1973) Distribution of fall armyworm larvae. 1. Regions of field corn plants infested by larvae. *Environ Entomol* 2:195-198.

Mumm R, Hilker M (2006) Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci* 11:351-358.

Muñoz E, Lamilla C, Marin JC, Alarcon J, Céspedes CL (2013) Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. *Ind Crops Prod* 42:137-144.

Ninomiya Y, Zhang L, Nagashima T, Koketsu J, Sato A (2004) Combustion and De-SO_x behavior of high-sulfur coals added with calcium acetate produced from biomass pyrolytic acid. *Fuel* 83:2123-2131.

Oramahi HA, Yoshimura T (2013) Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. *J Wood Sci* 59:344-350.

Peng Y, Wu S (2010) The structural and thermal characteristics of wheat straw hemicelluloses. *J Anal Appl Pyrolysis* 88:134-139.

Pichersky E, Lewinsohn E (2011) Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62:549-566.

Pimenta AS, Bayana JM, Garcia MT, Splanas AM (2000) Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from pyrolysis of *Eucalyptus grandis* wood. *Arch Environ Con Tox* 38:169-175.

Putun E, Ates F, Putun AE (2008) Catalytic pyrolysis of biomass in inert and steam atmospheres. *Fuel* 87:815-824.

Ribeiro SS, Silva TB, Moraes VRS, Nogueira PCL, Costa EV (2012) Chemical constituents of methanolic extracts of *Jatropha curcas* L. and effects on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Quím Nova* 35:2218-2221.

Ríos-Díez JD, Saldamando-Benjumea CI (2011) Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to two insecticides, methomyl and lambda-cyhalothrin: a study of the genetic basis of resistance. *J Econ Entomol* 104:1698-1705.

Roel AR, Vendramim JD, Frighetto RTS, Frighetto N (2000) Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59: 53-58.

Ryerse JS, Purcell JP, Sammons RD, Lavrik PB (1992) Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue Cell* 24:751-771.

Santos DH, Silva MA, Tiritan CS, Foloni JSS, Echer FR (2011) Qualidade tecnológica da cana-de-açúcar sob adubação com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel. *Rev Bras de Engen Agr e Amb* 15:443-449.

Santos LM, Redaelli LR, Diefenbach LMG, Efrom CFS (2004) Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. *Ciênc Rural* 34:345-350.

Senthil-Nathan S, Choi MY, Chae-Hoom P, Kandaswamy K (2008) The toxicity and physiological effect of goniotalamin, a styryl-pyrone on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hübner. *Chemosphere* 72:1393-1400.

Silva CP, Silva JR, Vasconcelos FF, Petretski MDA, Da Matta RA, Ribeiro AF, Terra WR (2004) Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Struct Dev* 33:139-148.

Souza JBG, Ré-Poppi N, Raposo Jr JL (2012) Characterization of pyroligneous acid used in agriculture by gas chromatography-mass spectrometry. *J Braz Chem Soc* 23:610-617.

Sousa MEC, Wanderley-Teixeira V, Teixeira A, Siqueira H, Santos F, Alves L (2009) Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. *Micron* 40:743-749.

Steiner C, Das KC, Garcia M, Förster B, Zech W (2008) Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic ferrasoil. *Pedobiologia* 51:359-366.

Sueldo MR, Bruzzone OA, Virla EG (2010) Characterization of the earwig, *Doru lineari*, as a predator of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: a functional response study. *J Insect Sci* 10:1-10.

Suqi L, Caceres L, Schieck K, Booker CJ, McGarvey BM, Yeung KKC, Pariente S, Briens C, Berruti F, Scott IM (2014) Insecticidal Activity of Bio-oil from the Pyrolysis of Straw from *Brassica spp.* *J Agric Food Chem* 62:3610-3618.

Toprak U, Baldwin D, Erlandson M, Gillott C, Hou X, Coutu C, Hegedus DD (2008) A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Mol Biol* 17:573-585.

Toprak U, Erlandson M, Hegedus D (2010a) Peritrophic matrix proteins. *Trends Entomol* 6:23-51.

Tsuzuki E, Morimitsu T, Matsui T (2000) Effect of chemical compounds in pyroligneous acid on root growth in rice plant. *Jpn J Crop Sci* 66:15-16.

Virla EG, Ilvarez AN, Loto F, Pera LM, Baigorí M (2008) Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. *Fla Entomol* 91:63-69.

Waterhouse DF (1957) Digestion in insects. *Annu Rev Entomol* 2:1-18.

Wigglesworth VB (1930) The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. *Q J Microsc Sc* 73:583-616.

Wittstock U, Gershenzon J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 5:300-307.

Capítulo 2

ARTIGO PUBLICADO

Afr. J. Biotechnol. 12 (43) pp. 6241-6244, 2013

Biological activity of Sugarcane Pyroligneous acid against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae

Douglas Antunes Freitas Ferreira¹, Marcos Barbosa Ferreira², Silvio Favero² and Carlos Alexandre Carollo^{1*}

Abstract

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) annually cause enormous loss to the producers and their combat has become a worldwide challenge mainly due to several reports of pesticides resistance. Today, one of the best alternatives used in this combat is the application of natural insecticides such as neem oil and pyroligneous acid. This study demonstrates a method to obtain a hexane fraction from sugarcane pyroligneous acid, which can be easily applied, as well as its effectiveness against *S. frugiperda*. The hexane fraction exhibited LC₅₀ of 2206,41 ppm after 24 h of exposure with a linear dose-response, indicating that the fraction can be used as a bio-insecticide against *S. frugiperda*.

Keywords: Wood vinegar, insecticide, *Saccharum officinarum*, fall armyworm, pyroligneous extract

INTRODUCTION

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), is a polyphagous species of tropical and semitropical zones (Sparks, 1979) that causes severe damage to crops (Kamaraj et al., 2008).

The control of this pest is usually made with the use of synthetic insecticides (Tavares et al., 2010a; Wititsiri, 2011) which, although effective, can cause various problems, such as the presence of residues in food, poisoning of applicators, and

outbreaks of secondary pests (Roel et al., 2000; Berlitz et al., 2012). Furthermore, the continued use of these pesticides may aid in development of a resistant pest population (Munhoz et al., 2013).

An alternative for combating crop pests is the use of natural products such as neem (Correia et al., 2009; Tavares et al., 2010b), plant extracts (Roel et al., 2000; Tavares et al., 2009, 2011, 2013), and pyroligneous acid (Azevedo et al., 2007; Tavares et al., 2010a). The latter one is produced from the condensation of smoke from wood carbonization (Mendonça et al., 2006). This product is mainly characterized by low environmental impact and is a good alternative in organic agriculture. The pyroligneous acid, also known as wood vinegar, has been demonstrated to have low mammalian toxicity, lack neurotoxicity, have low persistence in the environment, and have high biodegradability (Céspedes et al., 2000).

The pyroligneous acid is normally composed of sugars, carboxylic acids, phenols (Fengel and Wegener, 1984; Kim et al., 2008), aldehydes, ketones, esters, furans and pyrans derivatives, nitrogen compounds, and other compounds (Ninomiya et al., 2004), and the major part is constituted by water (85%) and acetic acid (5.1%) (Zanetti et al., 2003). Studies on the pyroligneous acid have reported bactericidal, fungicidal, and termiticidal activity (Mu et al., 2003).

The extract is usually obtained from species used to make charcoal (Cai et al., 2012). In Brazil, the species most used for charcoal production is the *Pinus elliottii* var. *elliottii* Engelm. (Pinaceae) (Porto et al., 2007). One of the viable alternatives for obtaining this extract is from sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum* L., Poaceae); this residue has been routinely burned as an energy source (Zandersons et al., 1999), and hence, by a simple condensation of the smoke released, the extract can be obtained, which can be processed and used as a bio-insecticide. This process could avoid the annual emission of millions of tons of gases into the atmosphere (Alves et al., 2010), and produce a product with low environmental impact.

The aim of this study was to obtain and process sugarcane pyroligneous acid and evaluate it against *S. frugiperda* larvae.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extract fractionation

The bagasse of *S. officinarum* was collected from Santa Olinda S/A, located in the municipal of Sidrolândia - Mato Grosso do Sul State, Brazil. The pyroligneous acid was obtained from the Laboratory of Pharmacognosy – (Federal University of Mato Grosso do Sul – UFMS) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. For that purpose, the bagasse was placed in an Erlenmeyer flask and completely burned in a muffle at 300 °C, and then the smoke was condensed and the extract was collected. The crude extract had its pH neutralized and then was partitioned with hexane; this hexane fraction of the pyroligneous acid (HF-PA) was used in the biological assay.

Bioassay Procedures

The eggs of *S. frugiperda* were provided by the Laboratory of Entomology of the Anhanguera University (Uniderp) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil. After the eggs hatched, the larvae were placed on artificial diet (Greene et al., 1976) with 12–12-h photoperiod, at 27 ± 3 °C, and under $70 \pm 5\%$ of relative humidity.

The tests were divided into three groups of 10 neonatal larvae for each concentration: Negative group= artificial diet and acetone; positive group= artificial diet plus neem oil concentrated (Serôdia) plus acetone; and Test group= artificial diet plus the HF-PA (60, 120, 360, 600, 1200, 3600, 6000, 12000, and 36000 ppm) and acetone to dilute the extract.

Statistical analysis

The experiment was monitored at 24-h period, observing mortality in relation to concentrations of HF-PA, and the statistical program used was SPSS Statistics 20.0.0 to apply simple linear regression model ($P < 0.05$). To calculate the LC_{50} , Probit Analysis from the logarithms of the concentrations was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The yield of pyroligneous extract was approximately 40%. This extract was neutralized once acetic acid constituted approximately 5% of the extract (Zanetti et al., 2003) because this compound could interfere in the bioassay and degrade other compounds present. Another step was the fractionation of the extract; this step was aimed mainly to obtain an extract without water. The HF-PA showed a neutral pH and can be easily concentrated; these characteristics allowed easy development of new products and application of this extract.

The bioassay using HF-PA showed significant change, when compared with the negative control group. All the different concentrations of the extract caused significant mortality in 24 h, which was also observed in the positive control group (neem oil). The highest concentration evaluated (36000 ppm) resulted in 100% death, and the lowest concentration (60 ppm) caused only 10% of deaths (Figure 1). The LC_{50} of HF-PA was 2206,41 ppm. Our results suggested a linear dose-response (Figure 2), which was also confirmed by r^2 (0.83). Neonatal nymphs of *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) showed 66.59% mortality caused by neem oil (Natuneem[®]) and 67.45% of deaths caused by pyroligneous acid (Pironat[®]) (Azevedo et al., 2005). Neem oil (Natuneem[®]) and crude pyroligneous extract (Biopiról7M[®]) tested on eggs of *S. frugiperda* and *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), confirmed mortality of eggs of different ages with different concentrations of the extract, and the extracts' satisfactory effect in controlling these pests (Tavares et al., 2010a, 2010b). However, neem oil (Natuneem[®]) and commercial crude pyroligneous acid (Biopiról7M[®] and Pironat[®]), no significant mortality was observed when the extract was applied to adults of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) (Efrom et al., 2011). These contradictions among different studies are related to the stages of the insects used in the experiments. Another possibility is related to the tolerance of the insect to insecticides in the course of their development (Yu, 1983; Schmutterer, 1990).

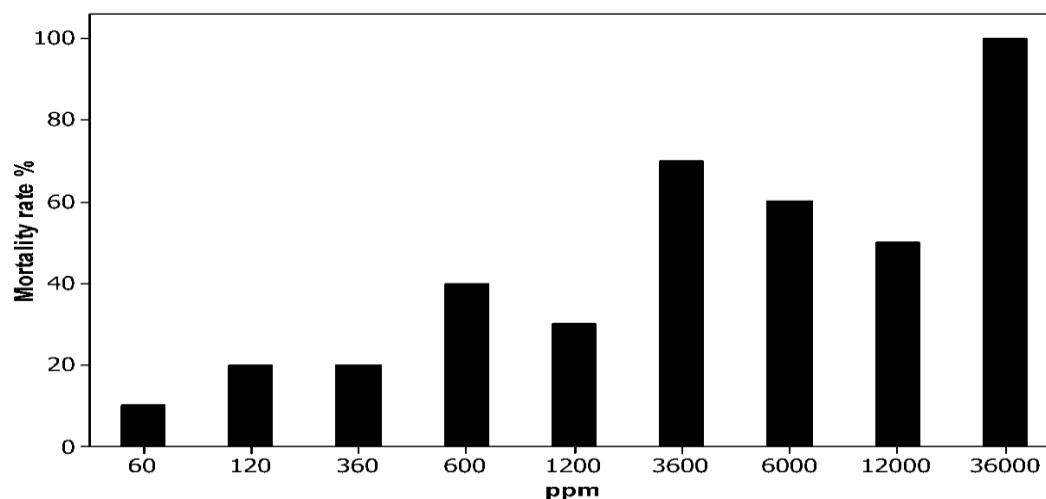


Figure 1 - Distribution of percentages of mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae caused by HF-PA.

One of the apparent causes of the activity against the larvae is the synergistic effect among the compounds (Richards, 2010); this synergism occurs between different classes of compounds or structurally similar compounds, and the effects may range from antifeeding effect to toxicity activity (Dyer et al., 2003). The wide range of compound prevents resistance development (Rice, 1993). These secondary metabolites have different sites of action and molecular targets. They interact with important metabolic and enzymatic inhibitors (Céspedes et al., 2000; Torres et al., 2003) against microbial pathogens and invertebrates (Wink and Schimmer, 1999). Thus, for example, some secondary metabolites such as the nitrogenous compounds may act by blocking the nervous system activity (Kagabu, 2008), or by inhibiting synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA), and modifying the permeability of the membrane by changing the composition with respect to structural proteins (Schmeller et al., 1997). Another mechanism of action of PA-HF could be related to the presence of phenolic compounds, one of the main groups being investigated for pest control (Henn, 1997).

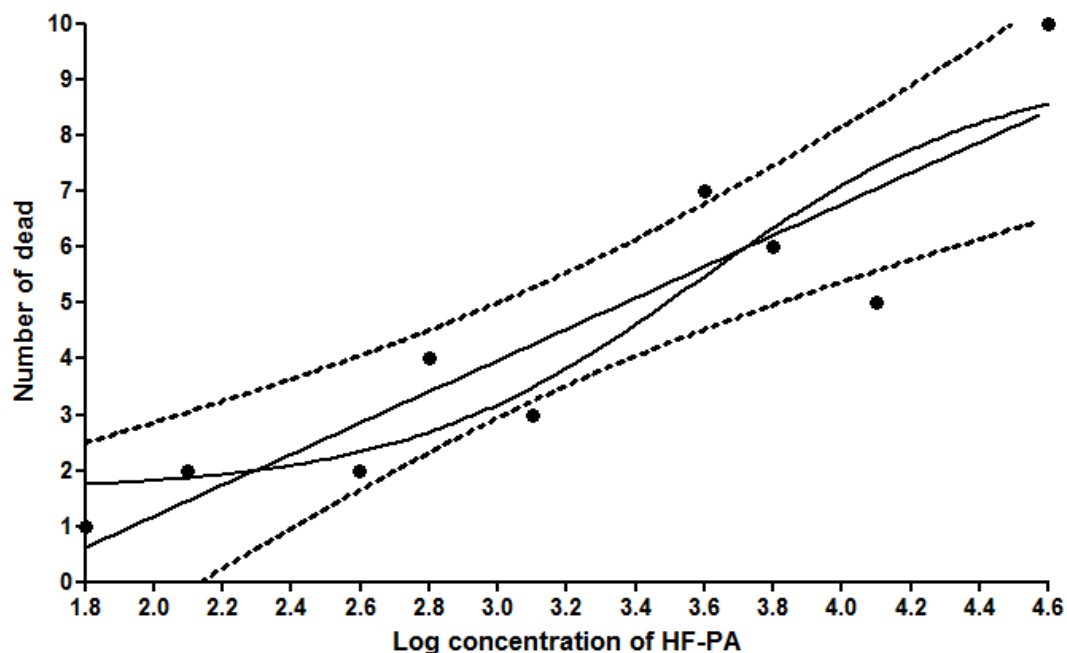


Figure 2 - Graph regression analysis ($P < 0.05$) presenting the log of the dose against the number of dead *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae during 24 h.

The pyroligneous extract used was toxic to *S. frugiperda* larvae and displayed a linear dose-response with an LC_{50} of 2206,41 ppm. Furthermore, the possibility of preparation of a low-cost fraction of the sugarcane pyroligneous acid was also demonstrated. These results open new possibilities for the fraction to be tested against different pests of crops and agriculture, providing useful application for the smoke produced by the burning of sugarcane bagasse.

REFERENCES

Alves OJ, Zhuo C, Levendis YA, Tenorio JAS (2010). Analysis of light hydrocarbon gases in the pyrolysis process of sugarcane bagasse. Congr. Anu. ABM 65th, 766-773.

Azevedo FR, Guimarães JA, Sobrinho RB, Lima MAA (2005). Eficiência de produtos naturais para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em meloeiro. Arq. Inst. Biol. 72: 73-79.

Azevedo FR, Leitão ACL, Lima MAA, Guimarães JA (2007). Eficiência de produtos naturais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fab.) em feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) armazenado. Rev. Ciênc. Agron. 38: 182-187.

Berlitz DL, Azambuja AO, Sebben A, Oliveira JV, Fiuza LM (2012). Mortality of *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (J E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae exposed to *Bacillus thuringiensis* and extracts of *Melia azedarach*. Braz. Arch. Biol. Technol. 55: 725-731.

Cai K, Jiang S, Ren C, He Y (2012). Significant damage-rescuing effects of wood vinegar extract in living *Caenorhabditis elegans* under oxidative stress. J. Agric. Food Chem. 92: 29-36.

Céspedes CL, Calderón JS, Lina L, Aranda E (2000). Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). J. Agric. Food Chem. 48: 1903-1908.

Correia AA, Teixeira VW, Teixeira AAC, Oliveira JV, Torres JB (2009). Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. Neotrop. Entomol. 38: 83-91.

Dyer LA, Dodson CD, Stireman III, JO, Tobler, MA, Smilanich AM, Fincher RM, Letourneau DK (2003). Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. J. Chem. Ecol. 29: 2499-2514.

Efrom CFS, Redaelli LR, Meirelles RN, Ourique CB (2011). Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, in organic farming. *Crop Prot.* 30: 1162-1167.

Fengel D, Wegener G (1984). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.

Henn MW (1997). Adsorption von Tanninen aus Eichenblättern an Kohlen e hydrathaltiger Verbindungen. *Mitt. Dtsch. Entomol. Ges.* 11: 495-499.

Kagabu S (2008). Pharmacophore of neonicotinoid insecticides. *J. Pestic. Sci.* 33: 9-13.

Kamaraj C, Rahuman AA, Bagavan A (2008). Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol. Res.* 103: 325-331.

Kim DH, Seo HE, Lee SC, Lee KY (2008). Effects of wood vinegar mixed with insecticides on the mortalities of *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Anim. Cells Syst.* 12: 47-52.

Mendonça JMA, Carvalho GA, Guimarães RJ, Reis PR, Rocha LCD (2006). Produtos naturais e sintéticos no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) e seus efeitos sobre a predação por vespas. *Ciênc. agrotec.* 30: 892-899.

Mu J, Uehara T, Furuno T (2003). Effect of bamboo vinegar on regulation of germination and radicle growth of seed plants. *J. Wood Sci.* 49: 262-270.

Muñoz E, Lamilla C, Marin JC, Alarcon J, Cespedes CL (2013). Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*. *Ind. Crop Prod.* 42: 137-144.

Ninomiya Y, Zhang L, Nagashima T, Koketsu J, Sato A (2004). Combustion and De-SO_x behavior of high-sulfur coals added with calcium acetate produced from biomass pyrolygneous acid. *Fuel.* 83: 2123 -2131.

Porto PR, Sakita AEN, Sakita MN (2007). Efeito da aplicação do extrato pirolenhoso na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Instituto Florestal de São Paulo. 31: 15-19.

Rice M (1993). Built-in Resistance Prevention (BIRP): a Valuable Property of Azadirachtin. In: World Neem Conference, India, Bangalore.

Richards LA, Dyer LA, Smilanich AM, Dodson CD (2010). Synergistic effects of amides from two *Piper* species on generalist and specialist herbivores. *J. Chem. Ecol.* 36: 1105-1113.

Roel AR, Vendramim JD, Toyoko SFR, Frighetto N (2000). Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59: 53-58.

Schmeller T, Latz-Bruning B, Wink M (1997). Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44: 257-266.

Schmutterer H (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 271-297.

Sparks AN (1979). A review of the biology of the fall armyworm. *Fla. Entomol.* 62: 82-87.

Tavares WS, Costa, MA, Cruz I, Silveira RD, Serrão JE, Zanuncio JC (2010a). Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Environ. Sci. Heal. B* 45: 557-561.

Tavares WS, Cruz I, Fonseca FG, Gouveia NL, Serrão JE, Zanuncio JC (2010b). Deleterious activity of natural products on postures of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Z. Naturforsch. C.* 65: 412-418.

Tavares WS, Cruz I, Petacci F, Freitas SS, Serrão JE, Zanuncio JC (2011). Insecticide activity of piperine: toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and

Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. *J. Med. Plant Res.* 5: 5301-5306.

Tavares WD, Freitas SD, Graziotti GH, Parente LML, Lião LM, Zanuncio JC (2013). Ar-turmerone from *Curcuma longa* (Zingiberaceae) rhizomes and effects on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ind. Crop Prod.* 46: 158-164.

Tavares WD, Cruz I, Petacci F, de Assis SL, Freitas SD, Zanuncio JC, Serrão JE (2009). Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Ind. Crop Prod.* 30: 384-388.

Torres P, Avila JG, Romo De Vivar A, García AM, Marín JC, Aranda E, Céspedes CL (2003). Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry.* 64: 463-473.

Wink M, Schimmer O (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink, M. (Ed.), *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology*. Annual Plant Reviews No. 3. Sheffield Academic Press, Sheffield.

Wititsiri S (2011). Production of wood vinegars from coconut shells and additional materials for control of termite workers, *Odontotermes* sp. and striped mealy bugs, *Ferrisia virgata*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 33: 349-354.

Yu SJ (1983). Age variation in insecticide susceptibility and detoxification capacity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larva. *J.Econ. Entomol.* 76: 219-222.

Zandersons J, Gravitis J, Kokorevics A, Zhurinsh A, Bikovens O, Tardenaka A, Spince B (1999). Studies of the Brazilian sugarcane bagasse carbonisation process and products properties. *Biomass Bioenergy*. 17: 209-219.

Zanetti M, Cazetta JO, Júnior Dirceu M, Carvalho SA (2003). Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro 'Cravo' em ambiente protegido. *Rev. Bras. Frutic*. 25: 508-512.

Capítulo 3

ARTIGO A PUBLICAR**PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO PIROLENHOSO OBTIDO DE *Saccharum officinarum* L. (Poaceae)
E ENSAIO BIOLÓGICO SOBRE LAGARTAS *Spodoptera frugiperda* SMITH (LEPIDOPTERA).**

Douglas Antunes Freitas Ferreira¹, Maria Lígia Rodrigues Macedo², Elina Bastos Caramão³, Claudia
Andrea Lima Cardoso⁴, Carlos Alexandre Carollo¹

¹Universidade de Mato Grosso do Sul (UFMS), Laboratório de Farmacognosia, Av. Costa e Silva s/nº.
79070-900, Campo Grande, Brasil; e-mail para correspondência: carloscarollo@gmail.com

²Universidade de Mato Grosso do Sul (UFMS), Laboratório de purificação de proteínas e suas funções
biológicas - LPPFB, Av. Costa e Silva s/nº. 79070-900, Campo Grande, Brasil;

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Instituto de Química, Av. Bento Gonçalves,
9500, 91501-970, Bairro: Agromonia, Porto Alegre, Brasil;

⁴Universidade Estadual Mato Grosso do Sul (UEMS), Laboratório de Química, Rodovia Dourados –
Ithaum Km 12, 79804-970, Zona Rural, Dourados, Brasil;

ABSTRACT

The control of insect pest *Spodoptera frugiperda* is made by synthetic insecticides, leading to an increase in resistance. An alternative is to use the pyroligneous extract obtained from sugarcane bagasse which is available in large quantities and is characterized by the production of insecticidal compounds for their burning. In the present study, the pyroligneous extract was obtained by pyrolysis of sugarcane bagasse and condensing the smoke. The crude extract was neutralized and fractionated with solvents of increasing polarity (hexane, chloroform and ethyl acetate). The three fractions were analyzed by CG/MS, 70 compounds were identified (majority being the hexane fraction: 2,3- diidrobenzofurano (14,64 %), 2,6-dimethoxyphenol (10,71 %) 4-vinyl-2-methoxyphenol (10,36 %), chloroform fraction: 1-(2-furanyl)-1-propanone (6,37 %), 2,3-dimethyl-2-cyclopentanone-1 (3,85 %), 3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentenone-1 (3,05 %), the ethyl acetate fraction: tetradecanoic acid (17,91 %), ethyl crotonate (13,34 %), 1,4-dimethoxybenzene (12,79 %). Subsequently, the three fractions were evaluated for their insecticidal activity against *S. frugiperda* (at concentrations of 0,1, 0,25, 0,5 and 1 %). There was a decrease in mass the three body histomorphological changes induced mainly in fractions hexane fraction. Mortality was high (above 94 %) concentrations of 0,5 and 1 % decrease causing hexane fraction of individuals in all stages at an increasing dose-response. The hexane fraction showed a greater effect in the control of *S. frugiperda*, possibly due to less polar compounds, which have a greater ease of crossing barriers such as the plasma membrane, resulting in a greater biological response, another factor may be related to the effect synergistic compounds of this fraction.

Keywords: Wood vinegar, pyroligneous extract, insecticide, *Saccharum officinarum*, fall armyworm

INTRODUÇÃO

O inseto-praga *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), infesta espécies vegetais como o algodão, milho, soja e trigo (Gallo et al. 2006). Para atenuar os danos causados a estas culturas, geralmente são utilizados inseticidas sintéticos que além de matar espécies-alvo, podem afetar os inimigos naturais, causar intoxicação de produtores e deixar resíduos no meio ambiente (Berlitz 2012).

Uma das opções para o controle de pragas é o extrato pirolenhoso, um subproduto orgânico resultante da condensação da fumaça expelida no processo de carbonização da madeira, constituído por cetonas, derivados furano e pirano, aldeídos, fenóis, alcoóis, ésteres, água, ácido acético e compostos nitrogenados (Guillén e Manzano 2002).

Na literatura são encontrados estudos investigando extratos pirolenhosos a partir da *Betula sp.* com atividade moluscida (Lindqvist et al. 2010), do bambu com atividade germicida em *Picornavirus* (Marumoto et al. 2012) e da *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) com atividade inseticida (Ferreira et al. 2013).

A cana-de-açúcar é a matéria-prima utilizada para produzir etanol e o açúcar, gerando resíduos durante este processo, como o bagaço, que é atualmente aproveitado para produção de energia elétrica através de sua queima. Este procedimento é economicamente interessante para as indústrias, porém causa a liberação de centenas de toneladas de poluentes na atmosfera. O impacto ambiental causado por esta etapa, pode ser drasticamente reduzido pela condensação da fumaça, o que ainda originará um novo subproduto para o setor, o extrato pirolenhoso.

Anteriormente nosso grupo avaliou a atividade inseticida de uma fração hexânica do extrato pirolenhoso da cana-de-açúcar sobre a *S. frugiperda* (Ferreira et al. 2013). Os resultados obtidos demonstraram que a fração hexânica foi tóxica sobre a *S. frugiperda*, que nos levou a uma continuação deste trabalho, sendo aqui apresentada a avaliação química e caracterização de novas frações (fração hexano, fração clorofórmio e fração acetato de etila) em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, assim como o efeito das frações sobre a massa corpórea das lagartas, pupas, o efeito na histomorfologia do trato digestório do inseto, e o efeito no ciclo de vida da *S. frugiperda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da coleta e obtenção do extrato: O bagaço da *Saccharum officinarum* foi coletado na Usina Alcoovale S/A, localizada em Aparecida do Taboado - MS. O extrato foi obtido no Laboratório de Farmacognosia – UFMS segundo a metodologia utilizada por Ferreira e colaboradores (2013). O bagaço foi seco em estufa a 50°C, 500g do bagaço seco foi colocada dentro de um erlenmeyer para a queima total em mufla a temperatura de 300°C, a fumaça foi condensada sendo recolhido o extrato pirolenhoso bruto. A este extrato (EPB) foram adicionados 100 mL de água destilada e o pH neutralizado com hidróxido de potássio (KOH 1 mol). Em seguida foi particionado com solventes hexano (FHPEP), clorofórmio (FCEP) e acetato de etila (FAEEP), até exaustão total (5 vezes cada solvente), os solventes foram removidos em rota-evaporador.

Perfil químico do extrato pirolenhoso: As análises em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de espectrometria de massa (QP 5050A), usando uma coluna DB-5 (J & W, 5% fenil-dimetilpolisiloxano), de sílica fundida coluna capilar (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro, 0,25 µm de espessura de filme), sob as seguintes condições: hélio gás portador (99,999% e vazão de 1,0 mL / min); 1 µL volume de injeção, razão de separação (1:20), com temperatura inicial do forno de 50 °C e aquecimento de 50° a 280 °C a 4 °C / min. As temperaturas de transferência injetores detector quadrupolo e linha foram 250 °C. O EM digitalizar parâmetros incluídos tensão de ionização impacto de elétrons a 70 eV, uma faixa de massa entre 45 e 700 m/z e um intervalo de varredura de 0,5 s. As identificações foram realizadas através da comparação do espectro de massa obtido no QP5050 bibliotecas (NIST21 e WILEY229) e índice de Kovats.

Ensaio biológico: Os ovos das lagartas foram obtidos no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), e 24h após a eclosão dos ovos, as lagartas foram divididas em grupos para testes com fotoperíodo 12-12h, temperatura a $27 \pm 3^\circ\text{C}$, e umidade relativa de $70 \pm 5\%$.

Delineamento experimental: Foram colocadas 35 lagartas em cada um dos 5 grupos. **Grupo controle negativo**, com acetona homogeneizada em dieta artificial composta por gérmen de trigo, levedo de cerveja, feijão carioca, ágar, ácido sorbico, ácido ascórbico, nipagim, formol e água (Greene et al. 1976), **grupo controle positivo**, com deltametrina (Decis 25[®]) (0,001%) homogeneizada em dieta artificial, e **grupos tratamentos**, foram formados 3 grupos, com FAEEP, FCEP e FHEP em concentrações 0,1, 0,25, 0,5 e 1%, respectivamente. Foi observada a mortalidade das lagartas com 12 e 21 dias de tratamento, pesado as lagartas (12 dias) e as pupas a partir do início da pupação e observado o experimento até as mariposas emergirem das pupas.

Análise histomorfológica: Foram utilizadas 5 lagartas extras das concentrações 0,1, 0,5 e 1% de cada fração e do grupo controle quando atingiram 13 dias de tratamento, conduzidas ao Laboratório de Toxicologia e Plantas Mediciniais da Universidade Anhanguera-Uniderp Campo Grande - MS. As lagartas foram anestesiadas em baixa temperatura e dessecadas para a retirada do canal alimentar sendo fixados em Baker por 12 horas e incluídas em parafina. Foram seccionadas longitudinalmente em 6µm de espessura e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina modificado – HE (Luna 1968) e montadas com Entellan[®].

Análise estatística: Os testes foram realizados em três replicatas, utilizando a média, desvio padrão e teste ANOVA ($p < 0,05$) para saber se houve diferença significativa entre as variáveis e, posterior teste de múltipla comparação de Tukey nos grupos. Para calcular a CL50, foi utilizada a análise de Probit dos logaritmos das concentrações.

RESULTADOS

O rendimento do EPB foi de 50% do bagaço carbonizado (pH 2). O rendimento das frações em relação ao EPB foi de 19,10 g (7,65 %) da FHEP, 26,20 g (10,47 %) da FCEP e 11,80 g (4,72 %) da FAEEP, com os pHs 4,87, 4,78 e 4,96 respectivamente.

A análise em CG-EM (Figura 1) das frações do extrato pirolenhoso demonstrou que houve diferença na composição das frações. Foram identificados 70 compostos (Tabela 1), sendo os compostos majoritários da FHEP: 2,3-diidrobenzofurano (14,64%), 2,6-dimetoxifenol (10,71%), 4-vinil-2-metoxifenol (10,36%); FCEP: 1-(2-furanil)-1-propanona (6,37%), 2,3-dimetil-2-ciclopentanona-1 (3,85%), 3-etil-2-hidroxi-2-ciclopentanona-1 (3,05%); FAEEP: ácido tetradecanóico (17,91%), etílico crotonato (13,34%), 1,4-dimetoxibenzeno (12,79%) (Figura 2).

Análise da massa corpórea das lagartas (Tabela 2) indicou diferença significativa em relação ao grupo controle negativo, com destaque para todas as concentrações da FHEP, e as concentrações 0,25, 0,5 e 1% da FCEP e FAEEP. Além disto, a massa corpórea das pupas apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle negativo nas concentrações 0,25, 0,5 e 1% da FHEP e 1% da FCEP e FAEEP.

A mortalidade (Tabela 3) das lagartas com 12 dias de experimento indicou diferença significativa para a FHEP nas concentrações 0,25, 0,5 e 1% e para a FCEP e FAEEP nas concentrações 0,5 e 1%. E a mortalidade com 21 dias apresentou diferença significativa para as três frações nas concentrações 0,25, 0,5 e 1%. Ambos os períodos observados apresentaram efeito dose-resposta crescente das concentrações de cada grupo.

Quando observado os valores da CL_{50} (Tabela 4), a FHEP se mostrou mais eficaz para matar as lagartas, sendo necessária uma concentração de 0,22 g com 12 dias e 0,14 g com 21 dias, e para a CL_{90} foi 0,47 g com 12 dias e 0,35 g com 21 dias, seguida pela FCEP e a FAEEP.

O efeito das frações sobre ciclo de vida (Tabela 5) da *S. frugiperda* demonstrou uma queda significativa na quantidade de indivíduos dose-dependente. Ao observarmos as lagartas que se transformaram em pupas e posterior em mariposas, todas as concentrações da FHEP e FCEP tiveram diferença significativa do controle, e a FAEEP apresentou diferença significativa nas concentrações 0,25, 0,5 e 1%.

A análise histomorfológica do grupo controle (Figura 3) apresentou estruturas habituais do revestimento com três tipos celulares que são as células caliciformes (homeostase iônica), regenerativas (renovação do epitélio) e colunares (absorção de nutrientes e secreção de enzimas) que apresentam borda em escova, estando todas as células apoiadas na membrana basal. Externamente ao tecido epitelial simples encontram-se fibras musculares dispostas em duas camadas, sendo a interna de músculo circular e a externa de músculo longitudinal que tem função de movimentar os alimentos para as partes posteriores em movimentos peristálticos (Gallo et al. 2002). Voltado para o lúmen do mesêntero, identificamos a matriz peritrófica e fragmentos de alimentos.

Identificamos nas frações de todos os grupos analisados alterações estruturais na histomorfologia da lagarta *S. frugiperda*. Por causa da alta mortalidade que ocorreu na FHEP possibilitou a análise apenas da concentração 0,1%, apontando células com citoplasma vacuolizado, aumento do espaço ectoperitrófico e a presença do aumento de secreção no espaço ectoperitrófico de enzimas e substâncias que estão sendo assimiladas. Nas concentrações 0,5 e 1% da FCEP identificamos o aumento da borda em escova. E nas

concentrações 0,5% e 1% da FAEEP foram observados espessamentos da matriz peritrófica em várias regiões.

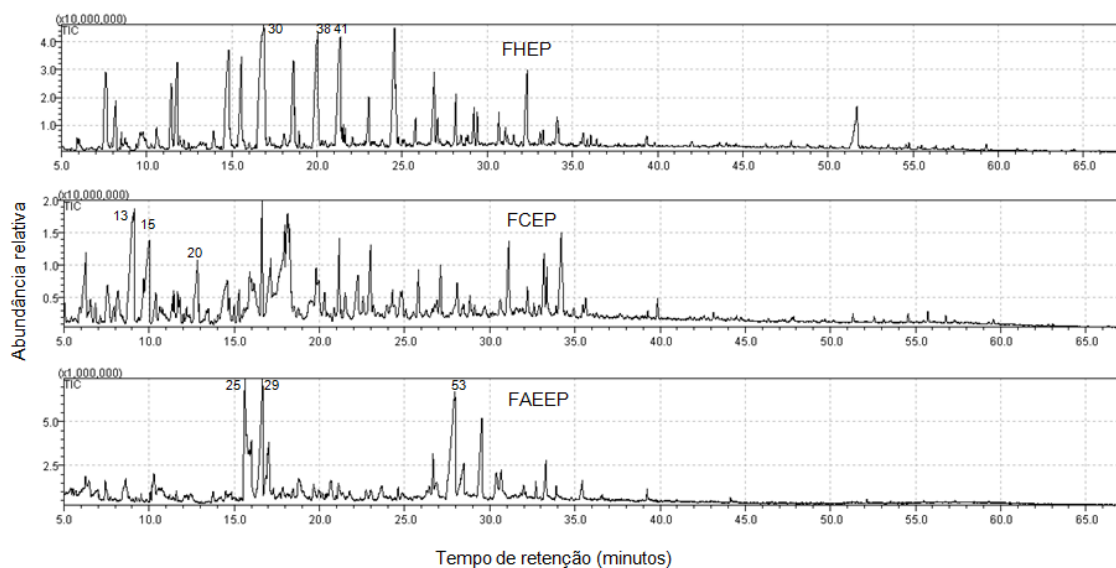


Figura 1: Cromatograma obtido por CG-EM das frações hexânica (FHEP), clorofórmica (FCEP) e acetato de etila (FACEP) do extrato pirolenhoso.

Tabela 1: Compostos majoritários das frações do extrato pirolenhoso na análise em CG-EM

Nº	TR	Área (%)			Nome dos compostos
		FAEEP	FCEP	FHEP	
1	5,91	-	0,40	0,27	2-metil-2-ciclopentenona-1
2	6,02	0,41	-	0,23	2-acetil furano
3	6,29	0,37	2,21	-	2 (5H)-furanona
4	6,55	-	0,58	-	2 (3H)-furanona, 5-metil
5	6,86	-	0,33	-	2 (5H)-furanona, 5-metil
6	7,42	1,43	-	-	furano metanol
7	7,59	-	1,31	4,00	5-metil-2-furanocarboxaldeído
8	7,90	-	0,43	0,11	2-nonanol
9	8,19	-	1,18	1,92	fenol
10	8,51	1,27	0,05	0,30	1,3,5 trimetilbenzeno
11	8,60	0,97	-	0,11	2,5 dimetil-2,4 hexadieno
12	8,74	0,41	-	0,37	3 metil ciclohexanona
13	9,01	-	6,37	0,16	1-(2-furanyl)-1-propanona
14	9,78	-	0,92	1,66	2-hidro 3-metil-2-ciclopentenona-1
15	9,97	0,31	3,85	0,32	2,3 dimetil-2-ciclopentanona-1
16	10,26	1,78	0,69	0,09	2-hidroxibenzaldeído
17	10,58	-	0,39	0,75	2-metilfenol
18	11,45	0,35	0,93	2,48	4-metilfenol
19	11,81	-	0,86	4,32	5-metoxifenol
20	12,84	-	3,05	-	3-etil-2-hidroxi-2-ciclopentanona-1
21	13,92	0,57	-	0,57	2,4 dimetilfenol
22	14,82	-	2,55	6,04	3-etilfenol
23	14,88	-	0,82	-	2-Hexenoic acid, 3-methyl-, methyl ester
24	15,29	-	0,78	-	Homofurool

25	15,57	12,79	-	4,17	1,4 dimetoxibenzeno
26	15,73	3,16	1,18	-	1,2-benzenodiol
27	15,99	3,96	0,72	-	4-Heptanolida
28	16,16	-	1,32	-	Ciclohexanona, 2-(2-butenil)-
29	16,64	13,34	2,38	-	etílico crotonato
30	16,87	1,89	-	14,64	2,3 dihidro benzofurano
31	17,01	2,59	-	-	4,4-dimetil-3-etil-2-penteno
32	17,03	2,45	-	-	2-propiltiofeno
33	17,21	0,71	2,53	1,18	2-etil-5-metilfenol
34	18,22	-	1,63	-	2-acetil-ciclohexanona
35	18,62	0,56	-	4,95	4-etil 2-metoxifenol
36	18,95	1,71	-	0,43	2,3-hidrobenzofurano
37	19,81	-	1,12	-	2 - (2-butenil) - 1 ciclohexanona
38	20,05	-	-	10,36	4 vinil-2-metoxifenol
39	20,49	-	0,83	0,50	óxido de piperotona
40	20,69	1,61	-	-	2,5-dimetoxifenol
41	21,37	0,95	1,8	10,71	2,6-dimetoxifenol
42	21,46	-	1,17	0,65	Triplal 1
43	22,27	-	2,01	-	4- hidroxil benzaldeído
44	22,56	0,52	0,78	-	1,3-benzenodiol 4-etil
45	23,04	-	2,72	1,64	vanilina
46	23,85	-	-	0,31	viridiflorol
47	23,97	-	0,57	-	acetaldeído, (3,3-dimetil ciclohexilideno)
48	24,55	0,57	0,94	7,83	1,2,3-trimetoxibenzeno
49	25,80	-	1,03	0,95	acetovanilona
50	26,67	1,55	-	-	evodone
51	26,88	-	-	2,94	2,6-dihidroxi-4-metoxiacetofenona
52	27,09	-	-	0,74	guaiacil acetona
53	27,95	17,91	-	-	ácido tetradecanoico
54	28,16	-	0,95	1,65	4-Metil-2,5-dimetoxibenzaldeído
55	28,48	4,23	-	0,41	Coniferol
56	28,85	-	0,42	0,50	4-etoxi-3-metoxibenzaldeído
57	29,22	-	0,23	1,12	metoxieugenol
58	29,41	-	-	0,77	ácido 2,4-hexadienedioico, 3,4-dietil-, éster dimetílico
59	29,54	8,25	-	-	ácido decanoico
60	30,40	2,42	-	-	benzenoacético, 4-hidroxi-, éster metílico
61	30,69	2,34	0,62	0,95	metoxieugenol
62	31,07	-	1,82	0,56	siringoldeído
63	31,98	0,62	-	-	octadecano, 6-metil-
64	32,34	-	0,59	3,19	fenol, 2,6-dimetoxi-4-(2-propenil) -
65	32,60	0,77	0,45	-	3-Metil-5-etil-4-propilideno-ciclohexona-2-eno-1-ona
66	33,10	-	1,53	0,33	acetoseringona
67	33,29	2,57	0,75	0,33	3 - (p-hidroxi-m-metoxifenil)-2-propenal
68	34,10	-	2,28	1,26	Ácido 2,4-Hexadienedioico, 3,4-dietil-, éster dimetílico
69	35,46	1,30	-	0,16	ácido hexadecanoico
70	50,70	-	-	1,12	pentacosano

Total de classes %

Fenóis	30,93	18,95	65,50
Cetonas	7,20	18,16	3,86
Aldeídos	1,78	11,66	9,09
Hidrocarbonos	3,86	0,88	2,23
Ácidos	29,88	3,10	2,19
Alcoóis	1,43	1,21	0,11
Éteres	3,60	-	15,07
Éster	13,34	2,23	-

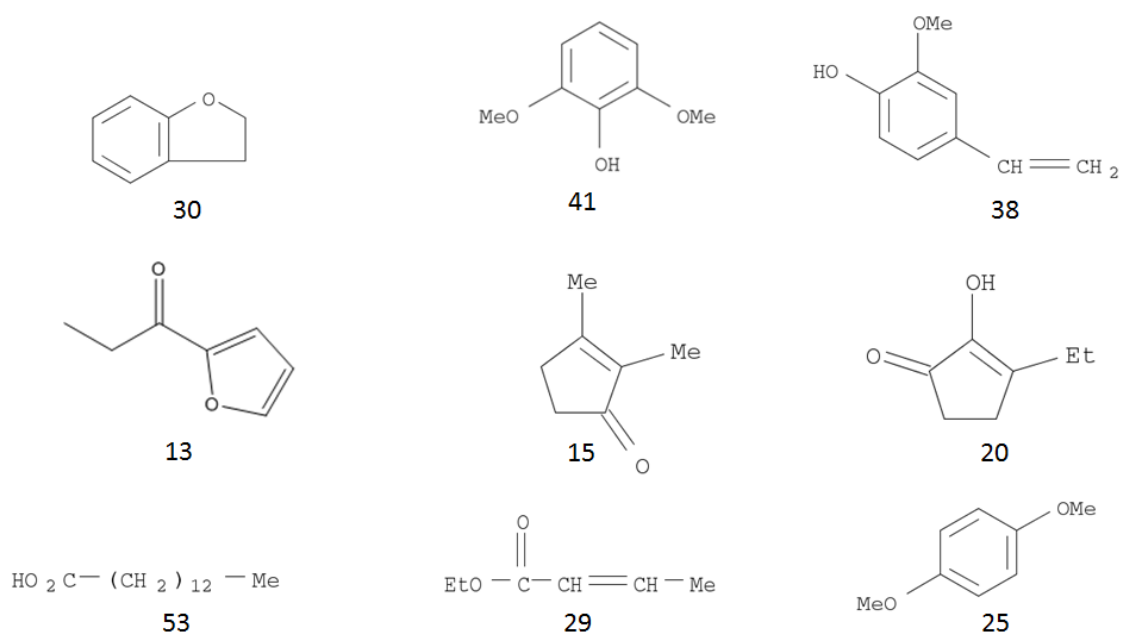


Figura 2: Estruturas dos compostos majoritários da CG-EM. FHEP: **30**) 2,3 diidrobenzofurano, **41**) 2,6-dimetoxi fenol, **38**) 4 vinil 2-metoxi fenol; FCEP: **13**) 1-(2-furanil)-1-propanona, **15**) 2,3 dimetil 2-ciclopentanona-1, **20**) 3-etil-2-hidroxi-2-ciclopentanona-1; FAEEP: **53**) ácido tetradecanóico, **29**) etílico crotonato, **25**) 1,4 dimetoxi benzeno

Tabela 2: Massa corpórea das lagartas e pupas. Médias e desvio padrão do peso em gramas

Grupos	Lagartas		Pupas	
	Média e DP	% CV	Média e DP	% CV
Controle	0,31 ± 0,023 (a)	7,52	0,23 ± 0,005 (a)	2,38
FAEEP 0,1 %	0,32 ± 0,008 (a)	2,40	0,23 ± 0,006 (a; b)	2,91
FAEEP 0,25 %	0,26 ± 0,012 (b)	4,74	0,23 ± 0,007 (a, b)	3,30
FAEEP 0,5 %	0,22 ± 0,006 (c,d)	2,83	0,22 ± 0,003 (a; b)	1,61
FAEEP 1 %	0,15 ± 0,019 (e)	12,48	0 (d)	-
FCEP 0,1 %	0,31 ± 0,010 (a)	3,14	0,23 ± 0,006 (a; b)	2,93
FCEP 0,25 %	0,24 ± 0,012 (c)	4,96	0,23 ± 0,009 (a; b)	3,94
FCEP 0,5 %	0,21 ± 0,005 (d)	2,32	0,22 ± 0,002 (a; b; c)	1,07
FCEP 1 %	0,14 ± 0,026 (e)	18,04	0,19 ± 0,001 (c)	0,67
FHEP 0,1 %	0,27 ± 0,035 (b)	13,16	0,22 ± 0,004 (a; b)	2,05
FHEP 0,25 %	0,14 ± 0,010 (e)	6,84	0,21 ± 0,008 (b; c)	3,77

FHEP 0,5 %	0,01 ± 0,012 (f)	93,64	0 (d)	-
FHEP 1 %	0 (f)	-	0 (d)	-
Deltametrina 0,001 %	0 (f)	-	0 (d)	-

Desvio padrão (DP); porcentagem do coeficiente de variação (% CV)

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 3: Mortalidade das lagartas em 12 e 21 dias

Grupos	Mortalidade 12		Mortalidade 21	
	Média / DP	% CV	Média / DP	% CV
- Controle	1,66 ± 0,57 (e)	34,64	2 ± 0 (e)	-
FAEEP 0,1 %	1 ± 0 (e)	-	7,33 ± 0,57 (d; e)	7,87
FAEEP 0,25 %	11 ± 1 (c; d; e)	9,09	16 ± 1 (c; d)	6,25
FAEEP 0,5 %	15,66 ± 1,15 (b; c; d)	7,37	25,33 ± 1,15 (a; b; c)	4,55
FAEEP 1 %	25,66 ± 0,57 (a; b)	2,24	33,33 ± 0,57 (a; b)	1,73
FCEP 0,1 %	6 ± 1 (d; e)	16,66	11,33 ± 0,57 (d; e)	5,09
FCEP 0,25 %	10 ± 1 (c; d; e)	10	17,66 ± 1,52 (c; d)	8,64
FCEP 0,5 %	14,33 ± 1,52 (c; d)	10,65	23,33 ± 1,52 (b; c)	6,54
FCEP 1 %	25,66 ± 1,52 (a; b)	5,95	29 ± 1,73 (a; b)	5,97
FHEP 0,1%	3,33 ± 0,57 (e)	17,32	12,66 ± 0,57 (d; e)	4,55
FHEP 0,25 %	16,66 ± 1,52 (b; c)	9,16	23,66 ± 1,52 (b; c)	6,45
FHEP 0,5 %	33 ± 2 (a)	6,06	35 ± 0 (a)	-
FHEP 1 %	35 ± 0 (a)	-	35 ± 0 (a)	-
Deltametrina 0,001 %	35 ± 0 (a)	-	35 ± 0 (a)	-

Desvio padrão (DP); porcentagem do coeficiente de variação (% CV) (35 indivíduos)

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 4: Concentração letal (CL_{50} e CL_{90}), causando 50% de mortalidade

Frações	CL_{50}	DP	% CV	CL_{90}	DP	% CV
12 dias						
FAEEP	0,51	0,065	12,75	1,86	0,527	28,24
FCEP	0,50	0,089	17,83	3,27	1,575	48,15
FHEP	0,22	0,019	8,70	0,47	0,061	12,80
21 dias						
FAEEP	0,24	0,029	12,17	0,82	0,165	20,15
FCEP	0,21	0,045	20,97	1,90	0,872	45,87
FHEP	0,14	0,016	11,66	0,35	0,054	15,31

Desvio padrão (DP); porcentagem do coeficiente de variação (% CV)

Tabela 5: Ciclo de vida (lagarta, pupa e mariposa)

Grupos	Lagartas 21 (n)		Pupas (n)		Mariposas (n)	
	Média / DP	% CV	Média / DP	% CV	Média / DP	% CV
- Controle	33 ± 0	0	32,33 ± 1,15 (a)	3,57	32 ± 1 (a)	3,12
FAEEP 0,1 %	27,66 ± 0,57	2,08	27,33 ± 0,57 (a; b)	2,11	24,66 ± 1,52 (a)	6,19

FAEEP 0,25%	19 ± 1	5,26	18,33 ± 1,15 (b; c)	6,29	16,66 ± 0,57 (b)	3,46
FAEEP 0,5 %	9,66 ± 1,15	11,94	7 ± 1 (d; e; f)	14,28	2,66 ± 0,57 (c; d)	21,65
FAEEP 1 %	1,66 ± 0,57	34,64	0 (f)	-	0 (d)	-
FCEP 0,1 %	23,66 ± 0,57	2,43	19 ± 1 (b; c)	5,26	10 ± 1 (b; c)	10
FCEP 0,25 %	17,33 ± 1,52	8,81	12 ± 1 (c; d; e)	8,33	5,66 ± 1,52 (c; d)	26,95
FCEP 0,5 %	11,66 ± 1,52	13,09	5,33 ± 1,15 (d; e; f)	21,6	0,33 ± 0,57 (d)	173,2
FCEP 1 %	6 ± 1,73	28,86	2 ± 1 (f)	50	0 (d)	-
FHEP 0,1 %	22,33 ± 0,57	2,58	14,33 ± 1,15 (c; d)	8,05	1 ± 1 (d)	100
FHEP 0,25 %	11,33 ± 1,52	13,47	4,66 ± 1,52 (e; f)	32,73	0 (d)	-
FHEP 0,5 %	0	-	0 (f)	-	0 (d)	-
FHEP 1 %	0	-	0 (f)	-	0 (d)	-
Deltametrina 0,001 %	0	-	0 (f)	-	0 (d)	-

Desvio padrão (DP); porcentagem do coeficiente de variação (% CV), (35 indivíduos)

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

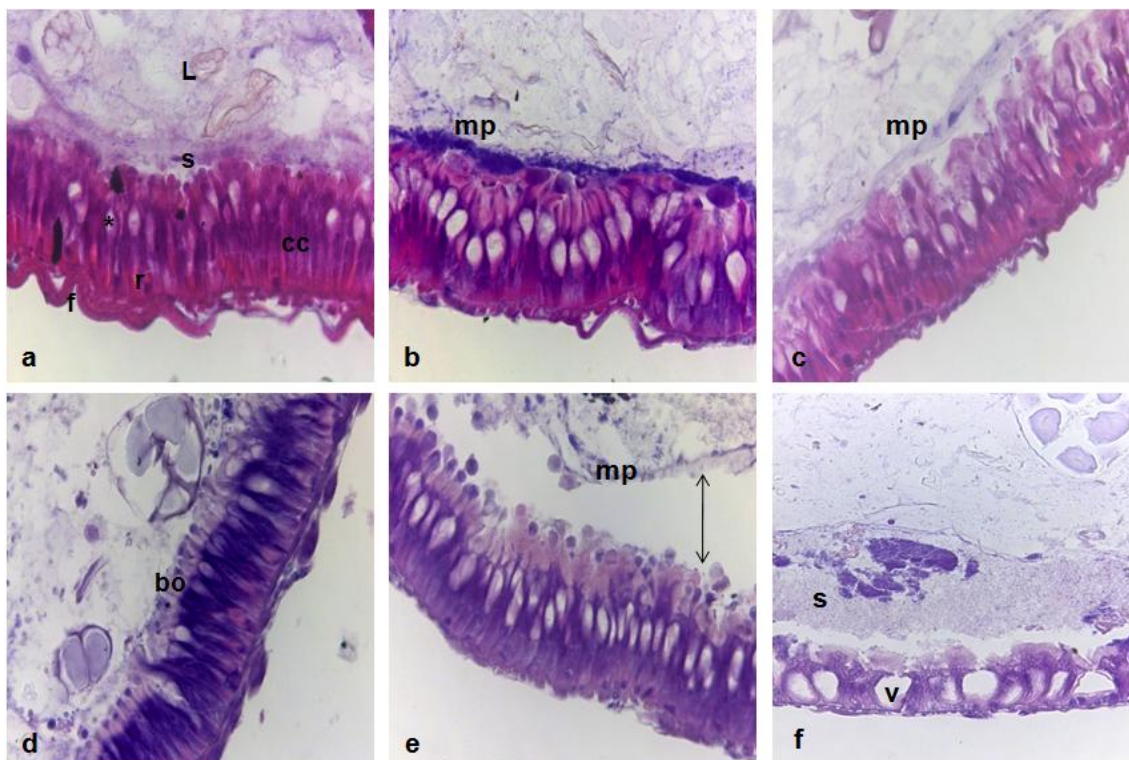


Figura 3: Histomorfologia do sistema digestório das lagartas com 13 dias de tratamento.

Corte longitudinal do tecido epitelial da região do mesêntero da lagarta *Spodoptera frugiperda* corado HE: (a) Grupo controle negativo 400X: Asterisco- célula caliciforme; cc- célula colunar; r- células regenerativas; f- fibras musculares longitudinal e transversal; s- secreção; L- lúmen. (b e c) FAEEP - 400X: mp- matriz peritrófica espessada; (d) FCEP -400X: bo- borda em escova espessada; (e) FHEP - 400X: seta dupla- aumento do espaço ectoperitrófico; (f) FHEP -200X: v- citoplasma celular vacuolizado e s- secreção

DISCUSSÃO

O rendimento do EPB (50%) esta de acordo com os parâmetros de pirólise convencional na faixa de temperatura entre 276 e 576 °C (Demirbas e Arin 2002), produzindo sólidos, líquidos e gases em porções significativas (Demirbas 2004). E o pH baixo do EPB (pH 2) é semelhante ao resultado do extrato proveniente de *Betula pendula* (Fagernäs et al. 2012) que ocorre devido principalmente a presença de ácido acético (Nakai et al. 2007).

As cetonas, fenóis, éteres, ésteres, ácidos, aldeídos e hidrocarbonos são as principais classes químicas encontradas no extrato pirolenhoso da cana que conferem com as classes químicas encontradas no trabalho de Moraes e colaboradores (2012) que são descritos na literatura como sendo típicos de bio-óleo a partir de material lenhoso-celulósicos (Lee et al. 2010).

A redução da massa corpórea das lagartas ocorreu em todas as frações dos grupos devido aos efeitos anti-alimentares que o extrato pirolenhoso provoca no organismo (Efrom et al. 2012). O efeito anti-alimentar observado principalmente na FHEP que possui característica lipofílica maior que nas outras frações, induz a formação e o acúmulo de micelas formadas pelas associações com lipídios que estão no mesêntero, criando uma barreira entre o alimento no lúmen e os poros da matriz peritrófica, diminuindo a taxa de absorção de nutrientes (Turunen e Chippendale, 1989).

As concentrações 0,25, 0,5 e 1% da FCEP e FAEEP também foram eficientes na redução da massa corpórea das lagartas pela presença de compostos como ácido decanoico e ácido tetradecanoico. Estes compostos presentes no extrato clorofórmico de *Premna latifolia* também reduziu o crescimento em 43,93% da *Spodoptera litura* no trabalho realizado por Kumar e colaboradores (2011) evidenciando os efeitos dos compostos no desenvolvimento de espécies do gênero *Spodoptera*.

As concentrações 0,5 e 1% da FHEP provocou uma mortalidade acima de 94% com 12 dias de experimento, atingindo 100% em 21 dias e as frações FCEP e FAEEP provocaram uma mortalidade que variou de 40,9 a 73,3% nas concentrações 0,5 e 1% com 12 dias e entre 66,6 a 95,3% com 21 dias, indicando que os insetos não se adaptaram ao extrato pirolenhoso com o passar do tempo, provocando a morte continua.

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo (Ferreira et al. 2013), já havíamos observado que a FHEP do bagaço da cana era tóxica em várias concentrações sobre *S. frugiperda*. Em nosso atual trabalho com a FHEP e as FCEP e FAEEP também apresentaram efeitos tóxicos, provocando a mortalidade, redução da massa corpórea, diminuição de pupas e mariposas. Estes efeitos estão relacionados com os danos provocados na região do mesêntero das lagartas que afeta a fisiologia do organismo.

A estrutura do mesêntero do grupo controle negativo esta de acordo com o descrito por Correia e colaboradores (2009) sem alteração histomorfológica. A FHEP apresentou aumento do espaço ectoperitrófico indicado pela deterrência alimentar, diminuindo o diâmetro do lúmen do mesêntero pela presença de poucos fragmentos de alimentos. Também apresentou vacúolos citoplasmáticos nas células do epitélio. Essa citopatologia é muito comum quando o tecido epitelial é colocado sob estresse por diferentes agentes nocivos, que podem perturbar a atividade fisiológica normal das células provocando deficiência na atividade da bomba de íons que levará à ativação da necrose ou apoptose celular (Fergestad et al. 2006).

Nas concentrações 0,5 e 1% da FCEP identificamos o aumento da borda em escova que indica carência de absorção dos nutrientes provocada pela deterrência, induzindo as células colunares a aumentarem a espessura da borda em escova, na tentativa de absorverem mais nutrientes e reverter a desnutrição que afeta o desenvolvimento larval e a ecdise, sendo as principais causas da mortalidade em insetos (Mordue et al. 1998).

Nas concentrações 0,5% e 1% da FAEEP foram observados espessamentos da matriz peritrófica em várias regiões que é uma forma de defesa estrutural para que compostos tóxicos consumidos pelo inseto não penetrem e entre em contato com as células (Hakim et al. 2010). A matriz peritrófica tem função de peneira para evitar a passagem de estruturas que estão no lúmen intestinal para o espaço ectoperitrófico que possam danificar as células do tecido epitelial (Barbehenn 2001), podendo permanecer nos poros e causar congestionamento e alteração na dinâmica dos fluidos intestinais.

Este mecanismo de defesa do organismo também dificulta a passagem de nutrientes pela matriz peritrófica, induzindo alterações fisiológicas nas lagartas (Hegedus et al. 2009) provocando desnutrição e redução do crescimento (Kachroo e Kachroo 2009). Porque a permeabilidade da matriz peritrófica também está relacionada com sua espessura (Richards e Richards 1977).

As concentrações 0,25, 0,5 e 1% da FHEP e a FCEP e as concentrações 0,5 e 1% da FAEEP apresentaram taxa de pupação abaixo de 35% em comparação ao grupo controle. Para fração FHEP apenas na menor concentração (0,1%) foram observadas mariposas. Os efeitos de mortalidade dos indivíduos durante o ciclo de vida da *S. frugiperda* tem como um dos motivos à intoxicação causada pelos compostos presentes nas frações que ingeriram durante a fase larval.

A eficiência das frações em provocar intoxicação nas lagartas é pelo efeito sinérgico dos compostos presentes nas frações do extrato pirolenhoso da cana. Estes compostos abrangem várias classes químicas como fenóis, cetonas, aldeídos, hidrocarbonos e ácidos (Cunha et al. 2013), que são relatados em outros trabalhos de possuírem compostos com efeito inseticida (Mithöfer e Boland 2012), variando de deterrência para toxicidade através de vários mecanismos de ação (Dyer et al, 2003) .

CONCLUSÕES

As três frações tiveram efeitos prejudiciais com destaque para a FHEP e a FCEP que apresentaram cada uma o total de 45 compostos que em conjunto exibiram efeito tóxico sobre as lagartas. Os efeitos tóxicos sobre as lagartas tiveram ação principalmente na diminuição da massa corpórea em ocorrência das alterações provocadas na região do mesêntero que estão relacionadas com a dificuldade de absorver os nutrientes e pelo colapso provocado no tecido epitelial. Assim, as lagartas expostas principalmente nas concentrações 0,5 e 1% das FCEP, FAEEP e FHEP apresentaram alta taxa de mortalidade, baixas taxa de pupação e de mariposas. Com estes resultados podemos dizer que as três frações são ativas contra as lagartas, sendo a FHEP a mais eficiente, provavelmente por ação de seus compostos serem menos polares e agindo no tecido epitelial do intestino e conseqüentemente sendo tóxicos.

AGRADECIMENTOS

A Doutora Doroty Mesquita Dourado e o Doutor Antonio Pancrácio de Souza pelo apoio prestado durante a realização dos experimentos. A Capes, CNPq e o Fundect pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbehenn RV (2001) Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Arch Insect Biochem Phys* 47:86-99.

Berlitz DL, Azambuja AO, Sebben A, Oliveira JV, Fiuza LM (2012) Mortality of *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (J E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae exposed to *Bacillus thuringiensis* and extracts of *Melia azedarach*. *Braz Arch Biol Technol* 55:725-731.

Correia AA, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC, Oliveira JV, Torres JB (2009) Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. *Neotrop Entomol* 38:83-91.

Cunha ME, Schneider JK, Brasil MC, Cardoso CA, Monteiro LR, Mendes FL, Pinho A, Jacques RA, Machado ME, Freitas LS, Caramão EB (2013) Analysis of fractions and bio-oil of sugar cane straw by one-dimensional and two-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometry (GC × GC/qMS). *Microchem J* 110:113-119.

Demirbas A (2004) Determination of calorific values of bio-chars and pyro-oils from pyrolysis of beech Trunkbarks. *J Anal Appl Pyrol* 72:215-9.

Demirbas A, Arın G (2002) An overview of biomass pyrolysis. *Energ Source Part A* 24:471-82.

Dyer LA, Dodson CD, Stireman III JO, Tobler MA, Smilanich AM, Fincher RM, Letourneau DK (2003) Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. *J Chem Ecol* 29:2499-2514.

Efrom CFS, Redaelli LR, Meirelles RN, Ourique CB (2012) Side-Effects of Pesticides Used in the Organic System of Production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. *Braz Arch Biol Technol* 55:47-53.

Fagenäs L, Kuoppala E, Tiilikkala K, Oasmaa A (2012) Chemical Composition of Birch Wood Slow Pyrolysis Products. *Energy Fuels* 26:1275-1283.

Fergestad T, Ganetzky B, Palladino MJ (2006) Neuropathology in *Drosophila* Membrane Excitability Mutants. *Genetics* 172:1031-1042.

Ferreira DAF, Ferreira MB, Favero S, Carollo CA (2013) Biological activity of sugarcane pyroligneous acid against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Afr J Biotechnol 12:6241-6244.

Gallo D, Nakano O, Silveira NS, Carvalho RPL, Batista GC, Berti FE, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB (2002) Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ, pp 919

Gallo MBC, Rocha WC, Da Cunha US, Diogo FA, Da Silva FC, Vieira PC, Vendramim JD, Fernandes JB, Da Silva MFGF, Pereira LGB (2006) Bioactivity of extracts and isolated compounds from *Vivex polygama* (Verbenaceae) and *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag Sci 62:1072-1081.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) *Velvetbean caterpillar*: a rearing procedure and artificial medium. J Econ Entomol 69:487-488.

Guillén MD, Manzano MJ (2002) Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. Food Chem 79:283-292.

Hakim RS, Baldwin K, Smagghe G (2010) Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. Annu Rev Entomol 55:593-608.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annu Rev Entomol 54:285-302.

Kachroo A, Kachroo P (2009) Fatty acid-derived signals in plant defense. Annu Rev Phytopathol 47:153-176.

Kumar A, Tamta ML, Negi N, Chandrasekhar K, Negi DS (2011) Phytochemical investigation and antifeedant activity of *Premna latifolia* leaves. Nat Prod Res 25:1680-1686.

Lee MK, Tsai WT, Tsaic YL, Lin SH (2010) Pyrolysis of napier grass in an induction heating reactor. J Anal Appl Pyrolysis 88:110-116.

Lindqvist I, Lindqvist B, Tiilikkala K, Hagner M, Penttinen O-P, Pasanen T, Setälä H (2010) Birch tar oil is an effective mollusc repellent: field and laboratory experiments using *Arianta arbustorum* (Gastropoda: Helicidae) and *Arion lusitanicus* (Gastropoda: Arionidae). Agric Food Sci 19:1-12.

Luna LG (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3 ed. New York, McGraw-Hill, pp 258

- Marumoto S, Yamamoto SP, Nishimura H, Onomoto K, Yatagai M, Yazaki K, Fujita T, Watanabe T (2012) Identification of a Germicidal Compound against Picornavirus in Bamboo Pyroligneous Acid. *J Agric Food Chem* 60:9106-9111.
- Mithöfer A, Boland W (2012) Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu Rev Plant Biol* 63:431-50.
- Moraes MSA, Georges F, Almeida SR, Damasceno FC, Maciel GPS, Zini CA, Jacques RA, Caramão EB (2012) Analysis of products from pyrolysis of Brazilian sugar cane straw, *Fuel Process Technol* 101:35-43.
- Mordue AJ, Simmonds MSJ, Ley SV, Blaney WM, Mordue W, Nasiruddin M, Nisbet AJ (1998) Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. *Pestic Sci* 54:277-284.
- Nakai T, Kartal SN, Hata T, Imamura Y (2007). Chemical characterization of pyrolysis liquids of wood-based composites and evaluation of their bio-efficiency. *Build Environ* 42:1236-1241.
- Richards AG, Richards PA (1977) The peritrophic membranes of insects. *Ann Rev Entomol* 22:219-40.
- Turunen S, Chippendale GM (1989) Relationship between dietary lipids, midgut lipids, and lipid absorption in eight species of Lepidoptera reared on artificial and natural diets. *J Insect Physiol* 35:627-633.

ANEXOS

Informação complementar

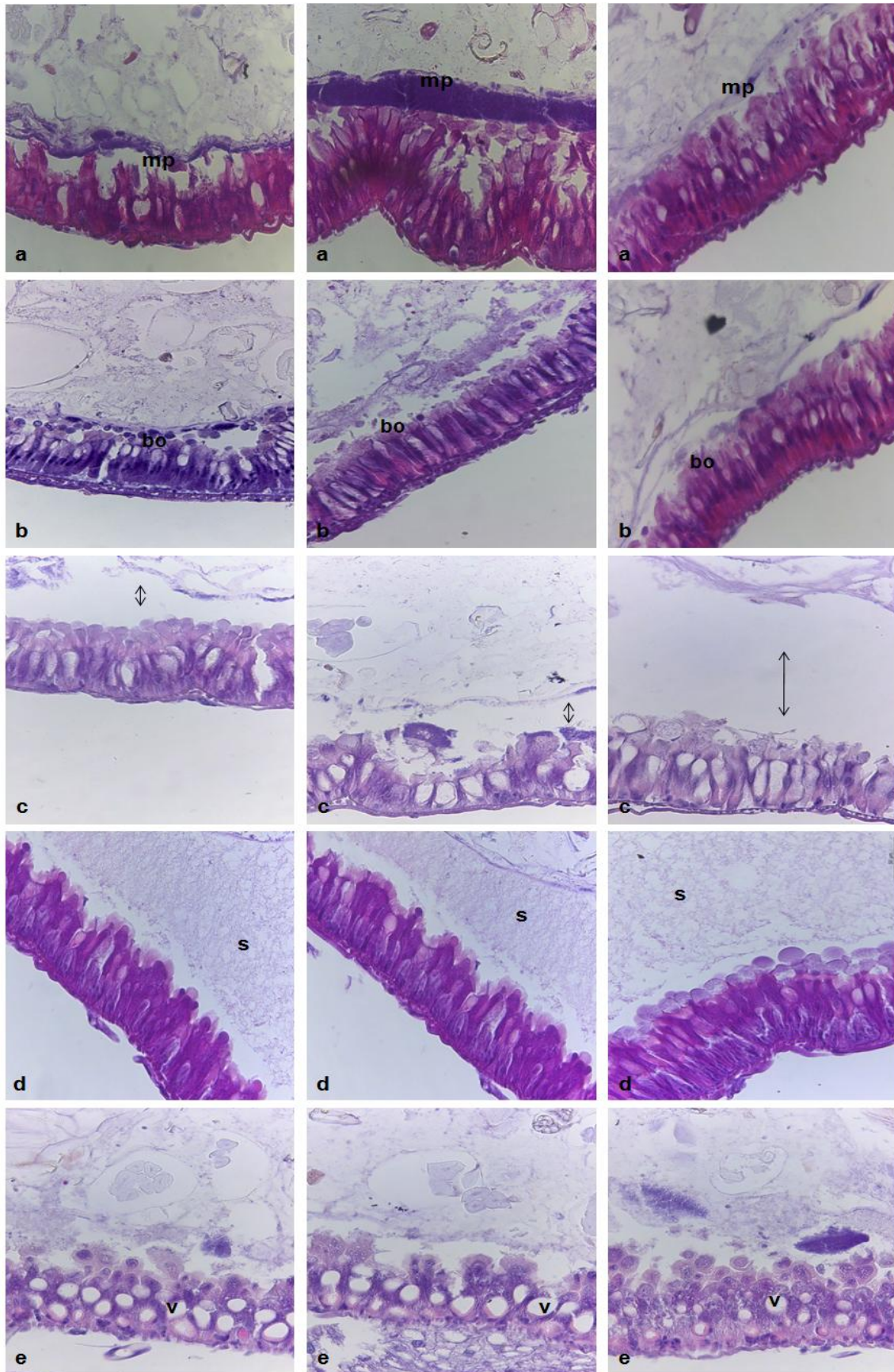


Figura: Histomorfologia do sistema digestório das lagartas com 13 dias de tratamento.

Corte longitudinal do tecido epitelial da região do mesêntero da lagarta *Spodoptera frugiperda* corado HE: (a) FAEEP - 400X: mp- matriz peritrófica espessada; (b) FCEP -400X: bo- borda em escova espessada; (c) FHEP -400X: seta dupla- aumento do espaço ectoperitrófico; (d e e) FHEP -400X: v- citoplasma celular vacuolizado e s- secreção

INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO NO JOURNAL PEST OF SCIENCE

Original Papers

Original papers report of research projects which yield valuable insights into topics within our coverage. Original articles are limited to 7,000 words per article (all text excluding tables and figure legends). Authors are reminded that electronic supplementary material can be published in the electronic edition of this journal to provide additional information for readers.

Specific Remark

Authors of Reviews and Guest Editorials are invited to supply a brief biographical summary (between 50 and 100 words) and a black and white glossy photograph, passport-sized.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Language

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s); A concise and informative title; The affiliation(s) and address(es) of the author(s); The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Key Message

Please summarize the main achievement of this work, above and beyond what may have been conveyed in the manuscript title. This Key Message may not contain more than 30 words and will be published in front of the abstract.

Author Contribution Statement

Authors must provide a short description of the contributions made by each listed author (please use initials). This will be published in a separate section in front of the Acknowledgments.

For example: AM and DB conceived and designed research. AM and BB conducted experiments. GR contributed new reagents and/or analytical tools. AM, BB and GR analyzed data. AM wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word; Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text; Use italics for emphasis; Use the automatic page numbering function to number the pages; Do not use field functions; Use tab stops or other commands for indents, not the space bar; Use the table function, not spreadsheets, to make tables; Use the equation editor or MathType for equations; Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions); Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Specific remarks

Please arrange the main body of your manuscript for Original and Methodological Papers as follows (Commentaries and Reviews have a more flexible format):

- Introduction

State the reason for your study, the context and the hypotheses being tested.

- Materials and Methods

Include sufficient details for the work to be repeated.

- Results

State the results, drawing attention to important details in tables and figures.

- Discussion

Point out the importance of the results and place them in the context of previous studies and in relation to the application of the work. Within a conclusion at the end of the discussion synthesize the paper's general contribution to pest sciences and its importance to sustainable pest control. Where appropriate, set out recommendations for management or policy.

- Genus and species names should be in italics.
- Units and symbols: Temperatures may be expressed in degrees Celsius, time in seconds (s), minutes (min), hours (h), days, etc. Otherwise, the International System of Units (SI, *Système International d'Unités*) should be used wherever possible. [Consult, e.g., U.S. Department of Commerce, National Bureau of Standards, Special Publication 330, *The International System of Units*, latest edition].
- Use the automatic page numbering function to number the pages and number all lines consecutively.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest

standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be
- numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Conflict of interest

- All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.
- If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

Does Springer provide English language support?

- Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.
- The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.
- Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.
- Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.