

ATIVIDADE INSETICIDA DOS FRUTOS DE *Trichilia clausenii* (MELIACEAE) SOBRE *Spodoptera frugiperda*

Liliane Nebo, Andréia Pereira Matos, Paulo Cezar Vieira*, João Batista Fernandes e Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos - SP, Brasil

Ricardo Ribeiro Rodrigues

Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, CP 9, 13418-900 Piracicaba - SP, Brasil

Recebido em 29/11/09; aceito em 1/6/10; publicado na web em 24/8/10

INSECTICIDAL ACTIVITY OF *Trichilia clausenii* (MELIACEAE) FRUITS AGAINST *Spodoptera frugiperda*. An evaluation of the insecticidal activity of the fruits extracts of *Trichilia clausenii* was carried out and the methanol extract revealed to have strong insecticidal activity. The fractionation of methanol extract of *T. clausenii* seeds bioassay-guided against *Spodoptera frugiperda* has led to the identification of the ω -phenylalkyl and alkenyl fatty acids as active compounds in this extract. The structures of the compounds were proposed by spectroscopic analysis and comparison with literature data.

Keywords: *Trichilia clausenii*; ω -phenylalkyl and alkenyl fatty acids; *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUÇÃO

O milho representa um dos principais cereais em todo mundo e é cultivado em pequenas, médias e grandes propriedades. No Brasil é considerada como cultura de expressão nacional, de grande importância social e econômica, e está presente de norte a sul do País.¹ São utilizados, durante o desenvolvimento da cultura, insumos sintéticos como pesticidas que, além de aumentar os custos de produção, poluem o ambiente e deixam resíduos nos alimentos. O controle de pragas é uma das atividades de importância econômica que deve ser bem planejada para a obtenção de maiores rendimentos econômicos.² A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), destaca-se como importante praga do milho, tanto pela redução da produtividade e da qualidade do produto final, quanto pela dificuldade de controle.^{2,3}

Um dos primeiros relatos da atividade inseticida de *Trichilia* spp. sobre *S. frugiperda* foi feito por Mikolajczak e Reed.⁴ Experimentos realizados adicionando extratos aquosos de *T. casaretti*, *T. catigua*, *T. clausenii*, *T. elegans* e *T. pallida* à dieta artificial afetaram o desenvolvimento das lagartas de *S. frugiperda*.⁵ Extratos orgânicos das folhas, ramos e frutos de *T. clausenii* e dos frutos de *T. catigua*, *T. elegans* foram avaliados sobre *S. frugiperda* em condições de laboratório.^{6,7} Os extratos hexânico e metanólico de folhas e o hexânico de ramos de *T. clausenii* foram os mais eficientes, apresentando alta taxa de mortalidade larval (superior a 60,0%).⁶ Dentre os frutos, os melhores resultados foram apresentados pelos extratos hexânico e metanólico de *T. elegans* com mortalidade larval de 100,0%.⁷

O estudo químico das folhas de *T. clausenii* resultou no isolamento de um cicloartano, uma mistura de ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos, aminoácidos e um sesquiterpeno;⁸ dos galhos foram isolados esteroides pregnanos e sesquiterpenos⁹ e, dos frutos, novas γ -lactonas.¹⁰

Em vista do exposto, desenvolveu-se este trabalho com o objetivo de avaliar a bioatividade de extratos orgânicos e dos constituintes químicos dos frutos de *T. clausenii* sobre *S. frugiperda*.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX operando a 400 MHz para ¹H, utilizando-se CDCl₃ como solvente e TMS como padrão interno.

As separações cromatográficas em colunas foram realizadas utilizando-se gel de sílica 60, 70-230, 230-400 mesh. As análises cromatográficas em camada fina foram realizadas em cromatoplas de sílica gel F₂₅₄ sobre placa de alumínio Merck, de 0,2 mm de espessura, empregando-se como revelador a solução de vanilina/ácido sulfúrico.

Para identificação dos ésteres metílicos do conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo QP-5000, com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,15 μ m), utilizando as seguintes condições: temperatura do detector: 280 °C, injetor: 250 °C, gás de arraste: He, temperatura inicial do forno: 70 °C por 2 min, velocidade de aquecimento a 10 °C/min até 290 °C, permanecendo nessa temperatura por 20 min. O espectro de massas foi obtido por impacto de elétrons a 70 eV.

Material vegetal

Os frutos de *T. clausenii* foram coletados em Piracicaba/SP no Campus da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, e identificados pelo botânico Dr. R. R. Rodrigues. Uma excisada foi depositada no herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" sob o número 7395.

Preparação dos extratos

Os frutos de *T. clausenii* foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 7 dias e posteriormente separados em cascas do fruto (pericarpo, TCCF, 56,8 g), cascas da semente (arilo, TCCS, 7,90 g), semente (TCS, 35,1 g). A extração das partes dos frutos de *T. clausenii* foi realizada por maceração a temperatura ambiente e em repouso, com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, MeOH e MeOH/água 1:1). As soluções obtidas

*e-mail: paulo@dq.ufscar.br

foram concentradas por destilação do solvente em evaporador rotativo, fornecendo os extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico, respectivamente. Os extratos foram submetidos a ensaios de toxicidade sobre a lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda*, e os que apresentaram atividade foram fracionados.

Ensaio de toxicidade

Os ensaios biológicos sobre *S. frugiperda* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar, a 25 ± 1 °C, UR de $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 h. Para realização dos testes, a criação de *S. frugiperda* (J. E. Smith) foi mantida em laboratório, sendo as lagartas alimentadas com dieta artificial e os adultos com solução de mel a 10%.¹¹

Os ensaios de toxicidade basearam-se na metodologia descrita por Paula et al.¹² Para realização dos bioensaios, foram preparadas soluções das amostras em acetona e/ou água. Foram utilizados grupos de 10 larvas de *S. frugiperda* no segundo instar (5 dias), onde cada grupo foi transferido para placas de Petri. As médias dos pesos dos grupos de insetos foram obtidas pelas medidas realizadas em balança analítica. Em cada inseto, 1 μ L da solução em acetona ou água foi aplicado topicamente, via uma microsseringa. Para evitar a possível morte do inseto, em cada grupo de larvas foi colocada pequena porção (300,0 mg) da dieta artificial. Este processo foi realizado 1 h após a aplicação da solução. O controle consistiu na aplicação de 1 μ L de acetona ou água em cada inseto e foi realizado utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. Todos os experimentos e o respectivo controle foram realizados em triplicata. Todos os ensaios foram realizados na concentração de 10 mg/mL e a mortalidade dos insetos foi verificada após 48 h. Os resultados foram expressos em média da porcentagem da mortalidade e analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA), sendo usado $P \leq 0,05$ como nível de significância.

Isolamento e identificação dos constituintes químicos de *T. clausenii*

O extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* (TCSM, 4,54 g) foi suspenso em uma mistura MeOH/H₂O (7:3) e particionado sucessivamente com hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O, obtendo-se após a evaporação dos solventes as frações: TCSM1 = 0,37 g ; TCSM2 = 0,06 g ; TCSM3 = 1,00 g e TCSM4 = 3,10 g, respectivamente. As frações obtidas foram submetidas ao ensaio de toxicidade sobre *S. frugiperda*. A fração bioativa TCSM1 (0,37 g) foi fracionada em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) empregando-se como eluentes: hexano 100%, hexano/AcOEt (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1) e MeOH 100%; as frações obtidas foram reunidas em 6 frações (TCSM1-1 a TCSM1-6) com base na semelhança revelada pela análise por cromatografia em camada fina e, posteriormente, submetidas ao ensaio de toxicidade. As sub-frações bioativas TCSM1-3 (0,05 g) e TCSM1-4 (0,20 g) foram fracionadas em gel de sílica (70-230 mesh), utilizando como eluente hexano/AcOEt/MeOH (hexano/AcOEt (8:2/7:3/1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (99:1/98:2/95:5/9:1/8:2/7:3/1:1) e MeOH 100%) em gradiente de polaridade crescente. Através das similaridades cromatográficas as frações foram reunidas e submetidas ao ensaio de toxicidade. As sub-frações bioativas TCSM1-3-2 (0,006 g) e TCSM1-4-4 (0,01 g) foram identificadas como mistura dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos através da análise dos espectros de RMN de ¹H e por comparação com os dados da literatura. Para identificação do tamanho das cadeias metilênicas dos ácidos, uma pequena alíquota das amostras foi esterificada com diazometano como descrito por Leonard et al.,¹³ fornecendo os ésteres metílicos identificados via CG/EM e por comparação com a literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os extratos orgânicos das cascas dos frutos (TCCF, pericارpo), cascas das sementes (TCCS, arilo) e sementes (TCS) de *T. clausenii* foram submetidos a ensaios de toxicidade sobre *S. frugiperda*. Os resultados iniciais mostraram que o extrato metanólico das sementes de *T. clausenii* (TCSM) provocou a mais alta porcentagem de mortalidade (64,0%, Figura 1).

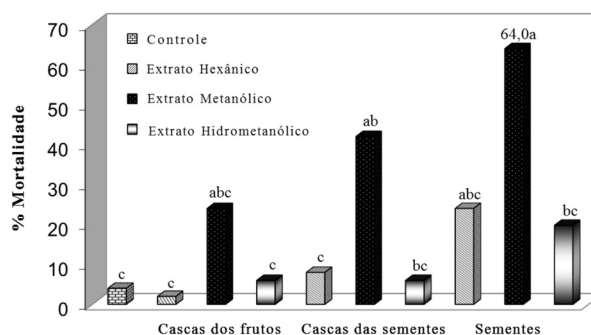


Figura 1. Ensaio de toxicidade realizado com os extratos dos frutos de *T. clausenii* sobre *S. frugiperda* na concentração de 10,0 mg/mL

O extrato TCSM foi então fracionado, fornecendo as frações hexano (TCSM-1), diclorometano (TCSM-2), acetato de etila (TCSM-3) e hidrometanólico (TCSM-4). Entretanto, somente a fração TCSM-1 apresentou atividade relevante com 70,0% de mortalidade sobre a lagarta-do-cartucho (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos ensaios de toxicidade sobre *S. frugiperda* do extrato, frações e do conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos de *T. clausenii*

Extrato	% Mortalidade
TCSM	64,0 a
Frações	
TCSM-1	70,0 a
TCSM-2	24,8 bc
TCSM-3	26,7 bc
TCSM-4	43,3 ab
Substâncias	
Conjunto dos Ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos da fração TCSM-1-4-4	73,3 a
Controle	6,60 c

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O fracionamento biomonitorado da fração TCSM-1 levou às sub-frações bioativas TCSM-1-3-2 (59,0% de mortalidade) e TCSM-1-4-4 (73,3% de mortalidade) (Tabela 1).

Os espectros de RMN de ¹H das frações TCSM-1-4-4 e TCSM-1-3-2 evidenciaram a presença de ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos nestas frações através dos sinais observados entre δ_H 7,15-7,28 (m) indicativos de hidrogênios ligados aos anéis aromáticos; dois tripletos em δ_H 2,59 e δ_H 2,24 referente aos hidrogênios das posições benzílicas e α -carbonílicas, respectivamente; sinais em δ_H 1,20-2,00 (m) característicos de hidrogênios de cadeia metilênica e um sinal em δ_H 5,34 (t) referente aos hidrogênios ligados às ligações duplas. A ausência de sinais entre δ_H 3,50 e δ_H 4,50 indica que não estão

presentes nestas frações ésteres metílicos e/ou ésteres graxo. Esses dados para os ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos são equivalentes aos relatados anteriormente.^{8,14}

Para identificação dos constituintes minoritários (ácidos graxos), do tamanho das cadeias metilênicas dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos e localização da posição da ligação dupla dos últimos, uma pequena alíquota das frações TCSM-1-4-4 e TCSM-1-3-2 foi esterificada com diazometano¹³ e, posteriormente, analisada via CG-EM. Através da comparação dos espectros de massas com os dados da biblioteca do CG-EM e da literatura,^{8,14} foi possível propor os tamanhos das cadeias metilênicas desses ácidos que variaram entre 10 a 15 carbonos (Figura 2, Tabela 2). Foi possível propor também a localização da ligação dupla dos ácidos ω -fenil alquenoicos entre os carbonos δ - ϵ em relação ao grupo fenila. Os ácidos ω -fenil alquenoicos apresentaram como pico base m/z 104, oriundo da fragmentação do tipo McLafferty da ligação dupla (Esquema 1). O cromatograma da fração bioativa TCSM-1-4-4 apresentou 39 picos, cujos espectros de massas foram comparados aos da biblioteca de dados do CG-EM e literatura,^{8,14} resultando na identificação de 18 ácidos que correspondem a 88,9% da porcentagem relativa dos mesmos na fração, sendo 74,8% ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos e 14,1% ácidos graxos (Tabela 2).

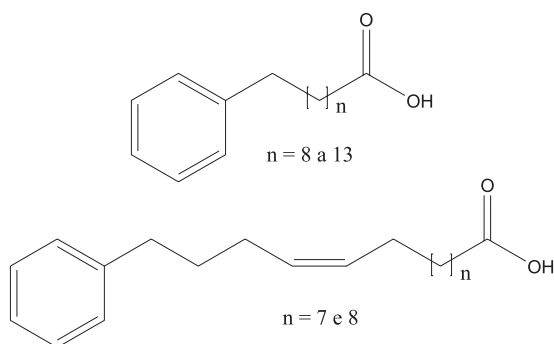
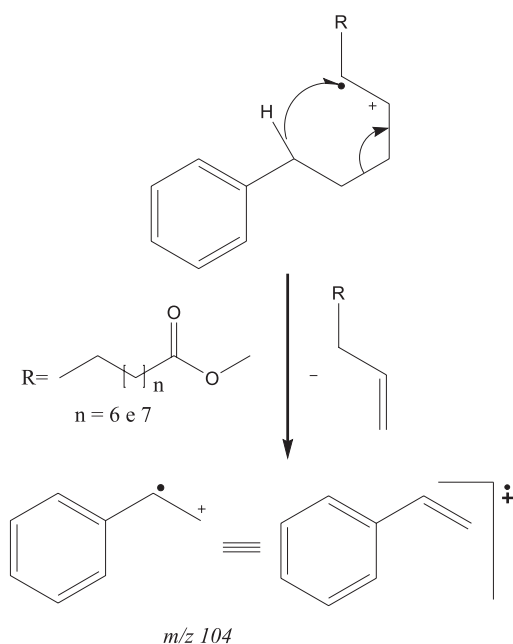


Figura 2. Ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos identificados nas sementes de *T. clausenii*



Esquema 1. Proposta de fragmentação do tipo McLafferty para ligações duplas em ácidos ω -fenil alquenoicos

Tabela 2. Porcentagem dos ésteres metílicos dos ácidos ω -fenil alcanóicos, alquenoicos e graxos presentes na fração bioativa TCSM-1-4-4

Ésteres	Tempo de retenção (min)	Porcentagem (%)
Octanodioato de metila	12,361	0,66
Nonanodioato de metila	13,713	0,86
Tetradecanoato de metila	15,948	0,60
Pentadecanoato de metila	17,107	1,48
Hexadecenoato de metila	17,949	0,27
Hexadecanoato de metila	18,217	5,95
Heptadecenoato de metila	19,017	2,50
ω -fenil decanoato de metila	19,242	1,24
Octadecenoato de metila	20,029	1,17
ω -fenil undecanoato de metila	20,295	4,20
ω -fenil dodecanoato de metila	21,348	14,16 18,51
ω -fenil tridecanoato de metila	22,317	18,51
ω -fenil tetradecenoato de metila	22,953	3,37
ω -fenil tetradecanoato de metila	23,222	12,84
ω -fenil pentadecenoato de metila	23,848	5,18
Docosanoato de metila	23,913	0,27
ω -fenil pentadecanoato de metila	24,131	15,30
Tetracosanoato de metila	25,755	0,34
Total	-	88,9

A ocorrência dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos já foi relatada anteriormente em folhas de *T. clausenii*,⁸ porém ainda não havia relatos da associação dos mesmos com a atividade inseticida encontrada nesta espécie.

Vanderherchen *et al.*¹⁵ sintetizaram substâncias da classe de ácidos ω -fenil alcanóicos e demonstraram a atividade dos mesmos em outras espécies de insetos. Ensaios por aplicação tópica foram realizados com os ácidos 7-fenileptanoico e 7-fenilept-4-enóico na dose de 50,0 μ g/inseto em lagartas de 4^o instar de *Manduca sexta* (Lepdoptera: Sphingidae), *Heliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) e foram observadas mortalidades na faixa de 55,0 a 70,0%. O modo de ação dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos em lepdópteros ainda é desconhecido.

Através do biomonitoramento realizado dos extratos e frações dos frutos de *T. clausenii*, pôde-se constatar que as substâncias ativas sobre *S. frugiperda* eram o conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos. Esse conjunto de ácidos apresenta-se como uma nova classe química de potenciais agentes inseticidas, assim como os limonoides encontrados em meliáceas.¹⁶

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES e FAPESP pelas bolsas e apoios financeiros concedidos.

REFERÊNCIAS

- Cruz, I.; *A lagarta-do-cartucho na cultura do milho*, Embrapa/CNPMS: Sete Lagoas, 1995 (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, n. 21).
- Carvalho, A. O. R.; *Pragas do milho e seu controle*, IAPAR: Londrina, 1982 (Circular Técnica, 29).

3. Waquil, J. E.; Viana, P. A.; Lordello, A. I.; *Pesq. Agropec. Bras.* **1982**, *17*, 163; Bianco, R.; *A cultura do milho no Paraná*, IAPAR: Londrina, 1991 (Circular Técnica, 68).
4. Mikolajczak, K. L.; Reed, D. K.; *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13*, 99.
5. Rodríguez, H. C.; Vendramim, J. D.; *Man. Integ. Pragas* **1996**, *42*, 14; Rodríguez, H. C.; Vendramim, J. D.; *Rev. Agric.* **1997**, *72*, 305.
6. Matos, A. P.; Nebo, L.; Batista-Pereira, L. G.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Rodrigues, R. R.; *Bioassay* **2006**, *1/X*, 1.
7. Matos, A. P.; Nebo L.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Rodrigues, R. R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1553.
8. Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 795.
9. Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; Rodrigues Fo., E.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1495; Pupo, M. T.; Adorno, M. A. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Pirani, J. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 382.
10. Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. G. F.; *Phytochemistry* **1998**, *48*, 307.
11. Kasten, P. Jr.; Precetti, A. A. C. M.; Parra, J. R. P.; *Rev. Agric.* **1978**, *53*, 68; Parra, J. R. P. Em *Controle microbiano de insetos*; Alves, S. B., ed.; Editora Manole: São Paulo, 1986.
12. Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Piló-Veloso, D.; Picanço, M. C.; *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 168.
13. Leonard, J.; Lygo, B.; Procter G.; *Advanced Practical Organic Chemistry*, 2nd ed., Chapman & Hall: Oxford, 1995.
14. Pizzolatti, M. G.; Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; *Nat. Prod. Res.* **2004**, *18*, 433.
15. Vanderherchen, M. B.; Isherwood, M.; Thompson, D. M.; Linderman, R. J.; Roe, R. M.; *Pest. Biochem. Physiol.* **2005**, *81*, 71.
16. Champagne, D. E.; Koul, O.; Isman, M. B.; Scuder, G. G. E.; Towers, G. H. N.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 377; Rodríguez, B.; Caballero, C.; Ortego, F.; Castañera, P.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 452.