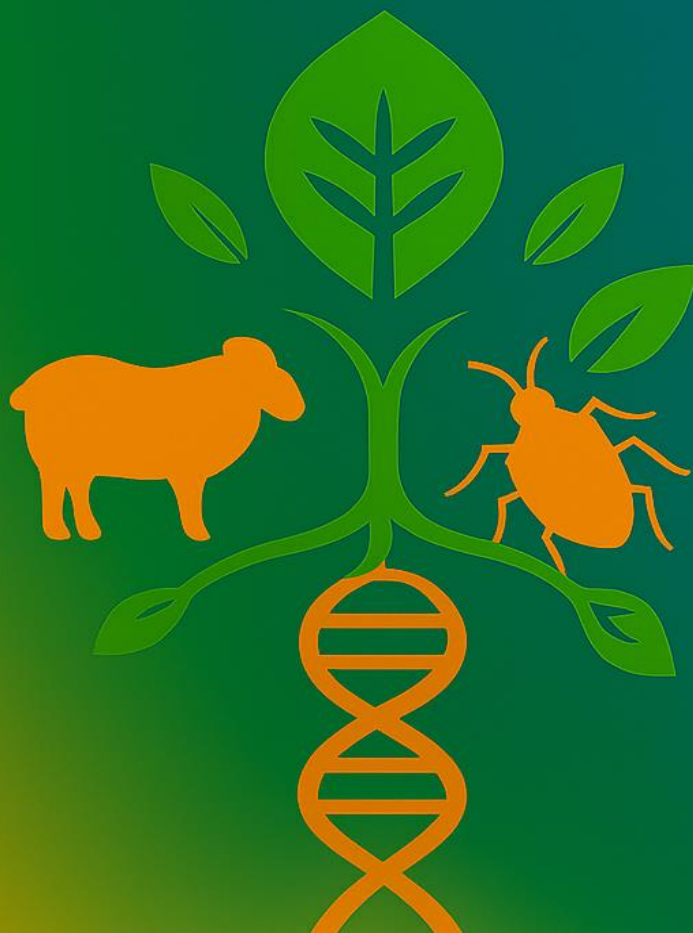


ANAIIS DO 1º WORKSHOP

transformando recursos genéticos do
semiárido em produtos sustentáveis para o
agronegócio



ANAIS DO 1º Workshop – transformando recursos genéticos do semiárido em produtos sustentáveis para o agronegócio

Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho

Reitor

Prof. Dr. Rosalvo Ferreira Santos

Vice-Reitor

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Junior

Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa

Prof. Dr. Gladston Rafael de Arruda Santos

Coordenador de Pós-Graduação

Prof. Dr. Leandro Bacci

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade

Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank

Coordenador do Projeto e do Evento

INSTITUIÇÃO SEDE:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

INSTITUIÇÕES EXTERNAS:

EMDAGRO - Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EDITORES:

Arie Fitzgerald Blank

Fabiany de Andrade Brito

Itamara Bomfim Gois

Virginia Elena Masiulionis

Leandro Bacci

COMISSÃO ORGANIZADORA

Arie Fitzgerald Blank

Fabiany de Andrade Brito

Leandro Bacci

COMISSÃO CIENTÍFICA

Arie Fitzgerald Blank

Fabiany de Andrade Brito

Leandro Bacci

Hymerson Costa Azevedo

Itamara Bomfim Gois

Gladston Rafael de Arruda Santos

Marcelo da Costa Mendonça

Tárcio Souza Santos

Virginia Elena Masiulionis

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

W926a Workshop Transformando Recursos Genéticos do Semiárido em
Produtos Sustentáveis para o Agronegócio (1. : 2024 : São
Cristóvão, SE).

Anais do 1. Workshop Transformando Recursos Genéticos do
Semiárido em Produtos Sustentáveis para o Agronegócio [recurso
eletrônico] : 23 de agosto de 2024, São Cristóvão, SE / organização,
Arie Fitzgerald Blank, Fabiany de Andrade Brito, Leandro Bacci. –
São Cristóvão, SE : Universidade Federal de Sergipe, Programa de
Pós- Graduação em Agricultura e Biodiversidade, 2025.
99 p. : il.

ISBN 978-85-7822-782-1

1. Agrobiodiversidade – Congressos. 2. Genética vegetal -
Congressos. 3. Essências e óleos essenciais. I. Blank, Arie Fitzgerald,
II. Fabiany de Andrade, Brito. III. Bacci, Leandro. IV. Universidade
Federal de Sergipe. Programa de Pós-Graduação em Agricultura e
Biodiversidade. V. Título.

CDU 631

APRESENTAÇÃO

O Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), juntamente com o Programa de Pós-graduação Integrado em Zootecnia (PPIZ), a Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (EMDAGRO) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) realizou no dia 23 de Agosto de 2024 o Workshop “Transformando Recursos Genéticos do Semiárido em Produtos Sustentáveis para o Agronegócio”. Este evento teve como principal objetivo divulgar junto à comunidade científica, os relevantes trabalhos desenvolvidos no projeto que possui o mesmo título do evento, financiado pelo Edital CAPES/FAPITEC Nº 4/2021 (Apoio ao desenvolvimento da região semiárida brasileira). A proposta é coordenada pelo PPGAGRI, e tem parceria com o PPIZ, EMBRAPA e EMDAGRO. O projeto iniciou-se em 2021 e finalizará em 2025, formando recursos humanos altamente qualificados, junto com o desenvolvimento de tecnologias e produtos biotecnológicos inovadores voltados ao desenvolvimento do agronegócio do semiárido, em Sergipe.

A palestra de abertura foi realizada pelo então Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa professor Doutor Lucindo José Quintans Junior. Em seguida, alunos de graduação (Iniciação Científica), Pós-graduação (mestrado e doutorado) e pós-doutorado apresentaram os resultados das pesquisas desenvolvidas, os quais deram origem aos capítulos que compõem este livro. As pesquisas foram relacionadas aos temas: caracterização morfoagronômica e química de plantas nativas do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da UFS, efeito dos óleos essenciais sobre pragas agrícolas, bioinseticidas a base de fungos entomopatogênicos e influência da alimentação na capacidade reprodutiva de carneiros, bem como a qualidade do sêmen. Ao final das apresentações dos resultados, houve uma mesa redonda realizada pelos pesquisadores Arie Fitzgerald Blank, Leandro Bacci, Hymerson Costa Azevedo, Gladston Rafael de Arruda Santos e Marcelo da Costa Mendonça, na qual discutiram os resultados alcançados, além das perspectivas e ações necessárias para transformar recursos genéticos do semiárido em produtos sustentáveis para o agronegócio.

Prof. Dr. Leandro Bacci
Coordenador do PPGAGRI

SUMÁRIO

Análise química dos óleos essenciais extraídos de plantas de <i>Croton blanchetianus</i> coletadas em municípios de Sergipe	6
Caracterização molecular de germoplasma de <i>Croton blanchetianus</i> Baill. coletado em municípios do estado de Sergipe	13
Caracterização morfoagronômica de germoplasma de <i>Croton blanchetianus</i> do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da UFS	20
Caracterização química dos óleos essenciais de acessos de <i>Croton grewioides</i>	27
Toxicidade do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
Tabela de vida de <i>Podisus nigrispinus</i> tratados com óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	40
Toxicidade do óleo essencial de <i>Croton grewioides</i> sobre <i>Podisus nigrispinus</i>	46
Resposta olfativa do <i>Euschistus heros</i> tratados com o óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>	50
Efeitos subletais do essencial de <i>Lippia gracilis</i> sobre o percevejo-marrom-da-soja	59
Fungos entomopatogênicos da região semiárida do estado de Sergipe: isolamento, caracterização e aplicação no controle biológico de pragas agrícolas	66
Formulação bioinseticida à base de conídios de fungo entomopatogênico microencapsulados por <i>Spray Drying</i>	73
Propriedades antioxidantes do feno de <i>Moringa oleifera</i> e seu efeito sobre a capacidade reprodutiva de carneiros	80
Influência do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na qualidade do semen de carneiros	89
ANEXO – PROGRAMAÇÃO	97

Análise química dos óleos essenciais extraídos de plantas de *Croton blanchetianus* coletadas em municípios de Sergipe

Rosemeire Santos Costa¹

Fabiany de Andrade Brito (Apresentadora)²

Itamara Bomfim Gois³

Ryan Santos Ribeiro⁴

Alberto Ferreira do Nascimento Júnior⁵

Arie Fitzgerald Blank⁶

¹Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ²Pós-Doutorado, projeto “Transformando recursos genéticos do semiárido em produtos sustentáveis para o agronegócio”; ³Pós-Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ⁴Graduação, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe; ⁵Agrônomo, Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe; ⁶Docente, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

Euphorbiaceae é uma família botânica diversa, com usos na alimentação humana e medicina popular. Amplamente distribuída no Brasil, inclui algumas espécies nativas do gênero *Croton*, a exemplo de *Croton blanchetianus* (marmeleiro) de ocorrência natural em Sergipe (Trindade e Lameira, 2014). Esta espécie possui óleos essenciais (OE's) de composição química complexa e diversa, formado principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos com atividade antibacteriana, antifúngica, acaricida e inseticida já elucidada (SILVA *et al.*, 2020; CAMARA *et al.*, 2021; PORTO *et al.*, 2021; VASCONCELOS *et al.*, 2022a). Alguns compostos químicos encontrados no OE desta espécie foram biciclogermacreno (10,42 - 33,0%), 1,8-cineol (19,95 - 32,94%), E-cariofileno (11,85 - 27,52%), espatulenol (8,07 - 24,10%) e α -pineno (9,14 - 19,19%) (ANGÉLICO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019; CAMARA *et al.*, 2021; PORTO *et al.*, 2021; VASCONCELOS *et al.*, 2022a; VASCONCELOS *et al.*, 2022b; CAVALCANTE *et al.* 2022).

Oriundos do metabolismo secundário de plantas, os OE's são compostos químicos voláteis que podem ser obtidos das folhas, raízes, cascas ou sementes (GUERRA *et al.*, 2019). Fatores endógenos e exógenos podem afetar o teor e composição química dos óleos essenciais. Como fatores endógenos cita-se composição genética, características anatômicas e fisiológicas. Já os fatores exógenos, ao longo de um determinado período, influenciam a ação dos genes nas rotas biossintéticas responsáveis pela produção dos compostos voláteis. A quimiotaxonomia, que diferencia indivíduos (incluindo de uma mesma espécie) de acordo com sua constituição química, pode ser usada para classificar plantas possuidoras de óleos essenciais (BARRA, 2009; SIMÕES *et al.*, 2017), bem como auxiliar no desenvolvimento de estratégias para conservação de plantas bioativas.

A composição química dos OEs varia de acordo com a espécie, clima e local de origem (ESLAHI *et al.*, 2017). Os OE's de uma espécie bioativa apresentaram variações quantitativas e qualitativas dependendo da região geográfica de coleta, agrupando as plantas estudadas em grupos

químicos definidos pelos compostos majoritários de interesse (DE SÁ FILHO *et al.*, 2022). Devido a sua importância na saúde humana e na agricultura, são necessários estudos aprofundados e esforços para realizar a conservação de *C. blanchetianus*, mitigando os efeitos negativos ocasionados pela degradação ambiental.

Dessa forma, objetivo do presente estudo foi caracterizar quimicamente os óleos essenciais extraídos de plantas de *Croton blanchetianus* coletadas em municípios de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas a prospecção e a coleta de plantas de *C. blanchetianus* em seis municípios de Sergipe: Aquidabã, Graccho Cardoso, Itabi, Lagarto, Poço Verde e Tobias Barreto.

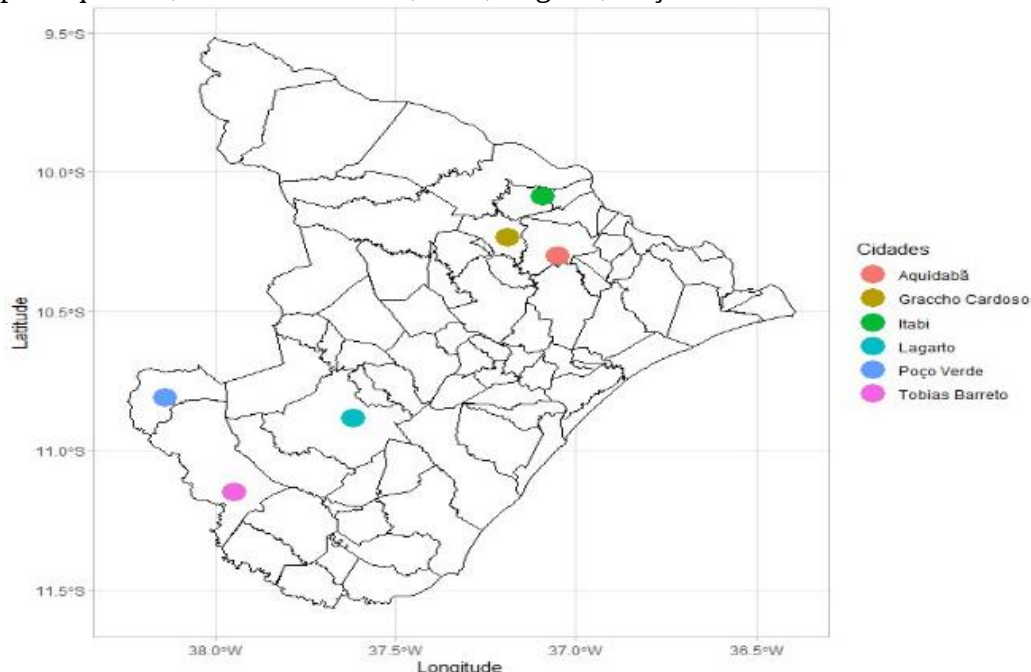


Figura 1. Locais de coleta de *Croton blanchetianus* em Sergipe.

As folhas coletadas de 70 plantas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 ± 1 °C durante cinco dias. Os óleos essenciais das folhas foram extraídos por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 3 L, e uma manta térmica como fonte geradora de calor, por 120 minutos após o início da ebulição da água. A extração foi realizada em triplicata, com a utilização de amostras de 50g de folhas secas e 2,0 L de água. O óleo extraído foi coletado e armazenado em frascos âmbar a -20°C até análise da composição química em Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrometro de Massas (CG/MS).

Após a identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais, foi realizada uma análise de agrupamento usando o software Statistica. Depois, uma matriz de dissimilaridade foi construída com base nas distâncias euclidianas entre as plantas, simplificada com a formação de um dendrograma usando o método de agrupamento de Ward.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 70 plantas de *C. blanchetianus* em 6 municípios de Sergipe (Tabela 1), indicando uma ampla ocorrência da espécie no estado.

Tabela 1. Georreferenciamento das plantas de *Croton blanchetianus* coletadas em populações nativas no estado de Sergipe.

Código	Municípios	Nº de pop.	Nº plantas	Coordenadas geográficas
CBPV	Poço Verde	01	08	S10°48'33,1" W38°08'21,4"; S10°48'30,6" W38°08'22,4"; S10°48'27,5" W38°08'23,4"; S10°48'38,7" W38°08'24,2"; S10°48'14,9" W38°08'06,4"; S10°48'15,7" W38°08'04,6"; S10°48'14,8" W38°08'02,1"; S10°48'18,9" W38°08'11,7".
CBTB	Tobias Barreto	02	12	S11°08'53,0" W37°56'41,2"; S11°08'52,9" W37°56'41,6"; S11°08'54,1" W37°56'43,4"; S11°08'59,4" W37°56'50,4"; S11°10'05,2" W37°58'45,9"; S11°10'03,6" W37°58'52,0"; S11°09'42,0" W38°00'38,2"; S11°10'04,1" W37°58'47,2"; S11°06'14,8" W38°02'05,2"; S11°06'24,1" W38°02'02,3"; S11°06'28,3" W38°02'00,3"; S11°06'26,6" W38°02'01,0".
CBLG	Lagarto	03	12	S10°53'10,5" W37°36'55,9"; S10°53'11,3" W37°36'56,2"; S10°53'12,0" W37°36'55,4"; S10°53'13,7" W37°36'55,8"; S10°51'55,7" W37°36'00,7"; S10°52'01,5" W37°35'59,2"; S10°51'53,4" W37°36'01,0"; S10°51'59,1" W37°36'00,2"; S10°50'58,4" W37°36'18,0"; S10°50'52,8" W37°36'17,3"; S10°50'49,6" W37°36'18,1"; S10°50'43,8" W37°36'17,8".
CBIT	Itabi	04	12	S10°05'19,6" W37°05'33,4"; S10°05'19,4" W37°05'33,3"; S10°05'19,3" W37°05'36,0"; S10°05'18,5" W37°05'35,1"; S10°06'51,2" W37°06'29,7"; S10°06'49,9" W37°06'28,6"; S10°06'48,3" W37°06'41,3"; S10°06'47,3" W37°06'43,7"; S10°07'51,1" W37°07'04,0"; S10°07'49,6" W37°07'04,9"; S10°07'50,6" W37°07'08,9"; S10°07'54,5" W37°07'21,0".

CBGC	Graccho Cardoso	05	14	S10°14'02,9" W37°11'21,5";
				S10°14'04,5" W37°11'23,5";
				S10°14'05,8" W37°11'23,7";
				S10°14'06,8" W37°11'25,6";
				S10°13'49,5" W37°13'16,2";
				S10°13'49,6" W37°13'16,9";
				S10°13'48,6" W37°13'16,4";
				S10°13'48,0" W37°13'16,4";
				S10°13'47,3" W37°13'16,4";
				S10°13'46,9" W37°13'15,9";
				S10°13'46,8" W37°13'14,5";
				S10°13'45,7" W37°13'13,6";
				S10°13'45,2" W37°13'12,8";
				S10°13'44,1" W37°13'12,4".
CBAQ	Aquidabã	05	12	S10°17'45,2" W37°02'10,7";
				S10°17'45,1" W37°02'09,2";
				S10°18'14,0" W37°02'57,8";
				S10°18'14,9" W37°02'58,8";
				S10°18'16,2" W37°03'00,4";
				S10°19'26,6" W37°04'41,1";
				S10°19'27,0" W37°04'39,9";
				S10°19'27,7" W37°04'44,3";
				S10°19'25,5" W37°04'43,3";
				S10°19'22,9" W37°04'42,5";
				S10°19'22,4" W37°04'41,3";
				S10°19'22,4" W37°04'40,4".

Um total de 89 compostos químicos foram identificados. Os compostos químicos majoritários identificados nos óleos essenciais de populações nativas de *C. blanchetianus* em Sergipe foram: espatulenol (5,65-29,83%), biciclogermacreno (4,60-27,47%), limoneno (0,00-17,54%), α -pineno (1,60-13,37%), (E)-cariofileno (0,25-13,14%), 1.8-cineol (0,00-12,33%), germacreno D (0,00-10,60%) e β -elemeno (0,00-8,95%), os quais definiram a formação de quatro grupos químicos (Figura 2).

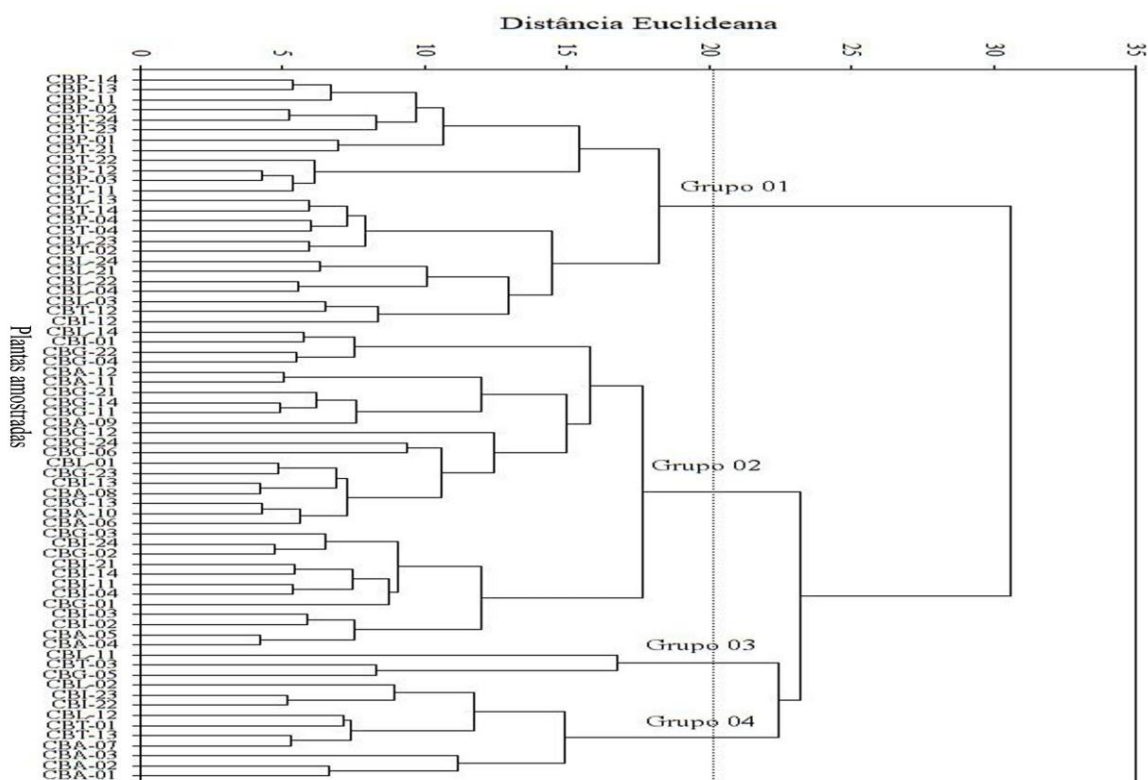


Figura 2. Dendrograma bidimensional representando a similaridade entre 70 plantas de *Croton blanchetianus* de acordo com a composição química do óleo essencial.

Os resultados revelaram ampla variabilidade química entre as populações nativas *C. blanchetianus* de Sergipe. Entender sobre a variabilidade química de *Lantana camara*, uma planta bioativa possuidora de OE foi fundamental para a implantação de uma coleção no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe, permitindo estudos futuros sobre atividade biológica dos OE's das plantas conservadas.

CONCLUSÕES

Observou-se ampla variabilidade química nos óleos essenciais das 70 plantas de *Croton blanchetianus* coletadas em seis populações de Sergipe, provavelmente devido às diferenças genéticas e localidades de coleta entre as plantas estudadas. Os compostos químicos encontrados em maiores concentrações foram: α -pineno, 1,8-cineol, β -elemeno, (E)-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno e espatulenol, os quais definiram a formação de quatro grupos químicos. Os resultados encontrados no presente estudo serviram de base para o estabelecimento de estratégias de conservação: implantação do Banco Ativo de Germoplasma e futuro programa de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: marmeleiro; planta bioativa; estratégias de conservação.

AGRADECIMENTOS

UFS, PPGAGRI, CNPq, CAPES, FAPITEC, GPMACO, LCTMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGÉLICO, E. C.; RODRIGUES, O. G.; COSTA, J. G. D.; LUCENA, M. D. F. A.; QUEIROGA-NETO, V.; MEDEIROS, R. S. D. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and *Croton*'s varieties modulator in the Brazilian's Northeast semiarid. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 7, p. 392-397, 2014.

BARRA, A. Factors Affecting Chemical Variability of Essential Oils: a Review of Recent Developments Natural Product. **Communications**, v. 4, n. 8, 2009.

CAMARA, C. A.; ARAUJO, C. A.; MORAES, M. M.; MELO, J. P.; LUCENA, M. F. New sources of botanical acaricides from species of *Croton* with potential use in the integrated management of *Tetranychus urticae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 20, n. 3, p. 244-259, 2021.

CAVALCANTE, Y. P.; AMARO, B. O.; ARTUR, F. Bioprospecção dos constituintes voláteis de espécies do gênero *Croton* L. do Delta do Parnaíba. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, 2022.

DA SILVA, A. B.; DE OLIVEIRA, C. R. F.; MATOS, C. H. C.; DOS SANTOS, P. É. M.; LIRA, C. R. I. M. Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 450-455, 2020.

DE SÁ FILHO, J. C. F.; NIZIO, D. A. DE C.; DE OLIVEIRA, A. M. S.; ALVES, M. F.; DE OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; NOGUEIRA, P. C. DE L.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Geographic location and seasonality affect the chemical composition of essential oils of *Lippia alba* accessions. **Industrial Crops and Products**, v. 188, 2022.

ESLAHI, H.; FAHIMI, N.; SARDARIAN, A. R. Chemical composition of essential oils. essential oils in food processing. Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications. **Essential Oils in Food Processing**, p. 119-171, 2017.

GUERRA, A. M. N. M.; SANTOS-SILVA, D.; SANTOS, P. S.; SANTOS, L. B. Teste de repelência de óleos essenciais sobre *Callosobruchus maculatus*. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 3, p. 110-117, 2019.

MALVEIRA, E. A.; SOUZA, P. F. N.; NETO, N. A. S.; AGUIAR, T. K. B.; RODRIGUES, N. S.; HENRIQUE, C. W. B.; SILVA, A. F. B.; LIMA, L. B.; ALBUQUERQUE, C. C.; FREITAS, C. D. T. Essential oil from *Croton blanchetianus* leaves: Anticandidal potential and mechanisms of action. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 1147, 2022.

MELO, G. F. d. A.; COSTA, A. C. V. da; GARINO, F., Jr.; MEDEIROS, R. S.; MADRUGA, M. S.; NETO, V. Q. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1189–1194, 2013.

PORTO, J. C. S.; COELHO, F. A.; OLIVEIRA, F. V. B.; LIMA, S. G.; MOBIN, M. Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. **Revista Interdisciplinar**, v. 13, n. 1, p. 1801-1811, 2021.

RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influence of seasonality and circadian cycle yield and chemical composition of essential oils of *Croton* spp. Caatinga. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2018.

RODRIGUES, O. G.; FALCÃO, B. R. M.; BARBOSA, B. C.; PEREIRA, A. V.; AQUINO, V. V. F. In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 55-58, 2019.

RODRIGUES, O. G.; FALCÃO, B. R. M.; BARBOSA, B. C.; PEREIRA, A. V.; AQUINO, V. V. F. In vitro biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 5-8, 2019.

SILVA, A.B.; OLIVEIRA, C.R.F.; MATOS, C.H.C.; SANTOS, P.É.M.; LIRA, C.R.I.M. Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa**, 8(4), 450-455, 2020.

TRINDADE, M. J. de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 19, n. 14, 2014.

VASCONCELOS, E. C.; LONGHI, D. A.; PAGANINI, C. C.; SEVERO, D. D. S.; CANUTO, K. M.; SOUZA, A. S. Q.; FIGUEIREDO, E. A. T.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the effect of *Croton blanchetianus* Baill essential oil on pathogenic and spoilage bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 618, p. 1-12, 2022b.

VASCONCELOS, E. C.; PAGANINI, C. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; ARAGÃO, G. M. F. Antimicrobial action of volatile compounds in essential oil from dry leaves of *Croton blanchetianus* Baill. **Research, Society and Development**, v. 11, 2022a.

Caracterização molecular de germoplasma de *Croton blanchetianus* Baill. coletado em municípios do estado de Sergipe

Rosemeire Santos Costa¹

Itamara Bomfim Gois (Apresentadora)²

Fabiany de Andrade Brito³

Ana Veruska Cruz da Silva⁴

Arie Fitzgerald Blank⁵

¹Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ²Pós-Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ³Pós-Doutorado, projeto “Transformando recursos genéticos do semiárido em produtos sustentáveis para o agronegócio”; ⁴Pesquisadora, Embrapa Tabuleiros Costeiros; ⁵Docente, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

Croton blanchetianus é uma espécie aromática, endêmica do bioma Caatinga que apresenta propriedades biológicas comprovadas com potencial uso para diferentes segmentos da indústria como o farmacêutico, alimentício e agrícola. Essa planta apresenta uso medicinal difundido e está listada nos portfólios do Ministério do Meio Ambiente por ser considerada prioritária para a região Nordeste devido à sua importância econômica potencial.

A espécie é popularmente conhecida no Nordeste do Brasil como marmeleiro e/ou marmeleiro-da-caatinga. Caracteriza-se morfológicamente por ser um arbusto monoico (1,5-8 m), apresentar ramos cilíndricos verde amarelado a acinzentados, lâmina foliar membranácea oval a lanceolada; inflorescência em tirso com flores unissexuais, flor pistilada com pétalas ausentes e estiletes unidos em coluna, flor estaminada com pétalas brancas e estames com antera longa; fruto verde a amarelado lobulado e semente marrom elipsoide com carúncula reniforme (Rossine et al. 2023; Caruzo et al. 2024).

No estado de Sergipe observa-se sua ocorrência em áreas antropizadas sobretudo para criação de animais e plantios agrícolas, o que reduz seu número de indivíduos e, consequentemente, sua variabilidade genética. O estudo genético de espécies que ocorrem em áreas antropizadas é essencial para o delineamento de estratégias de conservação destes recursos e os marcadores moleculares são ferramentas úteis para este fim. A caracterização da diversidade e estrutura genética de populações naturais de espécies que não apresentam o genoma conhecido pode ser realizada por meio de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), o qual é considerado de fácil manuseio e apresenta alto nível de polimorfismo.

Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente seis populações naturais de *Croton blanchetianus* por meio de marcadores ISSR visando estabelecer estratégias de conservação para a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

A prospecção e coleta de genótipos de *Croton blanchetianus* Baill. foram realizadas nos municípios de Aquidabã, Graccho Cardoso, Itabi, Lagarto, Tobias Barreto e Poço Verde, localizados no estado de Sergipe, Brasil. Foram coletadas folhas tenras de 30 genótipos em cada município, com exceção de Poço Verde onde foram coletadas folhas de 20 genótipos, totalizando 170 genótipos. As folhas coletadas foram acondicionadas em solução para conservação foliar (3 g de CTAB, 35 g de NaCl, 100 mL de H₂O) e armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da extração do DNA.

O DNA das amostras foi extraído por meio do método CTAB 2X (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Doyle e Doyle, 1990), e quantificado por meio de espectrofotometria utilizando Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). A qualidade do DNA extraído foi observada em gel de agarose 1% (TBE 0,5X - 0,045M Tris-borato e 0,001M de EDTA), o qual foi corado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta.

A variabilidade genética existente entre e dentro de populações foi realizada com o auxílio de 20 marcadores ISSR (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti 96 Fast thermal cycler (Applied Biosystems, USA) em um volume de 20 µL contendo 2 µL de tampão PCR 10X; 0,4 µL de dNTP 2,5mM; 1,0 µL de cloreto de magnésio 50mM; 0,4 µL da enzima Taq DNA polimerase 1U; 0,8 µL do oligonucleotídeo iniciador 10 µM; 2 µL do DNA (15 ng) e água ultrapura estéril para completar o volume. A reação de PCR foi composta de um período de desnaturação a 95 °C por 5 min., seguido de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C por 40 s, temperatura específica de anelamento do primer por 1 min., e extensão da fita de DNA a 72 °C por 1 min), e um período de extensão final a 72°C por 7 min. O kit utilizado para eletroforese capilar foi o Agilent DNF-935-K0500, e o *Fragment Analyzer* de eletroforese capilar (*Advanced Analytical*, Alemanha) foi utilizado para separação eletroforética.

Tabela 1. Primers ISSR empregados para avaliar a variabilidade genética de seis populações naturais de *Croton blanchetianus* Baill., Sergipe, Brasil.

Primer	Sequência (5'-3')	T (°C)	NBT	NBP	P (%)	PIC
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	46.8	13	13	100	0.29
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	54.8	13	13	100	0.31
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	54.8	12	12	100	0.26
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	58.8	20	20	100	0.35
UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	58.8	14	14	100	0.34
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	50.8	14	14	100	0.16
UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	56.4	15	15	100	0.24
UBC 890	VHV GTG TGT GTG TGT G	56.4	18	18	100	0.37
UBC 007	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	45.0	14	14	100	0.22
UBC 901	GTG TGT GTG TGT YR	41.0	14	14	100	0.26
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	52.0	8	8	100	0.37
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG ATC	57.6	10	10	100	0.36
UBC 878	GGA TGG ATG GAT GGA	55.6	7	7	100	0.27
UBC 860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	52.0	11	11	100	0.21
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	50.0	9	9	100	0.20
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	57.2	11	11	100	0.23
GOOFY	GTG TGT GTG TGT GTY G	47.0	17	17	100	0.26
JOHN	AGA GAG AGA GAG AGY C	43.0	13	13	100	0.27
OMAR	GAG GAG GAG GAG RC	43.0	15	15	100	0.25

TERRY	GTG GTG GTG GTG RC	47.0	16	16	100	0.27
Média	-	-	13.2	13.2	100	0.27

NBT – número de bandas total; NBP – número de bandas polimórficas; P (%) – porcentagem de polimorfismo; PIC - Conteúdo de Informação Polimórfica.

A matriz binária utilizada para estimar os parâmetros genéticos foi construída com base na ausência e presença de bandas identificadas na eletroforese. O valor de PIC (Conteúdo de informação polimórfica) para cada primer foi estimado por meio da expressão $PIC = 2f_i(1 - f_i)$, em que f_i é a frequência do alelo amplificado (presença de banda) e $1 - f_i$ é a frequência do alelo nulo (Roldán-Ruiz et al., 2000).

A caracterização da variabilidade genética foi realizada a partir das estimativas do número de alelos observados (N_a) e efetivos (N_e); Índice de Informação de Shannon (I); Heterozigosidade esperada (H_e), calculada de acordo com as proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Nei 1978); e Porcentagem de polimorfismo (%P).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para estimar a variância genética existente entre e dentro de populações. A diferenciação genética entre os acessos (Φ_{PT}) foi estimada por meio da expressão $\Phi_{PT} = \frac{\text{Variance among populations}}{\text{Variance total}}$. Adicionalmente, foi estimada a distância genética de Nei entre as populações. As análises foram realizadas por meio do software Genalex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012).

A distância genética entre os genótipos foi avaliada por meio da distância genética de Jaccard (1908) e visualizada por meio de um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*). O número de grupos formados foi determinado pelo método de Mojena (1977). A análise foi realizada com o auxílio do pacote “MultivariateAnalysis” (Azevedo, 2021) para R (R Core Team 2022). A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada por meio do software Genalex 6.5 (Peakall e Smouse, 2012).

A análise bayesiana foi realizada usando o software Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Foram testados valores de agrupamentos genéticos (k) variando de 1 a 10 e, para cada k , foram realizadas 10 repetições independentes. Cada repetição consistiu em um período de *burn in* de 10.000 iterações, seguido de 100.000 iterações MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), assumindo o modelo *admixture ancestry* e a frequência de alelos não correlacionadas. O número de grupos genéticos (k) foi determinado pelo método ΔK (Evanno et al., 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de bandas amplificadas para os 20 primers avaliados variou de 7 (UBC 878) a 20 (UBC 842), com média de 13,20 bandas por primer, e todas as bandas detectadas foram polimórficas. Os valores de PIC variaram de 0,16 (UBC 864) a 0,37 (UBC 890 e 809) e são classificados como moderadamente informativos (0,10 a 0,25) a informativos (0,30 a 0,40), conforme propôs Serrote et al. (2020) (Tabela 1).

O número observado e efetivo de alelos (N_a) variaram de 1.674 (Aquidabã) a 1.860 (Itabi) e 1.299 (Aquidabã) a 1.393 (Itabi), respectivamente. As estimativas para o Índice de informação de Shannon (I) variaram de 0,306 (Aquidabã) a 0,379 (Itabi), e a heterozigosidade esperada apresentou média de 0,208, variando de 0,191 (Aquidabã) a 0,242 (Itabi). Para o parâmetro porcentagem de *loci* polimórficos, observou-se que todas as populações apresentaram valores superiores a 80%, indicando que estas apresentam alta variabilidade para os marcadores analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros de variabilidade genética para seis populações naturais de *Croton blanchetianus* Baill. do estado de Sergipe, Brasil.

População	N	Na	Ne	I	He	P (%)
Poço Verde	20	1.739	1.315	0.325	0.202	85.61
Tobias Barreto	30	1.742	1.301	0.317	0.196	86.36
Lagarto	30	1.799	1.345	0.344	0.216	89.02
Itabi	30	1.860	1.393	0.379	0.242	92.42
Graccho Cardoso	30	1.792	1.309	0.321	0.199	88.64
Aquidabã	30	1.674	1.299	0.306	0.191	82.95
Média	28.333	1.768	1.327	0.332	0.208	87.50

N – Número de indivíduos; Na – número observado de alelos; Ne – número efetivo de alelos; I – Índice de informação de Shannon; He – Heterozigiosidade esperada; P (%) – porcentagem de polimorfismo.

Constatou-se que maior variância genética está presente dentro das populações, com apenas 6% desta variância distribuída entre as populações, conforme observado na análise de variância molecular (Tabela 3). A diferenciação genética entre os genótipos (Φ_{PT}) foi de 0,06 (Tabela 3), considerada moderada.

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) entre as seis populações naturais de *Croton blanchetianus* Baill., Sergipe, Brasil.

Source of variation	df	SS	MS	Variance	Variance (%)	Φ_{PT}	p-value
Among Populations	5	482.97	96.59	2.17	6.00**	0.06**	0.0001
Within Populations	164	5800.28	35.37	35.37	94.00**		
Total	169	6283.25		37.54	100.00		

**significante a 1% de probabilidade; df – graus de Liberdade; SS –soma de quadrados; MS – quadrado médio.

Os genótipos de *C. blanchetianus* foram divididos em 23 grupos pelo método de agrupamento de Mojena, utilizando a matriz de similaridade de Jaccard (Figura 1).

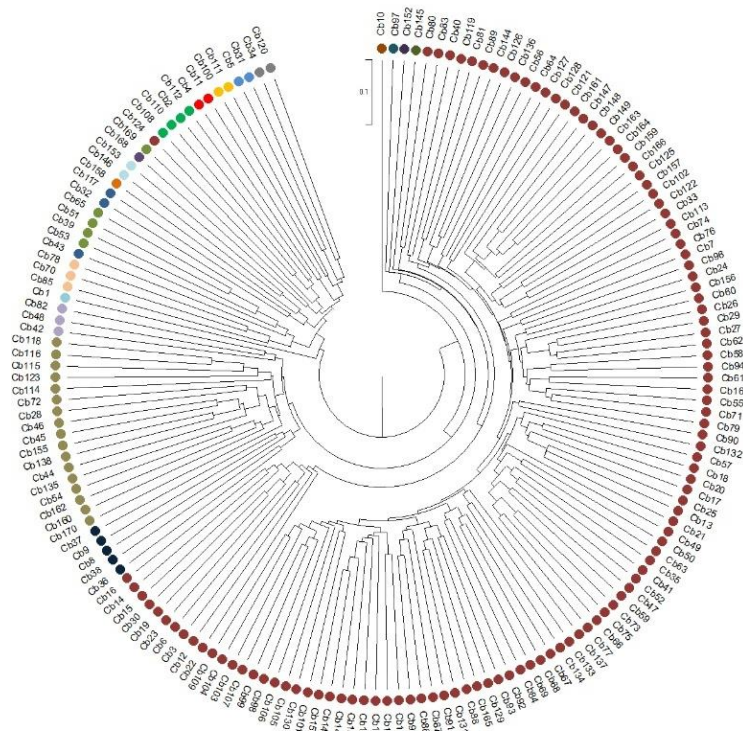


Figura 1. Dendrograma obtido usando o método UPGMA com base na distância genética de Jaccard entre 170 genótipos de *Croton blanchetianus* Baill. PV – Poço Verde (Cb1 - Cb20); TB – Tobias Barreto (Cb21 - Cb50); LG – Lagarto (Cb21 – Cb80); IT – Itabi (Cb81 – Cb110); GC – Graccho Cardoso (Cb111 – Cb140); AQ – Aquidabã (Cb141 – Cb170).

As duas primeiras coordenadas principais explicaram 27,8% da variância genética total, sendo 22,27% explicada pela coordenada 1 e 5,53% pela coordenada 2 (Figura 2).

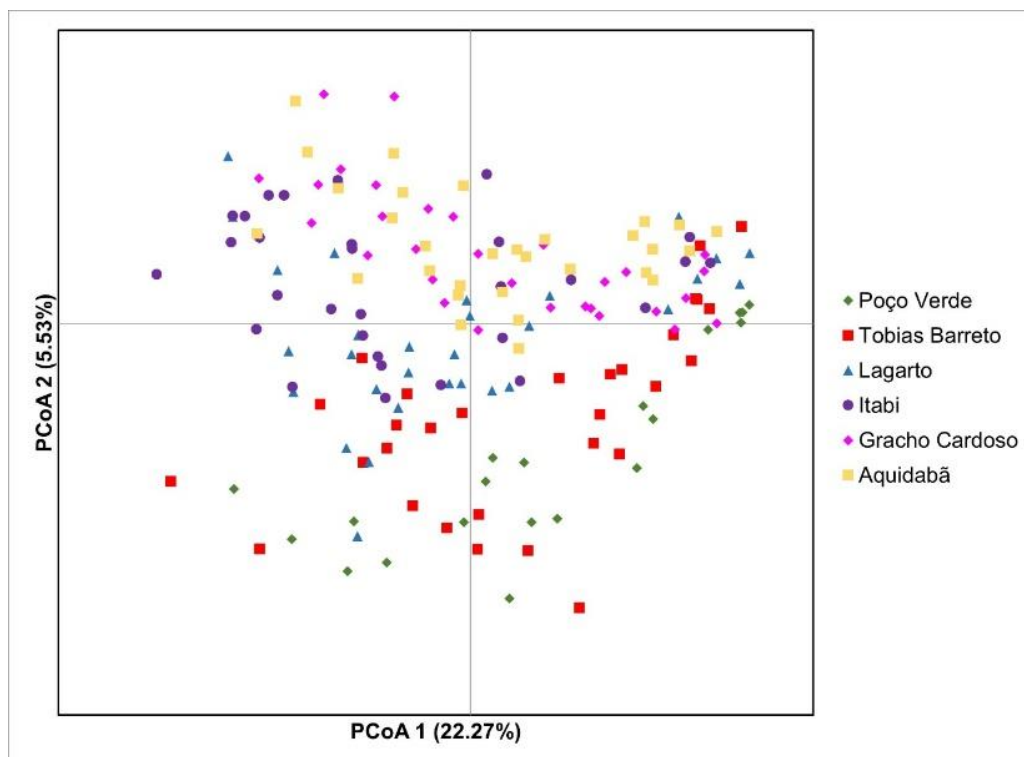


Figura 2. Análise de coordenadas principais (PCoA) para 170 genótipos provenientes de seis populações naturais de *Croton blanchetianus* Baill.

Os genótipos de *C. blanchetianus* foram analisados quanto à estrutura populacional por meio da análise bayesiana implementada no software Structure Harvester (Earl e vonHoldt 2012). Constatou-se que o número de agrupamentos foi $K = 2$ (Figura 3). As duas subpopulações foram ilustradas pelas cores vermelha e verde e, observou-se que 61 indivíduos apresentaram ascendência mista.

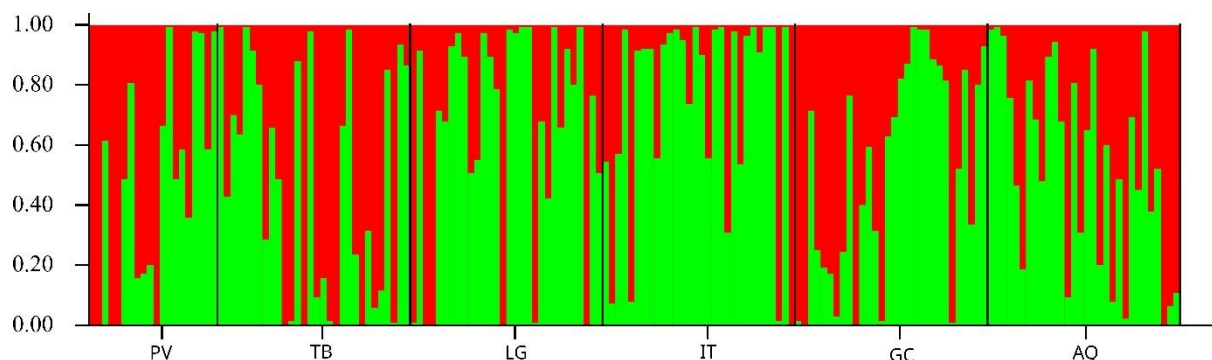


Figura 3. Estrutura populacional estimada para 170 genótipos provenientes de seis populações naturais de *Croton blanchetianus* Baill. ($k=2$). PV – Poço Verde; TB – Tobias Barreto; LG – Lagarto; IT – Itabi; GC – Graccho Cardoso; AQ – Aquidabã.

Corroborando com o observado para as análises de agrupamento e coordenadas principais, não foi possível diferenciar os genótipos de acordo com suas populações de origem na análise bayesiana, sugerindo baixa diferenciação entre os genótipos provenientes das seis populações naturais estudadas.

CONCLUSÕES

O processo de fragmentação das áreas em que a espécie *Croton blanchetianus* ocorre corrobora com a reduzida variabilidade genética observada no presente estudo devido à redução do número de indivíduos nas áreas e, consequentemente, a ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados. Adicionalmente, as populações apresentam baixa diferenciação genética, visto que não é possível discriminar os genótipos de acordo com o seu local de origem.

Palavras-chave: espécie aromática; Euporbiaceae; planta medicinal; marcadores moleculares.

AGRADECIMENTOS

UFS, PPGAGRI, CNPq, CAPES, FAPITEC, Embrapa, GPMACO, LCTMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO A (2021). **Multivariate Analysis: Pacote Para Análise Multivariada**. R package version 0.4.4.0

CARUZO MBR, SECCO RS, MEDEIROS D, RIINA R, TORRES DSC, SANTOS RFD, PEREIRA APN, ROSSINE Y, LIMA LR, MUNIZ-FILHO E, VALDUGA, E. *Croton* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB25478>>. Acesso em: 02 jan. 2024.

EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Mol Ecol** 14: 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

PEAKALL R, SMOUSE PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** 28: 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics** 155: 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>

R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

ROLDÁN-RUIZ I, DENDAUW J, VAN BOCKSTAELE E, DEPICKER A, LOOSE M (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding** 6: 125-134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>

ROSSINE Y, MELO AL, ATHIE-SOUZA SM, SALES MF (2023) Understanding the “Marmeleiros”: a taxonomic treatment of *Croton* sect. *Lasiogyne* (Euphorbiaceae) in Brazil. **Phytotaxa** 584: 219-250. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.584.4.1>

SERROTE CML, REINIGER LRS, SILVA KB, RABAIOLLI SMS, STEFANEL CM (2020) Determining the polymorphism information content of a molecular marker. **Gene** 726: 144175. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>

Caracterização morfoagronômica de germoplasma de *Croton blanchetianus* do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da UFS

Rosemeire Santos Costa¹

Ryan Santos Ribeiro (Apresentador)²

Fabiany de Andrade Brito³

Itamara Bomfim Gois⁴

Alberto Ferreira do Nascimento Júnior⁵

Arie Fitzgerald Blank⁶

¹Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe;

²Graduação, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe; ³Pós-Doutorado, projeto “Transformando recursos genéticos do semiárido em produtos sustentáveis para o agronegócio”; ⁴Pós-Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ⁵Agrônomo, Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe; ⁶Docente, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

Croton blanchetianus (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como marmeleiro, é uma espécie bioativa que possui óleos essenciais (OE's) de composição química diversa, formado principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos com atividade antibacteriana, antifúngica, acaricida e inseticida já elucidada (SILVA *et al.*, 2020; CAMARA *et al.*, 2021; PORTO *et al.*, 2021; VASCONCELOS *et al.*, 2022a). Alguns compostos químicos encontrados no OE desta espécie foram biciclogermacreno (10,42 - 33,0%), 1,8-cineol (19,95 - 32,94%), E-cariofileno (11,85 - 27,52%), espatulenol (8,07 - 24,10%) e α -pineno (9,14 - 19,19%) (ANGÉLICO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019; CAMARA *et al.*, 2021; PORTO *et al.*, 2021; VASCONCELOS *et al.*, 2022a; VASCONCELOS *et al.*, 2022b; CAVALCANTE *et al.*, 2022). Comum em áreas da caatinga, é uma espécie de ocorrência restrita ao semi-árido do Nordeste (AL, BA, CE, PE, PI, PB, RN, SE) e no Sudeste (MG) (SILVA *et al.*, 2010).

A perda de diversidade das espécies de plantas bioativas em seus habitats naturais devido ao desmatamento e mudanças climáticas é preocupante. Por isso, métodos de conservação *ex situ* são essenciais para proteger a biodiversidade e garantir o uso sustentável dos recursos naturais (MAHANAYAK, 2024; ZHANG *et al.*, 2024). Nesse sentido, cita-se como opção os Bancos Ativos de Germoplasma (BAG's), onde o material genético é conservado e usado de forma sustentável. Identificar acessos com interesse agrônômico proporciona a seleção de características com o objetivo de subsidiar trabalhos de conservação e produção de uma cultura. Além da conservação de amostras representativas da variabilidade genética, a correta caracterização dos BAG's permite identificar a qualidade e potencialidade dos acessos para diferentes objetivos em programas de melhoramento genético de plantas (RAMALHO *et al.* 2012; RODRIGUES *et al.*, 2019; PARACAMPO *et al.*, 2021).

Devido a sua relevância para saúde humana e agricultura, é importante o desenvolvimento de estratégias *ex situ* para conservação *C. blanchetianus* e estudos aprofundados sobre seus OE's. A Universidade Federal de Sergipe realiza estudos com esta espécie e mantém uma coleção com

acessos oriundos de municípios de Sergipe no Banco Ativo de Plantas Medicinais e Aromáticas, localizado no Campus Rural da UFS. Por isso, o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização morfoagronômica da coleção de *Croton blanchetianus* do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e seis plantas de *C. blanchetianus* foram coletadas em seis municípios de Sergipe (Aquidabã, Graccho Cardoso, Itabi, Lagarto, Poço Verde e Tobias Barreto) para implantação de uma coleção no BAG de Plantas Medicinais e Aromáticas localizado na Fazenda Experimental Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão. Os acessos foram estabelecidos em campo utilizando delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com três repetições.

Para avaliação morfológica foram medidas: altura das plantas, diâmetro da copa, comprimento (c) e largura (l) de folha, relação c/l de folha, área foliar, mensuração da coloração das folhas e flores (foram selecionadas e digitalizadas três folhas, por um scanner HP MFP 1005. Para cada folha (face adaxial e abaxial), foram obtidos os valores de coloração RGB de toda a área foliar, os quais foram convertidos em código hexadecimal para a padronização internacional de cores, por meio do programa Image J.

Já na avaliação agronômica, massa seca de folhas (MS), teor (TOE) e rendimento do óleo essencial (ROE) foram calculados. As folhas coletadas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 ± 1 °C durante cinco dias. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas secas por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 3 L, e uma manta térmica como fonte geradora de calor, por 120 minutos após o início da ebulição da água. A extração foi realizada em triplicata, com a utilização de amostras de 50g de folhas secas e 2,0 L de água.

$$\text{Teor} = \left(\frac{v}{m} \right) \times 100$$

v = volume de óleo essencial extraído da amostra;
m = massa seca de folhas da amostra.

$$\text{Rendimento (mL/planta)} = \left(\frac{\%c}{mt} \right)$$

%c= % de conteúdo do óleo essencial extraído.
mt = massa seca total da planta.

O OE extraído foi coletado e armazenado em frascos âmbar a -20°C até análise da composição química em Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrometro de Massas (CG/MS). Após a identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais, foi realizada uma análise de agrupamento usando o software Statistica. Em seguida, uma matriz de dissimilaridade foi construída com base nas distâncias euclidianas entre as plantas, simplificada com a formação de um dendrograma usando o método de agrupamento de Ward.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização morfoagronômica diferenciou os 26 acessos *C. blanchetianus* do BAG. Entender sobre as cores em plantas é importante para sua adaptação fisiológica ao ambiente, por isso, analisou-se a intensidade das cores vermelho, verde e azul (RGB) nos diferentes acessos (Tabela 1).

Tabela 1. Soma das cores vermelho, verde e azul e seus códigos hexadecimais de acessos de *Croton blanchetianus* do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

Acessos	Vermelho (adaxial)	Verde (adaxial)	Azul (adaxial)	Cor	Vermelho (abaxial)	Verde (abaxial)	Azul (abaxial)	Cor
CBL 101	60,68	88,97	38,87		120,78	134,96	88,76	
CBL 102	46,67	67,91	44,21		112,18	123,06	89,70	
CBL 103	51,60	79,93	36,98		117,28	130,40	87,25	
CBL 201	48,28	74,44	41,88		116,92	128,71	94,18	
CBL 202	49,97	83,78	34,27		110,47	130,63	75,88	
CBL 203	46,72	71,18	43,17		115,31	128,09	87,48	
CBL 204	55,46	80,85	40,89		118,50	130,47	88,37	
CBL 205	50,99	75,05	43,02		121,47	130,61	95,40	
CBL 206	49,82	74,05	42,78		113,36	123,97	85,25	
CBL 207	52,11	78,79	39,56		121,21	130,18	91,21	
CBL 301	52,08	78,84	39,99		118,08	129,17	90,79	
CBL 302	61,05	89,18	37,24		128,12	137,73	97,61	
CBL 303	55,14	81,66	41,02		129,76	139,68	99,85	
CBL 304	53,00	77,19	43,98		124,66	132,74	96,72	
CBL 401	46,83	69,33	43,90		121,13	129,84	95,31	
CBL 402	51,39	78,86	40,40		118,29	131,20	90,15	
CBL 403	45,68	70,67	38,17		116,73	123,80	80,41	
CBL 404	49,58	79,55	37,23		115,86	130,81	87,06	
CBL 501	44,71	67,66	42,09		109,77	123,18	87,70	
CBL 502	50,27	76,92	40,63		116,24	129,72	88,57	
CBL 503	51,46	77,78	43,70		122,51	130,93	88,63	
CBL 505	47,98	72,03	41,88		116,03	125,37	84,38	
CBL 602	73,33	107,04	34,59		138,34	147,05	100,62	
CBL 603	48,48	73,94	42,25		120,27	130,97	91,70	
CBL 604	52,50	75,64	43,96		120,44	129,12	90,06	
CBL 605	52,24	78,08	42,35		119,32	129,44	91,90	

De acordo com a análise agronômica, as plantas com maior massa seca (g/planta) de folhas foram CBL 503 e CBL 603. Maiores teores de óleo essencial foram observados em CBL 401, CBL 403 e CBL 503. CBL503 foi o acesso com maior rendimento do óleo essencial. O acesso CBL 503 foi o que obteve maior massa seca de folhas (MS), teor (TOE) e rendimento do óleo essencial (ROE) (Tabela 2).

Tabela 2. Massa seca de folhas (MS), teor (TOE) e rendimento do óleo essencial (ROE) de acessos de *Croton blanchetianus* Baill. do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

Acessos	MS (g/planta)	TOE (%)	ROE (mL/planta)
CBL 101	150,60 c	0,90 c	1,30 c
CBL 102	140,75 c	0,90 c	1,29 c
CBL 103	114,10 c	1,20 b	1,37 c
CBL 201	113,30 c	0,80 d	0,91 c
CBL 202	168,00 c	1,20 b	2,02 c
CBL 203	178,53 c	0,97 c	1,76 c
CBL 204	83,17 c	0,80 d	0,67 c
CBL 205	213,73 b	0,60 e	1,28 c
CBL 206	158,17 c	0,80 d	1,27 c
CBL 207	212,28 b	0,80 d	1,70 c
CBL 301	198,75 b	0,60 e	1,19 c
CBL 302	174,23 c	0,93 c	1,56 c
CBL 303	216,50 b	1,00 c	2,17 c
CBL 304	190,17 b	0,73 d	1,39 c
CBL 401	145,15 c	1,50 a	2,21 c
CBL 402	225,55 b	0,70 d	1,62 c
CBL 403	171,20 c	1,60 a	2,74 b
CBL 404	182,40 c	1,00 c	1,82 c
CBL 501	146,03 c	1,00 c	1,46 c
CBL 502	136,07 c	1,13 b	1,50 c
CBL 503	333,00 a	1,40 a	4,66 a
CBL 505	123,07 c	1,27 b	1,55 c
CBL 602	89,03 c	0,70 d	0,63 c
CBL 603	279,67 a	1,13 b	3,19 b
CBL 604	239,30 b	0,73 d	1,80 c
CBL 605	138,60 c	0,73 d	1,03 c
CV	28,00	8,33	28,36

As características morfoagronômicas analisadas diferenciou os 26 acessos de *C. blanchetianus* do BAG em 3 grupos (Figura 1).

Entende-se que, as variáveis morfoagronômicas analisadas foram eficientes para diferenciar os acessos, sugerindo que há algum tipo de variabilidade entre as plantas. Variações no fenótipo podem ocorrer devido ao ambiente ou diferenciação genética entre os indivíduos. Porém, o delineamento utilizado em campo (DBC) minimiza os efeitos ambientais e aponta diferenças estatísticas desses efeitos, caso ocorram. Por isso, o fator genético ocasionou plasticidade fenotípica do BAG de *C. blanchetianus* (SILVA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2020)

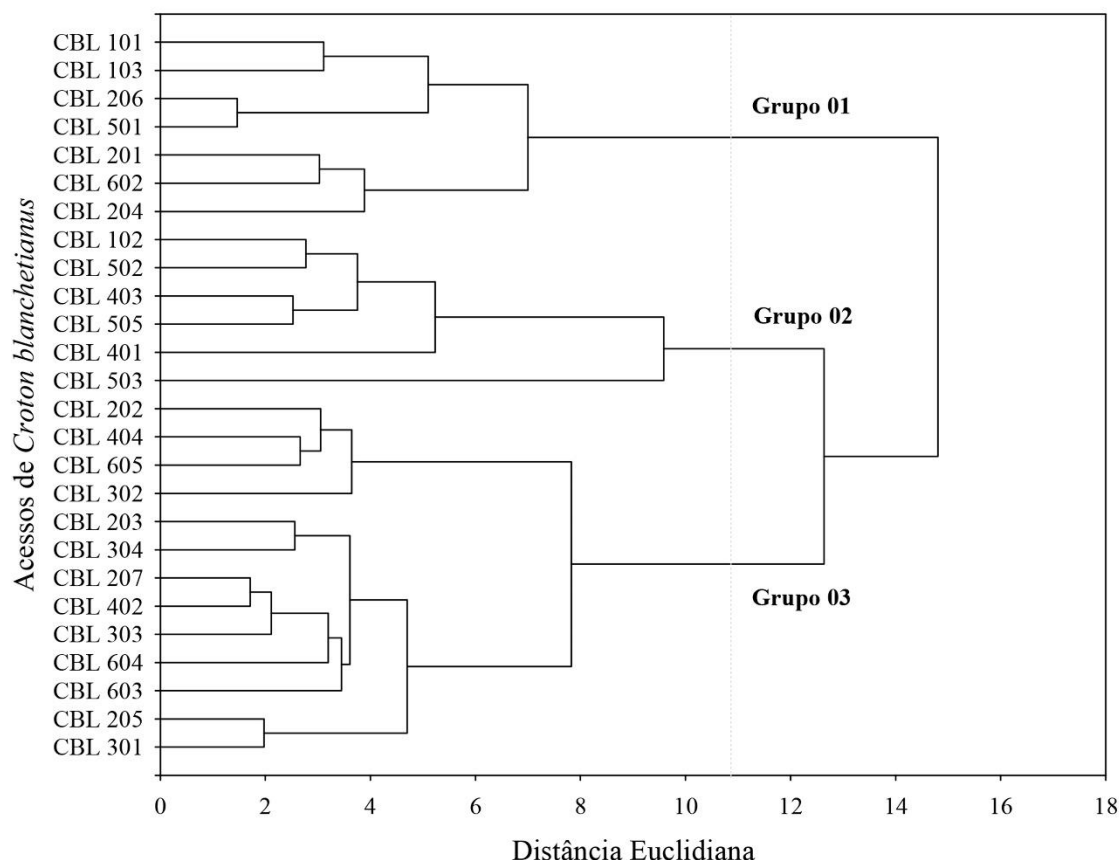


Figura 1. Dendrograma bidimensional representando a similaridade entre os 26 acessos de *Croton blanchetianus* quanto às variáveis morfoagronômicas.

CONCLUSÕES

Há variabilidade morfoagronômica entre as 26 plantas da coleção de *C. blanchetianus* da UFS. De acordo com as variáveis morfoagronômicas avaliadas, as 26 plantas foram divididas em 3 grupos, o que possibilitará a seleção dos acessos para o futuro programa de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: marmeleiro; banco ativo de germoplasma; conservação.

AGRADECIMENTOS

UFS, PPGAGRI, CNPq, CAPES, FAPITEC, GPMACO, LCTMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGÉLICO, E. C.; RODRIGUES, O. G.; COSTA, J. G. D.; LUCENA, M. D. F. A.; QUEIROGA-NETO, V.; MEDEIROS, R. S. D. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils and *Croton's* varieties modulator in the Brazilian's Northeast semiarid. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 7, p. 392-397, 2014.

CAMARA, C. A.; ARAUJO, C. A.; MORAES, M. M.; MELO, J. P.; LUCENA, M. F. New sources of botanical acaricides from species of *Croton* with potential use in the integrated

management of *Tetranychus urticae*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 20, n. 3, p. 244-259, 2021.

CAVALCANTE, Y. P.; AMARO, B. O.; ARTUR, F. Bioprospecção dos constituintes voláteis de espécies do gênero *Croton* L. do Delta do Parnaíba. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, 2022.

MAHANAYA, B. Conservação *ex situ* e *in situ* da vida selvagem. **Revista Mundial de Biologia Farmácia e Ciências da Saúde**, v. 18, n. 03, p. 277–282, 2024.

PARACAMPO, N. E. N. P.; DE SOUZA, R. S.; ALMEIDA, J. C.; LAMEIRA, O. A. Chemical characterization of an Ipecac active germplasm bank –a Brazilian endangered medicinal species. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, 2021.

PORTO, J. C. S.; COELHO, F. A.; OLIVEIRA, F. V. B.; LIMA, S. G.; MOBIN, M. Composição química e atividade antifúngica de plantas típicas da região nordeste do Brasil. **Revista Interdisciplinar**, v. 13, n. 1, p. 1801-1811, 2021.

RAMALHO, M. A. P.; PINTO, C. A. B. P.; SANTOS, J. B. **Genética na agropecuária**. 5.ed. Lavras: Editora da UFLA, 2012. 566p.

RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influence of seasonality and circadian cycle yield and chemical composition of essential oils of *Croton* spp. Caatinga. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2018.

RODRIGUES, M. G. F.; SANTOS, T. P. DOS; FERREIRA, A. F. A.; MONTEIRO, L. N. H.; NAKANISHI, E. S.; BOLIANI, A. C. Morphological characterization of active germoplasm bank fig tree accessions. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 5, 2019.

RODRIGUES, O. G.; FALCÃO, B. R. M.; BARBOSA, B. C.; PEREIRA, A. V.; AQUINO, V. V. F. *In vitro* biological activity of the *Croton blanchetianus* (Baill) essential oil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 5-8, 2019.

SILVA, A. B.; Oliveira, C. R. F.; Matos, C. H. C.; Santos, P. É. M.; LIRA, C. R. I. M. Bioatividade do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Chrysomelidae). **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 450-455, 2020.

SILVA, J. S.; DE SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Synopsis of the species of *Croton* L. (Euphorbiaceae) in Pernambuco state, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, 2010.v. 18, 2024.

VASCONCELOS, E. C.; LONGHI, D. A.; PAGANINI, C. C.; SEVERO, D. D. S.; CANUTO, K. M.; SOUZA, A. S. Q.; FIGUEIREDO, E. A. T.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the effect of *Croton blanchetianus* Baill essential oil on pathogenic and spoilage bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 618, p. 1-12, 2022b.

VASCONCELOS, E. C.; PAGANINI, C. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; ARAGÃO, G. M. F. Antimicrobial action of volatile compounds in essential oil from dry leaves of *Croton blanchetianus* Baill. **Research, Society and Development**, v. 11, 2022a.

ZHANG, J.; QU, X; HUANG, Y.; TAN, M.; XU, K Assessing the potential of species loss caused by deforestation in a mature subtropical broadleaf forest in central China. **Trees, Forests and People**, v. 18, 2024.

Caracterização química dos óleos essenciais de acessos de *Croton grewoides*

Laura Catharine Dória Prata Lima (Apresentadora)¹

Itamara Bomfim Gois²

Crislaine Alves dos Santos³

Rafael Donizete Dutra Sandes⁴

Maria Terezinha Santos Leite Neta⁵

Arie Fitzgerald Blank⁶

¹Mestrado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ²Pós-Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe;

³Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ⁴Pós-Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe;

⁵Docente, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe;

⁶Docente, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

Croton grewoides Baill. é uma planta nativa da região semiárida do Brasil, sendo encontrada principalmente nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (SILVA et al., 2010). A espécie é popularmente conhecida como “alecrim-de-caboclo” ou “canelinha”, devido ao aroma exalado por suas folhas e flores (CARUZO, 2020). É amplamente utilizada na medicina tradicional, na forma de chá, como alternativa para alívio de sintomas de gripe (Silva et al., 2015). Além disso, a planta produz compostos químicos derivados do metabolismo secundário, que possuem atividades biológicas comprovadas (BARRERA, 2016).

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários, constituídos principalmente por mono e sesquiterpenos além de fenilpropanóides, extraídos de plantas aromáticas (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012). A presença dessas substâncias bioativas confere alto valor agregado aos óleos essenciais, com aplicações relevantes na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica (VIZZOTTO et al., 2010).

O teor e a composição química dos óleos essenciais podem ser influenciados por fatores como genótipo, sazonalidade, ciclo circadiano, estágio de desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrição, poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Por isso, é fundamental realizar análises químicas para compreender essas variações (GOBBO-NETO e LOPES, 2006).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais de acessos de *C. grewoides* do Banco Ativo de Germoplasma de plantas medicinais e aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

MATERIAL E MÉTODOS

Os óleos essenciais de 17 acessos de *C. grewoides* foram extraídos de folhas coletadas em duas épocas, no ano de 2022 (chuvosa – maio e seca- dezembro). As folhas foram armazenadas em

sacos de papel e secas em estufa com circulação de ar forçada a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco dias. A extração dos óleos foi realizada por hidrodestilação utilizando um aparelho Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo, durante 120 minutos (EHLERT et al., 2006). Para cada extração, foram utilizadas 40 g de folhas secas e 1,5 L de água destilada.

A separação e identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais de *C. grewioides* foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (CG) (Agilent Model 7890B) acoplado a um espectrômetro de massas (EM) (Agilent Model 5977 A MSD), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m de comprimento $\times$ 0,25 mm de diâmetro interno $\times$ 0,25 μm de espessura, Agilent). O gás de arraste usado foi o hélio com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A energia de ionização foi de 70 eV e a faixa de detecção de massa de 40 a 500 Da. Um amostrador automático (Agilent G4513A) foi usado para injetar 1 μL de cada amostra (10 mg do óleo essencial/mL de solução) em modo “splitless”. A temperatura inicial do forno foi de 35°C (mantida por dois minutos), seguida de um aumento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até 100°C (mantida por um minuto). Após, a temperatura foi elevada a $3^\circ\text{C}/\text{min}$ até 250°C , e mantida por três minutos.

Os dados obtidos foram processados com o auxílio do software Mass Hunter (Versão B 7.0, Agilent Technologies). Os compostos foram identificados por meio da comparação de seus espectros de massas com os presentes no banco de dados NIST (*National Institute of Standards & Technology*). Adicionalmente, foi calculado o índice aritmético (AI) de cada composto, o qual foi determinado de acordo com o tempo de retenção de uma sequência de n-alcenos (C8 - C24), seguido da comparação dos valores obtidos com aqueles presentes na literatura (ADAMS, 2017) e outras bases de dados online (PubChem e Chempidder).

A distância Euclidiana entre os acessos foi calculada por meio do pacote biotools (SILVA et al., 2017) e o dendrograma foi obtido por meio do método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*). A análise de componentes principais (PCA) e os dendrogramas foram obtidos por meio do software R. Os gráficos foram gerados com o auxílio do programa Microsoft Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos majoritários identificados nos óleos essenciais dos acessos de *C. grewioides*, foram os fenilpropanoides: eugenol, metil eugenol e metil chavicol. A presença desses compostos é compatível com perfis químicos relatados na literatura para esta espécie.

A figura 1a mostra a variação na porcentagem de eugenol comparando as estações chuvosa (linha azul) e seca (linha laranja). Nos acessos CGR-106, CGR-107, CGR-124, CGR-125, CGR-209, CGR-220, CGR-221, CGR-222 e CGR-318, a concentração de eugenol é maior na estação seca do que na chuvosa, com médias variando de 22,09 a 84,48%. Já para os acessos CGR-306 e CGR-313, a concentração de eugenol é maior na estação chuvosa (40,02 e 45,27%, respectivamente).

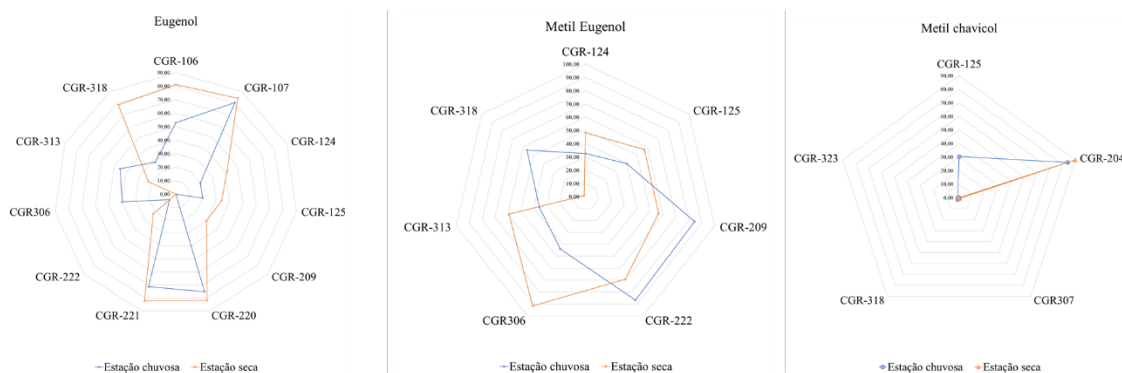


Figura 1. Variação na porcentagem dos compostos majoritários nos óleos essenciais de *Croton grewoides* entre as estações chuvosas e seca. a) eugenol, b) metil eugenol e c) metil chavicol.

A variação na porcentagem de metil eugenol pode ser observada na figura 1b. Para os acessos CGR-209, CGR-222 e CGR-318, a porcentagem de metil eugenol foi maior na estação chuvosa, com médias variando de 56,40 e 86,79%. Já na estação seca, os acessos CGR-124, CGR-125, CGR-306 e CGR-313 apresentaram a maior porcentagem de metil eugenol em relação a estação chuvosa, com médias variando de 48,27% a 91,64%.

O metil chavicol está presente em apenas dois acessos: CGR-125 com 30,39% apenas na estação chuvosa, e CGR-204, com 84,09% na estação chuvosa e 89,07% na estação seca (Figura 1c). Os demais acessos apresentaram variação na composição química entre os majoritários.

Os dendrogramas, baseados na distância Euclidiana, permitiram a visualização de três grupos na estação chuvosa (Figura 2) e na estação seca (Figura 3), os quais foram formados de acordo com os compostos majoritários.

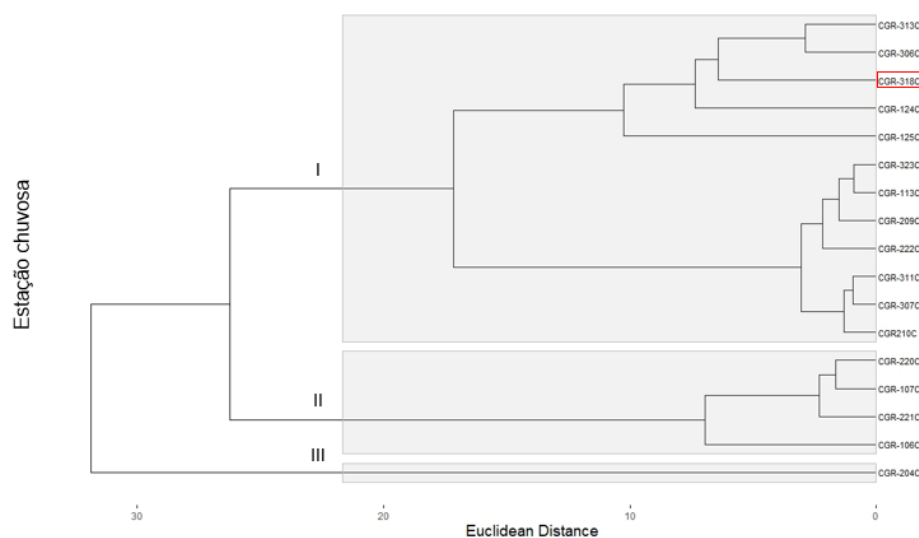


Figura 2. Dendrograma representando a distância euclidiana dos acessos de *Croton grewoides* com base na composição química dos óleos essenciais na estação chuvosa.

O grupo I representa os acessos com eugenol como composto majoritário, o grupo II inclui os acessos com metil eugenol, e o grupo III compreende os acessos que apresentam o metil

chavicol. Destaca-se o acesso CGR-318, que na estação chuvosa pertence ao grupo 1, representado pelo eugenol, enquanto na estação seca pertence ao grupo 2, representado pelo metil eugenol.

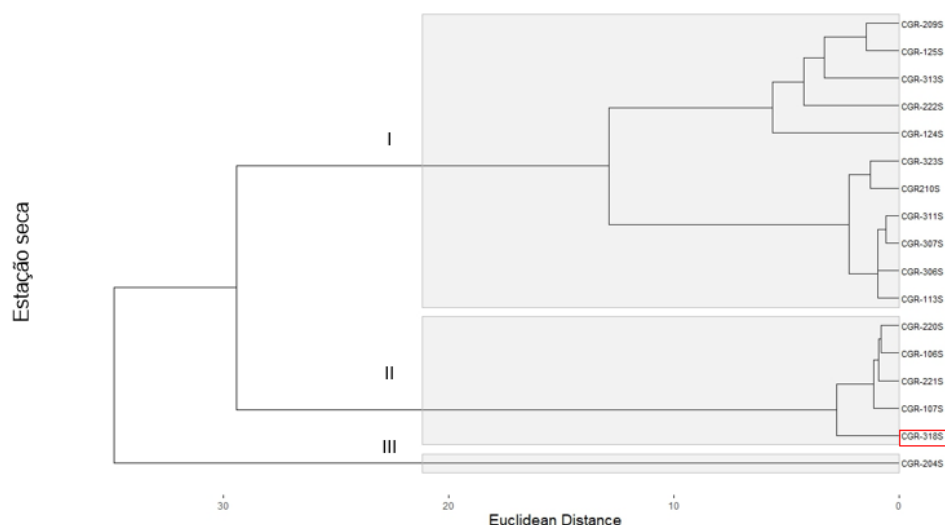


Figura 3. Dendrograma representando a distância euclidiana dos acessos de *Croton grewoides* com base na composição química dos óleos essenciais na estação seca.

Corroborando com os resultados apresentados, a análise de componentes principais (Figura 4) mostra a distribuição dos acessos de *C. grewoides* com base em suas características químicas nas estações secas e chuvosa. O primeiro componente (PC1) explicou 77,27% da variação total, enquanto o segundo componente (PC2) explicou 21,62%, totalizando 98,89% da variabilidade observada.

Observa-se a formação de três grupos distintos: o primeiro grupo (verde), composto por acessos que possuíam o eugenol em sua composição, o segundo grupo (vermelho), formado por acessos que apresentaram metil eugenol, e o terceiro grupo, isolado (azul), que incluiu apenas o acesso CGR-204, caracterizado pela presença de metil chavicol.

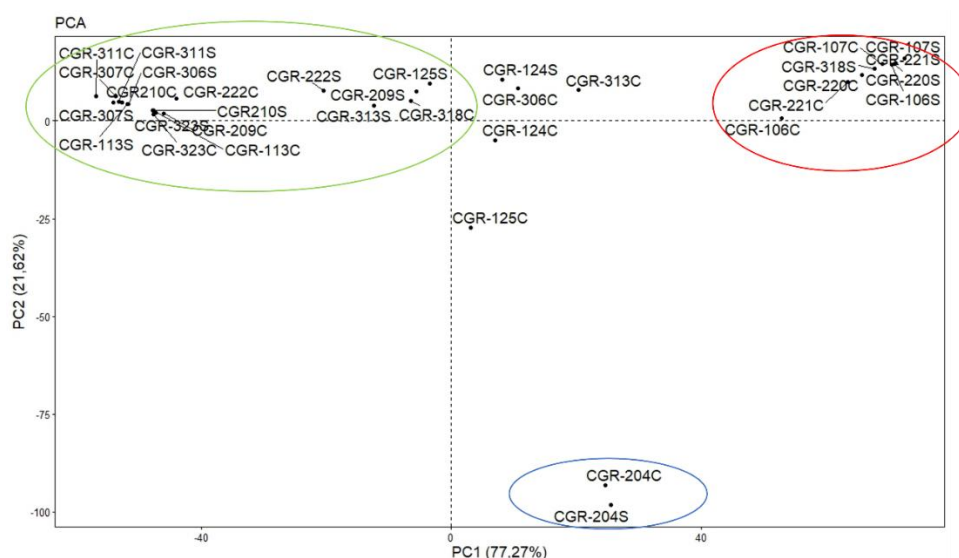


Figura 4. Análise de componentes principais (PCA) da composição química de óleos essenciais de *Croton grewioides* nas estações chuvosa e seca.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais dos acessos de *Croton grewioides* apresentaram os fenilpropanóides eugenol, metil eugenol e metil chavicol como compostos majoritários. A sazonalidade influenciou a composição química de forma quantitativa, uma vez que os compostos principais se mantiveram presentes em ambas as estações, porém com variações significativas em suas concentrações. Considerando que este estudo abrangeu apenas um ano de coleta, estudos complementares em diferentes períodos e condições climáticas são necessários para uma melhor compreensão da influência da sazonalidade na composição química ao longo do tempo.

Palavras-chave: Sazonalidade; recursos genéticos; metabólitos secundários; plantas medicinais e aromáticas.

AGRADECIMENTOS

UFS, PPGAGRI, CNPq, CAPES, FAPITEC, GPMACO, LCTMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Pub Corp. 4.1. Ed., 2017.

BARRERA, C. A. C.; GÓMEZ, D. C.; CASTIBLANCO, F. A. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, p. 234-247, 2016.

CARUZO, M.B.R.; SECCO, R.S.; MEDEIROS, D.; RIINA, R.; TORRES, D.S.C.; SANTOS, R.F.D.; PEREIRA, A.P.N.; ROSSINE, Y.; LIMA, L.R.; MUNIZ FILHO, E.; VALDUGA, E. 2020. *Croton* in **Flora do Brasil** 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17516>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

EHLERT, P.A.D., BLANK, A.F., ARRIGONI-BLANK, M.F., PAULA, J.W.A., CAMPOS, D.A., ALVIANO, C.S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 79-80, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 299-344, 2003.

SILVA, J. S.; SALES M. F., GOMES A. P. S.; CARNEIRO-TORRES D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphotbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 441-453, 2010.

SILVA, C. G.; MARINHO, M.G.V.; LUCENA, M.F.A.; COSTA, J.G.M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 133-142, 2015.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

Toxicidade do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre *Spodoptera frugiperda*

Sandy Maria Santos Passos (Apresentadora)¹

Ana Paula Santana Lima²

Virginia Elena Masiulionis³

Ana Paula Albano Araújo⁴

Arie Fitzgerald Blank⁵

Leandro Bacci⁶

¹Mestrado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe;

²Pesquisador. University of Nebraska–Lincoln. Estados Unidos; ³Pesquisador. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ⁴Docente. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal de Sergipe. ^{5,6}Docente. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é destaque entre as espécies agrícolas explorada mundialmente (SANTOS *et al.*, 2024). O Brasil, no cenário mundial, destaca-se como o terceiro maior produtor de milho com previsão de produção de 111 milhões de toneladas na safra 2023/2024 (CONAB, 2024). Sua utilização é voltada, principalmente, em rações para animais através de grão concentrado ou silagem (GARCIA *et al.*, 2006). O milho também é importante para alimentação humana, já que é matéria prima de diferentes produtos e segmentos (FAVARATO, 2016; EICHOLZ, 2022).

Os insetos pragas se destacam entre os fatores que contribuem para a redução da produção de milho. Dentre esses insetos, a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho, é descrita como praga-chave da cultura. Nativa da América, a *S. frugiperda* está distribuída em diversos países devido sua alta capacidade de dispersão, polifagia, alta taxa reprodutiva e capacidade de várias gerações por ano (BALOCH *et al.*, 2020; MONTEZANO *et al.*, 2018; BARROS; TORRES; BUENO, 2010). Os danos provocados por esses insetos envolvem a redução da área fotossintética das folhas ao se alimentarem, assim como a destruição do cartucho e deterioração dos grãos (HELLWING *et al.*, 2017). As perdas na produção registradas para o continente americano ocasionadas pela *S. frugiperda* pode chegar a 70% (BERG *et al.*, 2021).

O controle da *S. frugiperda* é usualmente realizado por meio de inseticidas sintéticos, porém muitas vezes não proporcionam a eficiência esperada, além disso possuem alto custo e necessidade de várias aplicações (BOIÇA JÚNIOR *et al.*, 2015). O uso indiscriminado, a calendarização e a não seletividade dos inseticidas têm provocado a seleção de insetos resistentes e a eliminação de inimigos naturais. (POLETTI; ALVES, 2013; CZEPAK *et al.*, 2014). Portanto, fica evidente que para o controle desses insetos, há a necessidade de constante rotação dos produtos e dos mecanismos de ação dos inseticidas (CASTLE *et al.*, 2010; CARBALLO; RUBIO, 2012).

A *S. frugiperda* já apresentou casos de resistência a inseticidas como organofosforados (CARVALHO *et al.*, 2013), carbamatos, neonicotinóides (SIEGFRIED; YU, 2009), piretróides (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001), diamidas (Cloratraniliprole) (BOLZAN *et al.*, 2019) e

reguladores de crescimento (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Estudos apontam que inseticidas botânicos à base de óleos essenciais de plantas (OE) podem ser utilizados como alternativa aos inseticidas sintéticos, já que demonstraram eficiência no controle de insetos-pragas (MELO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017).

Os OEs de espécies do gênero *Lippia* tem apresentado intensa atividade biológica contra insetos-pragas, abrangendo lagartas desfolhadoras (CHAUHAN; SRIVASTAVA, 2017; MELO *et al.*, 2018; NEGRINI *et al.*, 2019; NICULAU *et al.*, 2013). O OE da espécie *Lippia sidoides* Cham. (Verbanaceae), encontrada na região da Caatinga do Nordeste brasileiro (CAVALCANTI *et al.*, 2010), apresenta diversas propriedades biológicas como, por exemplo, atividade inseticida contra diversas pragas (BACCI *et al.*, 2015; BATISTA *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2016; VERAS *et al.*, 2012). A atividade biológica característica desse óleo pode ser atribuída a presença do composto majoritário timol, já que, quando isolado, expressa atividade similar ao OE (VERAS *et al.*, 2012).

Assim, neste estudo, foi avaliada a toxicidade do OE de *L. sidoides* e seu composto majoritário timol sobre a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação dos insetos

Os insetos utilizados nos bioensaios foram obtidos de criações (>10 gerações) mantidas em salas climatizadas ($25 \pm 0,5$ °C, UR $70 \pm 10\%$, fotoperíodo de 12h) de laboratórios da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão-SE ($10^{\circ}54'$ S, $37^{\circ}04'$ W, 7 m de altitude), Brasil.

Adultos de *S. frugiperda* foram mantidos em potes plásticos de 1 L totalmente revestidos com papel sulfite (substrato de ovoposição). O fundo do pote foi constituído por uma placa de Petri (14 x 1,5 cm) e a parte superior foi vedada com tecido tipo organza. Solução de mel a 10% foi fornecida para alimentação dos adultos. A cada dois dias as posturas foram retiradas e acondicionadas em recipientes plásticos de 120 mL até a eclosão das larvas. Posteriormente, as larvas foram individualizadas em potes plásticos de 120 mL e alimentadas com dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976). As pupas obtidas foram acondicionadas em potes plásticos de 1 L para a eclosão dos adultos.

Obtenção dos compostos e análise química do óleo essencial

O OE foi obtido das folhas de *L. sidoides* (Verbenaceae) por arraste, pela empresa Pronat (Horizonte, Ceará, Brasil). Foi realizada a análise química do OE para identificação e quantificação dos compostos (para detalhes ver OLIVEIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). O timol, constituinte em maior proporção no OE, foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Como controle positivo foi utilizado um inseticida comercial à base de deltametrina.

Bioensaio toxicidade

Para determinação das doses letais foram realizados bioensaios conduzidos com grupos de dez larvas de terceiro ínstar de *S. frugiperda*. Inicialmente, foi determinada a massa média dos insetos pela pesagem individual ($N = 30$) em balança analítica de precisão (Shimadzu, AUW220D). Testes preliminares foram realizados com três doses (1, 5 e 10 µg das substâncias/ mg de inseto). Posteriormente, doses intermediárias foram utilizadas para traçar as curvas de dose-mortalidade. Para diluição do OE de *L. sidoides*, timol e deltametrina, foi utilizado acetona (Panreac, UV-IR-HPLC-GPC PAIACS, 99,9%). Com o auxílio de uma microseringa (Hamilton®, Reno, NV, USA), os tratamentos foram aplicados topicamente (0,5 µL) na região do tórax de cada inseto.

Após aplicação, as larvas de *S. frugiperda* foram acondicionadas em placas de cultura celular (Global Trade Technology, Monte Alto, SP, Brasil) (24 orifícios) forradas com papel filtro umedecido e contendo folha de milho ($\cong 6 \text{ cm}^2$) para alimentação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por inseto e por tratamento. As placas contendo larvas tratadas foram acondicionadas em estufa incubadora tipo B.O.D. (Biotech®, Piracicaba, SP, Brasil) ($25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h). As avaliações da mortalidade dos insetos foram realizadas 48 h após a montagem dos bioensaios. Foram considerados mortos os indivíduos que se mantiveram imóveis e não responderam aos estímulos feitos com pincel.

Análises estatísticas

Os dados de mortalidade de *S. frugiperda* foram submetidos à análise de Probit para determinação das curvas de dose-mortalidade de cada tratamento, utilizando o procedimento PROC PROBIT (SAS Institute, 2008). Foram obtidas curvas com probabilidade de aceitação da hipótese de nulidade (de que os dados possuem distribuição de Probit) maior que 0,05 pelo teste χ^2 . A partir das curvas, foram obtidas as doses letais (DL_{50} e DL_{90}) e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade (IC_{95}).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toxicidade

O OE de *L. sidoides*, seu composto majoritário timol e o inseticida a base de deltametrina foram tóxicos para as larvas de *S. frugiperda*. As doses desses tratamentos necessárias para causar 50% e 90% de mortalidade das larvas (DL_{50} e DL_{90}) variaram de 3,21 a $3,07 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$ e 5,66 a $8,26 \times 10^{-3} \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Toxicidade por aplicação tópica do OE de *Lippia sidoides*, timol e inseticida deltametrina (DLM) em lagartas de terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda*, após 48 h de exposição.

Tratamento	N ^a	DL ₀₅ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	DL ₅₀ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	DL ₉₀ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	β^b	χ^2	P
OE de <i>L. sidoides</i>	353	1,55 (1,20 - 1,83)	3,21 (2,95 - 3,49)	5,66 (4,95 - 6,95)	5,22 $\pm$ 0,65	2,67	0,64
Timol	451	1,56 (1,07 - 1,98)	4,91 (4,35 - 5,56)	12,01 (9,73 - 16,61)	3,30 $\pm$ 0,40	2,27	0,80
Deltametrina (DLM)	513	$8,65 \times 10^{-4}$ ($5,06 \times 10^{-4}$ - $1,20 \times 10^{-3}$)	$3,07 \times 10^{-3}$ ($2,58 \times 10^{-3}$ - $3,35 \times 10^{-3}$)	$8,26 \times 10^{-3}$ ($6,70 \times 10^{-3}$ - $1,13 \times 10^{-2}$)	2,98 $\pm$ 0,39	3,15	0,50

^a Número de insetos.

^b Inclinação da curva $\pm$ erro padrão.

Os inseticidas botânicos apresentaram menor toxicidade à *S. frugiperda*, todavia a eficiência desses compostos naturais pode ser potencializada por meio de nanoformulações. Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (2017), as nanoformulações que continham 18% do ingrediente ativo potencializaram a ação desses compostos no controle do gorgulho-do-milho *Sitophilus zeamais*. Essa potencialização deve-se às propriedades das nanoformulações, como menor tamanho de partícula, liberação controlada e maior solubilidade (KAH; HOFMANN; 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Para uma agricultura mais sustentável é fundamental a busca por inseticidas mais eficientes e seletivos para, assim, ser possível a manutenção dos serviços ecossistêmicos (ex. controle biológico natural). No presente estudo, mostramos que, apesar do inseticida organossintético

deltametrina apresentar maior toxicidade para a *S. frugiperda*, o OE de *L. sidoides* e o timol também foram tóxicos.

CONCLUSÃO

Conclui-se com estes resultados as vantagens e o potencial dos inseticidas botânicos de OEs de *L. sidoides* e o composto majoritário timol como uma alternativa promissora para o controle da praga *S. frugiperda*.

Palavras-chave: efeito letal; Verbanaceae; lagarta-do-cartucho.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq, FAPITEC, UFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACCI, L.; LIMA, J. K. A.; ARAÚJO, A. P. A.; BLANK, A. F.; SILVA, I. M. A.; SANTOS, A. A.; SANTOS, A. C. C.; ALVES, P. B.; PICANÇO, M. C. Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n. 1, p. 66-76, 2015.

BALOGH, M. N.; FAN, J.; HASEEB, M.; ZHANG, R. Mapping potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Central Asia. **Insects**, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2020.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.

BATISTA, R. S. A.; SILVA, G. S.; MACHADO, S. E. F.; VIEIRA, K. V. M. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida* spp. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 34, n. 1, p. 40-49, 2013.

BERG, J. V. D.; BRITZ, C.; DU PLESSIS, H. Maize yield response to chemical control of *Spodoptera frugiperda* at different plant growth stages in South Africa. **Agriculture**, v. 11, n. 9, p. 826, 2021.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; BOTTEGA, D. B.; SOUZA, B. H. S.; RODRIGUES, N. L.; MICHELIN, V. Determinação dos tipos de resistência a *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja. **Semina: Ciências**, v. 36, p. 607-618, 2015.

BOLZAN, A.; PADOVEZ, F. E.; NASCIMENTO, A. R.; KAISER, I. S.; LIRA, E. C.; AMARAL, F. S.; KANNO, R. H.; MALAQUIAS, J. B.; OMOTO, C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, p. 2682-2689, 2019.

- CARBALLO, C. R. R.; RUBIO, M. V. Efecto antialimentario de aceites esenciales e plantas aromáticas sobre *Heliothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*. **Fitosanidad**, v. 16, p. 155-159, 2012.
- CARVALHO, R. A.; OMOTO, C.; FIELD, L. M.; WILLIAMSON, C. B. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2013.
- CASTLE, J. S.; PALUMBO, J. C.; PRABHAKER, N. A.; HOROWITZ, A. R. **Ecological determinates of *Bemisia tabaci* resistance to insecticides**. In: Philip, A.S.; Naranjo, S.E. Bionomics and management of global pest. New Springer Science Bussiness, New York, 1 ed., p. 423-459, 2010.
- CASTRO, C. E.; RIBEIRO, J. M.; DINIZ, T. T.; ALMEIDA, A. C.; FERREIRA, L. C.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 293-297, 2011.
- CAVALCANTI, S. C.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010.
- CHAUHAN, D.; SRIVASTAVA, P. Feeding inhibitory activity of different medicinal plant oils against *Papilio demoleus* L. **Journal of Entomology and Zoology studies**, v. 5, n. 1, p. 631-635, 2017.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 11, safra 2023/24, n. 7 sétimo levantamento, abril 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info>
- CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; OLIVEIRA, T. C.; GUIMARÃES, H. O.; ORDONES, F. B.; NUNES, M. L. S. Mudança de Hábitos. **Cultivar Grandes Culturas**, v. 176, p. 04-11, 2014.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 311-316, 2001.
- EICHOLZ, D. B. PRODUÇÃO, ESTRUTURA E COMPISÇÃO. IN: OLIVEIRA, DE. M.; LANG, G. H.; FERREIRA, A. C. D. (org). Milho: química, tecnologia e usos. São Paulo: Blucher, cap. 1, p. 12-26, 2022.
- FAVARATO, L. F.; SOUZA, J. L.; GALVÃO, J. C. C.; SOUZA, C. M. DE.; GUARCONI, R. C.; BALBINO, J. M. DE. S. Crescimento e produtividade do milho-verde sobre diferentes coberturas de solo no sistema plantio direto orgânico. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 4, p. 497-506, 2016.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. DE O.; CRUZ, J. C. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Embrapa Milho e Sorgo. **Circular Técnica**, 74, p. 12, 2006.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal of economic entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

HELLWIG, L.; DA ROSA, A. P. S. A.; GRÜTZMACHER, A. D.; DOS SANTOS, P. M.; TRECHA, C. D. O.; MEDINA, L. B.; FIPKE, M. V. Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em plantas de milho em casa de vegetação. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 239, 2016.

KAH, M.; HOFMAN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment international**, v. 63, p. 224-235, 2014.

MELO, C. R.; PICANÇO, M. C.; SANTOS, A. A.; SANTOS, I. B.; PIMENTEL, M. F.; SANTOS, A. C. C.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; CRISTALDO, P. F.; BACCI, L. Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. **Crop Protection**, v. 104, p. 47-51, 2018.

MONTEZANO, D. G.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; ROQUE-SPECHT, V. F.; SOUSA-SILVA, J. C.; PAULA-MORAES, S. D.; PETERSON, J. A.; HUNT, T. E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology**, v. 26, n. 2, p. 286-300, 2018.

NASCIMENTO, A. R. B. D.; FARIAS, J. R.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810-815, 2016.

NEGRINI, M.; FIDELIS, E. G.; SCHURT, D. A.; SILVA, F. S.; PEREIRA, R. S.; BIZZO, H. R. Insecticidal activity of essential oils in controlling fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Arquivos do instituto Biológico**, v. 86, p. 1-9, 2019.

NICULAU, E. S.; ALVES, P. B.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; MATOS, A. P.; BERNARDO, A. R.; VOLANTE, A. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; CORRÊA, A. G.; BLANK, A. F.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, L. P. Atividade inseticida de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* l'Herit e *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Química Nova**, v. 36, p. 1391-1394, 2013.

OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; BAKSHI, M.; ABHILASH, P. C.; FRACETO, L. F. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 8, p. 1550-1561, 2014.

OLIVEIRA, A. P.; SANTANA, A. S.; SANTANA, E. D. R.; LIMA, A. P. S.; FARO, R. R. N.; NUNES, R. S.; LIMA, A. D.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; CRISTALDO, P. F.; BACCI, L. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population

management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Industrial crops and products**, v. 107, p. 198-205, 2017.

OLIVEIRA, A. P.; SANTOS, A. A.; SANTANA, A. S.; LIMA, A. P. S.; MELO, C. R.; SANTANA, E. D. R.; SAMPAIO, T. S.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; CRISTALDO, P. F.; BACCI, L. Essential oil of *Lippia sidoides* and its major compound thymol: Toxicity and walking response of populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Crop Protection**, v. 112, p. 33-38, 2018.

POLETTI, M.; ALVES, E. B. Resistência de mosca branca a inseticidas. **Informativo do IRAC - Comitê Brasileiro de ação a resistência a inseticidas**. Mogi Mirim, São Paulo, p. 2, 2013.

SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, B. M. S.; MELO, C. R.; LIMA, A. P. S.; SANTANA, E. D. R.; BLANK, A. F.; PICANÇO, M. C.; ARAÚJO, A. P. A.; CRISTALDO, P. F.; BACCI, L. Sub-Lethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* on drywood termite *Cryptotermes brevis* (Blattodea: Termitoidea). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 436-441, 2017.

SANTOS, C. M. G.; DE SOUZA, J. I. R.; DOS SANTOS, L. G.; DE CASTRO LIMA, J. A. M.; DOS SANTOS, G. M. S. S. CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* NO MILHO EM CAMPO COM O USO DE EXTRATOS BOTÂNICOS. **Revista Contemporânea**, v. 4, n. 7, 2024.
SIEGFRIED, B. D.; YU, S. The toxicology and biochemistry of insecticides. **Florida Entomologist**, v. 92, n. 1, p. 187-187, 2009.

SOARES, A. M. S.; PENHA, T. A.; ARAÚJO, S. A.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; COSTA-JUNIOR, L. M. Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 401-406, 2016.

VERAS, H. N.; ARARUNA, M. K.; COSTA, J. G.; COUTINHO, H. D.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. Topical anti-inflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 2, p. 179-185, 2013.

Tabela de vida de *Podisus nigrispinus* tratados com óleo essencial de *Lippia sidoides*

Valfran Silva Andrade (Apresentador)¹

Ana Paula Santana Lima²

Virginia Elena Masiulionis³

Ana Paula Albano Araújo⁴

Arie Fitzgerald Blank⁵

Leandro Bacci⁶

¹Mestrado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ²Pesquisador. University of Nebraska–Lincoln. Estados Unidos; ³Pesquisador. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ⁴Docente. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal de Sergipe; ^{5,6}Docente. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

O percevejo *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) destaca-se como um importante predador generalista, com preferência alimentar voltada, principalmente, para larvas de lepidópteros, esse hábito alimentar, permite que esse inimigo natural explore diversos ecossistemas, desempenhando um papel crucial no controle biológico de importantes pragas agrícolas (ZANUNCIO *et al.*, 1996)

No entanto, o uso indiscriminado de pesticidas reduz a biodiversidade e afeta inimigos naturais (GALLO, 2002). Embora eficazes no controle de pragas, inseticidas sintéticos podem causar impactos negativos em organismos não alvo (PISA *et al.*, 2014). Nesse contexto, inseticidas botânicos, à base de OEs, são alternativas promissoras, sendo menos tóxicos para mamíferos e mais seletivos para inimigos naturais (MELO *et al.*, 2018). No entanto, até mesmo doses não letais podem causar efeitos subletais, como alterações na fecundidade e comportamento, ou promover hormese (CALBRESE; BALDWIN, 2001), que pode beneficiar ou prejudicar a sobrevivência e reprodução, dependendo do organismo (ex. herbívoro x inimigos naturais).

Neste estudo, avaliou-se por meio de uma tabela de vida a toxicidade e os efeitos subletais no desenvolvimento, parâmetros reprodutivos e parâmetros demográficos do percevejo predador *P. nigrispinus* exposto ao óleo essencial (OE) de *L. sidoides* e ao inseticida comercial deltametrina.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxicidade

Os bioensaios para determinar as doses letais foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, utilizando grupos de 10 ninfas de terceiro instar de *P. nigrispinus* provenientes de uma criação mantida no laboratório de Entomologia Florestal da Universidade Federal de Sergipe. Testes preliminares foram realizados com três doses de cada tratamento (1, 5 e 10 µg/mg de inseto). O OE de *L. sidoides* foi adquirido da empresa PRONAT (Horizonte, Ceará, Brasil). Após isso, doses intermediárias foram usadas para determinar as curvas de dose-mortalidade. O OE e a deltametrina foram diluídos em acetona e aplicados topicamente

(0,5 µL) no tórax dos insetos. Para o controle negativo usou-se o solvente acetona. A mortalidade foi avaliada 48 horas após a aplicação.

Parâmetros biológicos

Para avaliar os efeitos subletais dos compostos nos parâmetros biológicos de *P. nigrispinus* (desenvolvimento e reprodução), ninfas de terceiro ínstar foram tratadas com 0,5 µL das doses DL₁₀ e DL₃₀. Oito coortes foram formadas, cada uma com 180 indivíduos, divididos em 10 repetições de 18 ninfas, mantidas individualmente em placas de Petri.

Após atingirem a fase adulta, os indivíduos foram sexados e separados até a maturidade sexual. Dez casais de cada tratamento foram alojados e alimentados com pupas de *Tenebrio molitor*, sendo monitorados até a morte. Foram registrados: i) períodos de pré-ovoposição, ovoposição e pós-ovoposição, ii) longevidade de machos e fêmeas, iii) número de ovos e ninfas por fêmea, de massas de ovos por fêmea, e de ovos e ninfas por massa, iv) período de incubação e v) viabilidade dos ovos.

Tabela de vida

Com base nos dados de sobrevivência e reprodução de *P. nigrispinus* expostos às DLs dos tratamentos, foram calculados os parâmetros da tabela de vida de fertilidade: x (idade média dos insetos, considerando desde a fase de ovo), lx (taxa de sobrevivência desde a idade zero até o início da idade x), mx (fertilidade específica, ou seja, o número de fêmeas produzidas por fêmea sobrevivente no intervalo de idade x), e $lx.mx$ (número total de fêmeas nascidas na idade x).

Para a construção das tabelas de vida de fertilidade, foram calculados os seguintes parâmetros: taxa reprodutiva líquida (R_0), que indica o número de fêmeas geradas por cada fêmea ao longo de sua vida; tempo médio de geração (T), que é o intervalo entre o nascimento dos pais e dos descendentes; taxa intrínseca de crescimento (rm), que mede o aumento populacional por unidade de tempo; razão finita de crescimento (λ); e o tempo necessário para a população duplicar em número (TD) (KREBS, 1994).

Análises estatísticas

Os dados de mortalidade obtidos com os experimentos foram submetidos à análise de Probit para a determinação das curvas de concentração-resposta para cada tratamento utilizando o procedimento PROC PROBIT do SAS TM (SAS Institute, 2008).

Os parâmetros biológicos de desenvolvimento foram submetidos à análise de variância, seguida pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$) para comparar o tratamento com o controle, utilizando o procedimento PROC GLM (SAS Institute Inc, 2008). Para comparar as doses DL₁₀ e DL₃₀ dentro do tratamento, foi utilizado o teste t pareado ($P < 0,05$), também com o procedimento PROC GLM. Os parâmetros reprodutivos foram analisados com o teste de Tukey ($P < 0,05$) após a análise de variância, usando o mesmo procedimento.

Os parâmetros da tabela de vida foram estimados pela técnica de Jackknife no programa SAS, conforme Maia *et al.* (2000), e submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) através do procedimento PROC GLM (SAS Institute Inc, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toxicidade

O OE de *L. sidoides* foi menos tóxico a *P. nigrispinus* se comparado com o organossintético deltametrina, que foi 24,721 vezes mais tóxico ao percevejo predador que o OE (Tabela 1). Esse padrão se manteve para as doses subletais (DL₁₀ e DL₃₀) e para a dose considerada padrão de

controle (DL₉₀) (Tabela 1). Estudos indicam que OEs de plantas são menos tóxicos para artrópodes benéficos em comparação aos inseticidas convencionais (SANTOS *et al.*, 2018). Essa menor toxicidade pode ser atribuída à baixa penetração pela cutícula e à rápida desintoxicação enzimática, como observado em *P. nigrispinus* exposto ao OE de *Cymbopogon citratus* (BRÜGGER *et al.*, 2019).

Tabela 1. Toxicidade por aplicação tópica do inseticida deltametrina (DLM), e do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OE) sobre ninfas de terceiro instar de *Podisus nigrispinus*, após 48 h de exposição.

Tratamento	N ^a	DL ₁₀ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	DL ₃₀ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	DL ₅₀ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	DL ₉₀ (IC 95%) (mg g ⁻¹)	β ^b	χ ²	P
Deltametrina (DLM)	442	2,30x10 ⁻⁴ (1,28x10 ⁻⁴ -3,47x10 ⁻⁴)	5,97x10 ⁻⁴ (4,04x10 ⁻⁴ -8,11x10 ⁻⁴)	1,15x10 ⁻³ (8,53x10 ⁻⁴ -1,53x10 ⁻³)	5,80x10 ⁻³ (4,07x10 ⁻³ -9,42x10 ⁻³)	1,82±0,19	2,22	0,72
Óleo essencial de <i>L. sidoides</i> (OE)	440	14,45 (11,07-17,17)	21,55 (18,39-24,17)	28,43 (25,51-31,38)	55,93 (48,28-69,81)	4,36±0,53	0,91	0,69

^a = número de insetos. ^b = inclinação da curva. ± erro padrão.

Parâmetros reprodutivos

Não foram verificadas diferenças entre as doses e a interação entre tratamentos x doses para todos os parâmetros reprodutivos de *P. nigrispinus* avaliados. Dessa forma, foi feita média das duas doses (DL₁₀ e DL₃₀) para avaliar os efeitos dos tratamentos (Tabela 2). A duração do período de ovoposição, o número de ovos por fêmea, a massa de ovos e de ninfas por fêmea de *P. nigrispinus* variaram entre os tratamentos.

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de *Podisus nigrispinus* após exposição do 3º instar a (DL₁₀ e DL₃₀) do inseticida deltametrina (DLM) e do OE de *Lippia sidoides*.

Parâmetro reprodutivo	Tratamento ^a		
	Controle	DLM	OE
Período pré-ovoposição (dias) ^{n.s.}	5,50±0,28	5,50±0,18	5,15±0,15
Período de ovoposição (dias)	26,80±0,89 ab	22,35±1,95 b	34,60±3,29 a
Período pós-ovoposição (dias) ^{n.s.}	1,70±0,29	2,25±0,33	1,55±0,41
Nº de ovos/fêmea	457,3±37,3 b	418,9±30,7 b	622,8±30,8 a
Nº de massa de ovos/fêmea	17,50±1,23 b	15,85±1,19 b	23,80±1,63 a
Nº de ovos/massa de ovos ^{n.s.}	25,98±0,97	26,76±0,80	26,91±0,83
Nº de ninfas/fêmea	381,2±41,8 bc	339,5±27,8 c	528,0±26,5 a
Nº de ninfas/massa de ovos ^{n.s.}	20,45±1,71	21,78±1,03	22,91±0,90
Incubação dos ovos (dias) ^{n.s.}	4,99±0,01	5,00±0,001	5,01±0,01
Viabilidade de ovos (%) ^{n.s.}	78,12±5,55	81,01±2,28	84,98±1,78

^a Médias seguidas por mesma letra, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a $P < 0,05$. ^{n.s.} não significativo a 5% de probabilidade. ± erro padrão da média ($n = 20$, DL₁₀ = DL₃₀).

Os demais parâmetros reprodutivos não sofreram alterações com os tratamentos. No entanto, as fêmeas tratadas com OE ovopositaram por um período mais longo ($33,7 \pm 2,4$ dias) em comparação àquelas expostas à deltametrina ($22,4 \pm 2,0$ dias) (Tabela 2).

Fêmeas expostas ao OE de *L. sidoides* ovopositaram 36% a mais em comparação ao controle, com um aumento de 6,3 massas de ovos por fêmea. Além disso, houve um aumento de 39% no número de ninfas por fêmea. Em contrapartida, o inseticida sintético deltametrina não alterou os parâmetros reprodutivos de *P. nigrispinus*.

Doses subletais podem afetar a fisiologia e o comportamento dos insetos, como visto no prolongamento do 3º ínstar de *P. nigrispinus* após exposição, possivelmente devido ao redirecionamento de energia para a desintoxicação (XU *et al.*, 2016). Enquanto a deltametrina não afetou o 4º e 5º ínstar, os compostos botânicos prolongaram essas fases. Todos os tratamentos aumentaram a duração da fase imatura, o que pode aumentar a exposição dos insetos a fatores de mortalidade natural, sendo mais prejudicial para herbívoros do que para inimigos naturais.

Parâmetros demográficos

Não houve diferenças entre as doses ou a interação entre tratamentos e doses em todos os parâmetros da tabela de vida de *P. nigrispinus*. Assim, os efeitos dos tratamentos foram avaliados com a média das duas doses (DL₁₀ e DL₃₀) (n = 20) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros da tabela de vida de *Podisus nigrispinus* expostos as doses subletais (DL₁₀ e DL₃₀) de deltametrina (DLM) e do OE de *Lippia sidoides*.

Parâmetro da tabela de vida	Tratamento ^a		
	Controle	DLM	OE
Taxa reprodutiva líquida (<i>R0</i>) (prole/indivíduo)	209,1±17,1 ab	168,5±12,2 b	216,3±10,9 ab
Taxa intrínseca de crescimento(<i>rm</i>) (dia ⁻¹) n.s.	0,1431±0,0024	0,1372±0,0020	0,1393±0,0017
Razão finita e crescimento (<i>λ</i>) (dia ⁻¹) n.s.	1,1539±0,0028	1,1471±0,0023	1,1494±0,0019
Tempo médio de geração (<i>T</i>) (dia) n.s.	37,37±0,32	37,40±0,44	38,60±0,56
Tempo para a população dobrar de tamanho (<i>TD</i>) (dia) n.s.	4,84±0,08	5,05±0,07	4,98±0,06

^a Médias seguidas por mesma letra, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a $P < 0,05$. ± erro padrão da média (n = 20, DL₁₀ = DL₃₀).

A taxa reprodutiva líquida (*R0*) de *P. nigrispinus* variou entre os tratamentos. Os demais parâmetros demográficos não modificaram com a aplicação dos compostos (Tabela 3). A taxa de sobrevivência (*lx*) de *P. nigrispinus* e a fertilidade específica (*mx*) foram superiores nos insetos expostos ao OE de *L. sidoides* (Fig. 3C). Esse composto causou picos no número de fêmeas produzidas por fêmea por dia ao longo de toda a sua longevidade, mesmo com a taxa de sobrevivência baixa, entre o 55º ao 75º dia (Fig. 3C-D). O inseticida deltametrina não afetou significativamente esses parâmetros, sendo semelhante ao controle até o 40º dia de longevidade (Fig. 3A-B), causando redução na fertilidade específica após esse período (Fig. 3B).

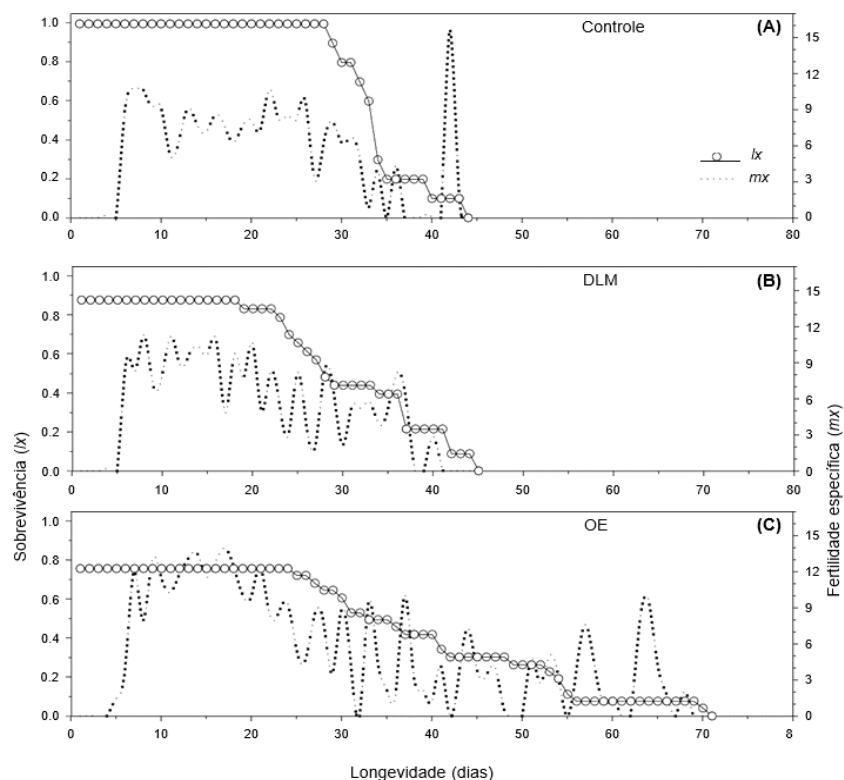


Figura 1. Taxa de sobrevivência (lx) e fertilidade específica (mx) de *Podisus nigrispinus* no controle (A) e expostos as doses subletais (DL₁₀ e DL₃₀) de deltametrina (DLM) (B) e do OE de *Lippia sidoides* (C).

Os valores positivos de rm e $R0$ nas doses subletais indicam que *P. nigrispinus* tem potencial de crescimento populacional sob todos os compostos testados. Além disso, o aumento no número de ovos e ninfas por fêmea com compostos botânicos sugere um possível efeito de hormese.

Este estudo mostra que o OE de *Lippia sidoides* têm baixa toxicidade para *P. nigrispinus* em comparação com a deltametrina. Embora as doses subletais prolonguem o desenvolvimento das ninfas e reduzam o peso dos adultos, não afetaram negativamente a reprodução. Além disso, o OE pode aumentar a longevidade e a capacidade reprodutiva desse predador.

CONCLUSÃO

Dessa forma, é possível concluir que o OE de *L. sidoides* é mais seguro para o predador *P. nigrispinus* do que o inseticida deltametrina, além de promover o efeito de hormese em alguns parâmetros biológicos desse predador.

Palavras-chave: bioinseticida; predador; inimigo natural.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq, FAPITEC, UFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRÜGGER, B. P.; MARTÍNEZ, L. C.; PLATA-RUEDA, A.; CASTRO, B. M. C.; SOARES, M. A.; WILCKEN, C. F.; CARVALHO, A. G.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Bioactivity of

the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-8, 2019.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. A quantitatively-based methodology for the evaluation of chemical hormesis. **Human Ecology and Risk Assessment**, v. 3, p. 545-554, 1997.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

KREBS, C. J. **Ecology: The experimental analysis of distribution and abundance**. 4. ed. New York: Harper Collins College Publishers, 1994.

MAIA, A. H. N.; LIUZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 511-518, 2000.

MELO, C. R.; PICANÇO, M. C.; SANTOS, A. A.; SANTOS, I. B.; PIMENTEL, M. F.; SANTOS, A. C. C.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; CRISTALDO, P. F.; BACCI, L. Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. **Crop Protection**, v. 104, p. 47-51, 2018.

PISA, L. W. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2014.

REYNOLDS, A. M.; SWORD, G. A.; SIMPSON, S. J.; REYNOLDS, D. R. Predator percolation, insect outbreaks, and phase polyphenism. **Current Biology**, v. 19, p. 20-24, 2009.

SANTOS, A. C. C.; CRISTALDO, P. F.; ARAÚJO, A. P. A.; MELO, C. R.; LIMA, A. P. S.; SANTANA, E. D. R.; DE OLIVEIRA, B. M. S.; OLIVEIRA, J. W. S.; VIEIRA, J. S.; BLANK, A. F.; BACCI, L. *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera) in the target of neonicotinoids: A one-way ticket? Bioinsecticides can be an alternative. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 28-36, 2018.

XU, C.; ZHANG, Z.; CUI, K.; ZHAO, Y.; HAN, J.; LIU, F.; MU, W. Effects of sublethal concentrations of cyantraniliprole on the development, fecundity and nutritional physiology of the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One**, v. 11, p. 1-19, 2016.

ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J. C.; SAAVEDRA, J. L. D.; LOPES, E. D. Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) com *Zophobas confusa* Gebien (Coleoptera: Tenebrionidae) comparado a duas outras presas alternativas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, p. 159-164, 1996.

SAS Institute, 2008. SAS/STAT 9.2 User's Guide.

Toxicidade do óleo essencial de *Croton grewioides* sobre *Podisus nigrispinus*

Heloisa Safira Santos Pinheiro (Apresentadora)¹

Natielli Conceição Santos²

Virginia Elena Masiulionis³

Ana Paula Albano Araújo⁴

Arie Fitzgerald Blank⁵

Leandro Bacci⁶

¹Doutorado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ²Pesquisador. EMBASA-Empresa Baiana de Águas e Saneamento; ³Pesquisador. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ⁴Docente. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal de Sergipe; ^{5,6}Docente. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

Podisus nigrispinus ocorre na região Neotropical, desde a Argentina até a Costa Rica. No Brasil, está presente em diversos cultivos agrícolas e florestais, o que demonstra sua amplitude e capacidade de adaptação (BUENO *et al.*, 2014). Esse percevejo é um predador generalista que demonstra eficiência no controle de diversos insetos-praga, tais como: *Diatraea saccharalis* (VACARI; OTUKA; BORTOLI, 2007), *Tuta absoluta* (VIVIAN *et al.*, 2002), *Spodoptera exigua* (MOHAGHEGH; CLERCQ; TIRRY, 2001), *Chrysodeixis chalcites* (CLERCQ *et al.*, 1998) e *Tenebrio molitor* (ZANUNCIO *et al.*, 2001). Além do seu hábito alimentar polífago, que permite o controle de populações de diferentes insetos, *P. nigrispinus* também se alimenta de substratos vegetais; estratégia de sobrevivência utilizada quando a população de presas está escassa ou inadequada (EVANGELISTA *et al.*, 2002).

Diante da importância dos inimigos naturais para os programas de manejo, é importante analisar a seletividade de inseticidas a fim de minimizar os efeitos sobre esses organismos (FONSECA *et al.*, 2008). Nessa perspectiva, os óleos essenciais (OEs) de plantas surgem como boas alternativas para um manejo mais sustentável (ISMAN; GRIENESEN, 2014), uma vez que sua maior volatilidade pode facilitar sua seletividade aos organismos não alvo quando comparados aos inseticidas sintéticos (ISMAN, 2016; SANTOS *et al.*, 2018).

Nesse contexto, *Croton grewioides*, conhecida popularmente como “canelinha-de-cheiro” ou “canelinha”, é uma planta endêmica do bioma Caatinga, encontrada em regiões rochosas e solos arenosos nos estados da região Nordeste (SILVA *et al.*, 2010). Estudos mostram que os OEs obtidos a partir de *C. grewioides* podem apresentar uma grande diversificação de compostos, representando assim importantes fontes de substâncias bioativas para o controle de insetos (FARMER; RYAN, 1990). Dentre tais compostos, tem-se destaque para: (*E*)-anetol, (*E*)-metil isoeugenol, eugenol, metil eugenol e metil chavicol (SILVA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Alguns estudos já demonstram a atividade inseticida do OE de *C. grewioides* contra as pragas *Zabrotes subfasciatus* (SILVA *et al.*, 2008) e *Nasutitermes corniger* (MENEZES, 2023).

No presente estudo, avaliamos a toxicidade de dois acessos do OE de *C. grewioides* e seus compostos majoritários sobre o percevejo predador *P. nigrispinus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação de insetos

A população de *P. nigrispinus* utilizada foi obtida da criação mantida no Laboratório de Entomologia Florestal (LEFLO) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os insetos foram mantidos em potes de polipropileno de 500 mL, alimentados *ad libitum* com larvas de 7º instar de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Os ovos depositados nas gaiolas foram diariamente coletados com o auxílio de algodão hidrofílico e transferidos para placas de Petri (Global Trade Technology, Monte Alto, SP, Brasil) (9 x 1,5 cm) contendo algodão umedecido com água. As larvas de *T. molitor* utilizadas para alimentar o *P. nigrispinus* foram alimentadas com farelo de soja e mantidas em bandejas plásticas de 24 x 20 x 15 cm.

Obtenção dos compostos e análise química dos OEs

Os OEs de *Croton grewoides* foram obtidos dos acessos CGR112 e CGR126 que são mantidos no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS) – localizado na fazenda experimental – Campus Rural da UFS, São Cristóvão, SE, Brasil (10°55 S, 37°11' W, 18 m de altitude).

Inicialmente as folhas retiradas das plantas foram secas em estufas a 40 °C durante 5 dias. Os OEs foram extraídos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado, utilizando-se 70 g de amostras de folhas secas por 120 min a partir da ebulição a 100 °C. O OE obtido de cada amostra foi armazenado à temperatura de -20 °C até a análise da composição química. Para identificar e quantificar os compostos, foram realizadas as análises dos OEs (para maiores detalhes, veja OLIVEIRA *et al.*, 2020). Os compostos metil eugenol e eugenol, encontrados majoritariamente nos OEs dos acessos estudados, foram adquiridos da empresa SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, Missouri, EUA).

Bioensaios

Os bioensaios foram realizados na Clínica Fitossanitária, da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão – SE.

Os tratamentos utilizados foram os OEs dos acessos CGR112 e CGR126 de *C. grewoides* e os compostos majoritários metil eugenol e eugenol. O solvente utilizado para diluir os compostos foi a acetona (Panreac, UV-IR-HPLC-GPC PAIACS, 99,9%). Os tratamentos foram aplicados topicamente na região do tórax de cada inseto com o auxílio de uma microseringa (Hamilton®, Reno, NV, USA), sendo 1 µL para *P. nigrispinus*. No controle foi aplicado somente acetona. Testes preliminares indicaram que a acetona não afeta a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos.

Para a determinação da massa dos insetos, 50 ninfas de terceiro instar de *P. nigrispinus* foram pesadas, individualmente, em balança de precisão (Shimadzu corporation, AUW220D, Barueri, São Paulo, Brasil).

Toxicidade

Testes preliminares foram realizados com três doses (1, 5 e 10 µg das substâncias/mg de inseto) de cada tratamento. A partir destes testes foram determinadas, no mínimo, seis doses para traçar as curvas de dose-mortalidade. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento.

Antes das aplicações dos tratamentos, as ninfas de *P. nigrispinus* foram deixadas em freezer por 90 s para redução da atividade. Testes preliminares indicaram que este tempo de permanência no freezer não afeta a sobrevivência dos insetos. As ninfas de *P. nigrispinus* tratadas foram

transferidas para placas de Petri contendo algodão hidrofílico umedecido e larvas de 7º instar de *T. molitor* foram fornecidas *ad libitum* como fonte de alimento. Cada unidade experimental foi composta por 10 insetos.

As placas de Petri contendo as ninfas foram mantidas em câmara de crescimento BOD sob condições controladas (Biotech®, Piracicaba, SP, Brasil) ($27 \pm 0,5^\circ$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas). A mortalidade dos insetos foi verificada 72 h após a montagem dos bioensaios. Insetos que não apresentaram movimentos após serem estimulados com pincel de cerdas macias foram considerados mortos.

Análise estatística

Os dados de toxicidade obtidos para *P. nigrispinus* foram submetidos à análise de Probit para determinação das curvas de dose-mortalidade utilizando o procedimento PROC PROBIT (SAS Institute, 2008). As curvas foram obtidas com probabilidade de aceitação da hipótese nula (de que os dados possuem distribuição Probit) maior que 0,05 pelo teste de χ^2 . A partir das curvas foram obtidas as DLs (01 a 99) com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC_{95%}). As curvas e as DLs foram comparadas pelo critério da não-sobreposição dos intervalos de confiança (IC_{95%}) com a origem do intervalo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos óleos essenciais

Onze compostos foram identificados nos OEs de ambas os acessos de *C. grewioides*. Os principais compostos encontrados nos OEs dos acessos foram metil eugenol (85,6%) para CGR112 e metil eugenol (46%) e eugenol (42,7%) para CGR126. Os teores de OE foram 4,1 e 2% para os acessos CGR112 e CGR126, respectivamente.

Toxicidade

Os OEs obtidos dos acessos CGR112 e CGR126 de *C. grewioides* e seus compostos metil eugenol e eugenol foram tóxicos para as ninfas de *P. nigrispinus*. A DL₅₀ obtida para os tratamentos variou de 1,22 a 4,45 µg/mg, na dose de controle padrão, as DLs₉₀ variaram de 2,86 a 17,06 µg/mg. O OE do acesso 112 e o composto majoritário metil eugenol (Metil eugenol = 1,22 µg/mg; CGR112 = 1,44 µg/mg) foram mais tóxicos para *P. nigrispinus* do que o OE do acesso 126 e o composto majoritário eugenol (Eugenol = 3,34 µg/mg; CGR126 = 4,45 µg/mg) (Tabela 1). Na DL₅₀, os compostos majoritários foram mais tóxicos que os seus respectivos OEs.

Tabela 1. Toxicidade por aplicação tópica do OE de *Croton grewioides* e seus compostos majoritários (Metil eugenol e Eugenol) sobre ninfas de terceiro instar de *Podisus nigrispinus*.

Composto	N	DL ₃₀ (IC _{95%}) ^a	DL ₅₀ (IC _{95%}) ^a	DL ₉₀ (IC _{95%}) ^a	Slope ($\pm$ EP) ^b	χ^2 ^c	P ^d
CGR112	240	0,79 (0,52-1,05)	1,44 (1,09-1,82)	6,39 (4,75-9,83)	1,98 $\pm$ 0,24	4,70	0,32
CGR126	240	2,57 (1,99-3,18)	4,45 (3,62-5,50)	17,06 (12,54-26,46)	2,20 $\pm$ 0,24	6,00	0,20
Metil eugenol	240	0,86 (0,70-1,01)	1,22 (1,04-1,43)	2,86 (2,32-3,85)	3,46 $\pm$ 0,40	0,67	0,96
Eugenol	240	2,06 (1,62-2,50)	3,34 (2,76-4,05)	10,90 (8,34-15,85)	2,50 $\pm$ 0,26	3,04	0,55

^N número de insetos testados.

^a doses letais (30, 50 e 90 em mg de composto/g de inseto) e seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

^b inclinação da curva $\pm$ erro padrão.

^c qui-quadrado ($P > 0,05$).

^d valor de P.

Neste estudo, avaliamos os efeitos letais dos OEs de dois acessos de *C. grewioides* e seus principais compostos metil eugenol e eugenol sobre o inimigo natural *P. nigrispinus*. Os OEs dos acessos mostraram bioatividade distinta. Em geral, o OE do acesso CGR126 foi menos tóxico para o inimigo natural.

A toxicidade distinta dos OEs pode ser devida a interações diferenciais entre as propriedades físico-químicas dos compostos e a fisiologia e metabolismo dos insetos, afetando a taxa de penetração, metabolismo, excreção e ação nos locais de ação dos compostos (GEROLT, 1983; RESENDE *et al.*, 2016). Embora a atividade biológica seja frequentemente atribuída aos compostos principais, os OEs são constituídos por uma mistura complexa de compostos que podem resultar em interações que afetam sua atividade (ATANASOVA; Leather 2018; ISMAN, 2016; REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012). Tanto o OE do acesso CGR112 quanto o CGR 126 de *C. grewioides* apresentam metil eugenol como composto principal; entretanto, apenas o OE do acesso CGR126 possui eugenol (42%) em sua constituição. Tal diferença parece ser responsável pela bioatividade distinta apresentada pelos OEs. Em geral, a presença de eugenol parece ter tornado o OE menos tóxico ao inimigo natural *P. nigrispinus*.

Os valores da DL₅₀ obtidos para *Chrysodeixis includens*, em geral, foram maiores quando comparados aos valores da DL₅₀ obtidos para *P. nigrispinus*, possivelmente devido ao fato de a praga ser naturalmente mais exposta aos compostos do que o inimigo natural. Acima da DL₉₀, o OE do acesso CGR126 de *C. grewioides* foi mais tóxico à praga *C. includens* do que ao inimigo natural *P. nigrispinus*. O padrão de eficiência recomendado no Brasil coincide justamente com tais doses (> DL₈₀), o que garantiria maior segurança ao predador (SANTOS *et al.*, 2023).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que, apesar de todos os tratamentos apresentarem toxicidade para *P. nigrispinus*, apenas o OE do acesso CGR126 de *C. grewioides* mostra-se promissor para uso futuro em manejo sustentável porque é mais seguro para o percevejo predador *P. nigrispinus*. Compostos isolados deste OE (por exemplo, eugenol) também podem ser promissores, desde que a seletividade ecológica seja observada.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; seletividade; percevejo predador; inimigo natural.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq, FAPITEC, UFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATANASOVA, D.; LEATHER, S. R. Plant essential oils: the way forward for aphid control? *Annals of Applied Biology*, v. 173, n. 2, p. 175-179, 2018.
- BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F.; BUENO, R. C. O. F. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (EMBRAPA). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. 2014. p. 495-508.
- CLERCQ, P.; MERLEVEDE, F.; MESTDAGH, I.; VANDENDURPEL, K.; MOHAGHEGH, J.; DEGHEELE, D. Predation on the tomato looper *Chrysodeixis chalcites* (Esper) (Lep., Noctuidae)

by *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 122, n. 1-5, p. 93-98, 1998.

MOHAGHEGH, J.; DE CLERCQ, P.; TIRRY, L. Functional response of the predators *Podisus maculiventris* (Say) and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Het., Pentatomidae) to the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep., Noctuidae): effect of temperature. **Journal of Applied Entomology**, v. 125, n. 3, p. 131-134, 2001.

EVANGELISTA, W. S.; SILVA-TORRES, C. S. A.; TORRES, J. B. Toxicidade de lufenurom para *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, p. 319-325, 2002.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 7713-7716, 1990.

FONSECA, P. R. B.; BERTONCELLO, T. F.; RIBEIRO, J. F.; FERNANDES, M. G.; DEGRANDE, P. E. Selectivity of insecticides to natural enemies on soil cultivated with cotton. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 4, p. 304, 2008.

GEROLT, P. Insecticides: their route of entry, mechanism of transport and mode of action. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 58, n. 2, p. 233-274, 1983.

MENEZES, G. S. **Óleos essenciais de *Croton grewoides* e seus compostos majoritários: efeitos letais e subletais sobre o cupim *Nasutitermes corniger* (Blattodea: Isoptera)**. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2023.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140-145, 2014.

ISMAN, M. B. **Pesticide based on plant essential oils: phytochemical and practical considerations**. In: JELIAZKOV, V. D.; CANTRELL, C. Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry and Utilization. ACS Symposium Series 1218, p. 13-26, 2016.

OLIVEIRA, S. D. S.; OLIVEIRA-SILVA, A. M.; BLANK, A. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; NIZIO, D. A. C.; ALMEIDA-PEREIRA, C. S.; PEREIRA, R. O.; MENEZES-SÁ, T. S. A.; SANTANA, M. H. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Radical scavenging activity of the essential oils from *Croton grewoides* Baill accessions and the major compounds eugenol, methyl eugenol and methyl chavicol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 33, n. 1, p. 94-103, 2020.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

RESENDE, G. C.; ALVARENGA, E. S.; ARAÚJO, T. A.; CAMPOS, J. N. D.; PICANÇO, M. C. Toxicity to *Diaphania hyalinata*, selectivity to non-target species and phytotoxicity of furanones and phthalide analogues. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1772-1777, 2016.

- SANTOS, S. R. D.; SPECHT, A.; CARNEIRO, E.; PAULA-MORAES, S. V. D.; CASAGRANDE, M. M. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, n. 4, p. 294-299, 2018.
- SANTOS, N. C.; SILVA, J. E.; SANTOS, A. C. C.; DANTAS, J. O.; TAVARES, S. R. S. A.; ANDRADE, V. S.; OLIVEIRA, S. D. S.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; BACCI, L. Bioactivity of essential oils from *Croton grewoides* and its major compounds: toxicity to soybean looper *Chrysodeixis includens* and selectivity to the predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 18798-18809, 2023.
- SILVA, C. G.; ZAGO, H. B.; JÚNIOR, H. J. G. S.; CAMARA, C. A.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E.; LUCENA, M. F. F. Composição e atividade inseticida do óleo essencial de *Croton grewoides* Baill. contra o gorgulho do feijão mexicano (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 179-182, 2008.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 441-453, 2010.
- VACARI, A. M.; OTUKA, A. K.; DE BORTOLI, S. A. Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 259-265, 2007.
- VIVAN, L. M.; TORRES, J. B.; VEIGA, A. F. D. S. L.; ZANUNCIO, J. C. Comportamento de predação e conversão alimentar de *Podisus nigrispinus* sobre a traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 581-587, 2002.
- ZANUNCIO, J. C.; MOLINA-RUGAMA, A. J.; SERRAO, J.; PRATISSOLI, D. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 331-337, 2001.

Resposta olfativa do *Euschistus heros* tratados com o óleo essencial de *Lippia gracilis*

Sandy Maria Santos Passos (Apresentadora)¹

Swamy Rocha Siqueira Abreu Tavares²

Tainara da Silva Carvalho³

Virginia Elena Masiulionis⁴

Ana Paula Albano Araújo⁵

Arie Fitzgerald Blank⁶

Leandro Bacci⁷

¹Mestrado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe;

²Pesquisador. Polo Tecnológico Agroalimentar de Arapiraca. Universidade Estadual de Alagoas; ³Discente. Departamento de Engenharia Agrônômica. Universidade Federal de Sergipe; ⁴Pesquisador. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ⁵Docente. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal de Sergipe; ^{6,7}Docente. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais *commodities* comercializadas, sendo destaque na economia mundial. É utilizada como matéria-prima pelas agroindústrias, estando presente na composição de rações para animais (WANG *et al.*, 2016), e como fonte de proteína e óleo (BIANCO *et al.*, 2012). No Brasil, o potencial produtivo da soja é favorecido devido à grande extensão de terras cultivadas, o uso de mão de obra qualificada e o desenvolvimento de novas tecnologias, sendo possível monitoramentos e previsões que ajudam no manejo (EUGENIO *et al.*, 2020; TORSONI *et al.*, 2023). Mesmo com o avanço da tecnologia, problemas fitossanitários são responsáveis por causar diminuição da produtividade das lavouras de soja como o ataque de insetos-pragas, por exemplo, *Euschistus heros* (Fabricius 1798) conhecido popularmente como percevejo-marrom-da-soja ou percevejo-marrom. Ao succionarem o conteúdo dos grãos, os *E. heros* provocam a redução da quantidade de óleo e, assim, diminuição da massa e inviabiliza o poder germinativo das sementes (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2020).

A principal forma de controle dos *E. heros* é com a utilização de inseticidas organossintéticos. Todavia, estudos demonstram falhas no controle dos percevejos, uma vez que o uso contínuo de inseticidas de mesmo princípio ativo, principalmente piretroides e neonicotinoides, favorece a seleção de populações de insetos resistentes (SOMAVILLA *et al.*, 2020). Atualmente, o número de moléculas sintéticas registradas para o controle desse inseto é pequeno (TUELHER *et al.*, 2018; SOMAVILLA *et al.*, 2020). A eficiência desses inseticidas pode ser estabelecida por meio da determinação da dose ou concentração letal, porém devido a rápida degradação é predominante a exposição a doses/concentrações subletais dos resíduos (DESNEUX *et al.*, 2007; PANIZZI *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais de plantas (OEs) e seus compostos majoritários apresentam atividades biológicas promissoras para o manejo de insetos (HANLEY *et al.*, 2007). Plantas do gênero *Lippia* (Verbanaceae) são reconhecidas por suas atividades biológicas (Pascual *et al.*, 2001). Em estudos anteriores, a espécie aromática *Lippia gracilis* Schauer, apresentou propriedades inseticidas contra espécie de praga agrícola *Diaphania hyalinata* (MELO *et al.*, 2018). Além disso, a oportunidade

de escolha dos insetos também pode ser alterada devido detecção dos compostos voláteis (BRITO *et al.*, 2020). Essa alteração pode afetar a localização por parceiros sexuais e plantas hospedeiras, o que pode ocasionar a diminuição das chances de reprodução e os parâmetros demográficos (TRICOIRE-LEIGNEL *et al.*, 2012).

Dessa forma, nesse estudo foi avaliado a preferência olfativa de machos de *E. heros* em relação à fonte alimentar e à fêmea tratada com OE de *L. gracilis* dos quimiotipos timol e carvacrol, e seus compostos majoritários isolados. Comparamos os efeitos ao inseticida comercial a base de imidacloprido.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos compostos

Os OEs dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* foram obtidos dos acessos LGRA106 e LGRA109, mantidos no banco de germoplasma no Campus Rural da UFS, São Cristóvão, SE, Brasil (10°55 S, 37°11' W, 18 m de altitude). Os compostos majoritários timol e carvacrol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e o inseticida organossintético imidacloprido foi adquirido comercialmente.

Concentração-mortalidade

Para obtenção das curvas de concentração-mortalidade, ninfas de terceiro ínstar de *E. heros* recém emergidas, obtidas da empresa Pragas.com, foram pesadas individualmente em balança de precisão para manter um padrão no tamanho ($0,004301 \pm 0,000456$ g) e utilizadas nos bioensaios. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições. Cada repetição foi composta por cinco ninfas de terceiro ínstar de *E. heros*, totalizando 60 ninfas/concentração/tratamento. A unidade experimental consistiu em uma placa de Petri (6 x 1,5 cm), com a borda interna coberta por uma fina camada de vaselina sólida atóxica e o fundo forrado com disco de papel filtro. A vaselina foi empregada para evitar a subida das ninfas e mantê-las em contato com o tratamento, e o disco de papel filtro foi utilizado como substrato para receber os tratamentos.

As curvas foram estabelecidas utilizando inicialmente quatro concentrações (1, 5, 10 e 20 mg do composto por mL de solução) de cada tratamento. Em seguida, concentrações intermediárias (de cinco a oito) foram utilizadas para traçar as curvas de concentração-mortalidade. O papel filtro foi tratado com 200 µL de cada combinação tratamento x concentração com o uso de micropipeta de 100 a 1000 µL. No controle foi aplicado somente acetona. Após a aplicação dos tratamentos, as placas contendo o papel filtro tratado foram mantidas por 5 min em câmara de exaustão para permitir a evaporação do solvente. Em seguida, as ninfas de terceiro ínstar de *E. heros* foram transferidas para cada uma das placas, as quais foram cobertas com tecido do tipo organza, a fim de impedir a fuga e facilitar a troca gasosa dos insetos. Testes preliminares indicaram que a acetona e a vaselina não afetaram a sobrevivência ou comportamento das ninfas de *E. heros*. A mortalidade das ninfas foi avaliada 72 h após a montagem do experimento. Foram considerados mortos os insetos que não apresentaram movimentação após o estímulo de um pincel.

Preferência olfativa

O bioensaio foi conduzido a fim de verificar se há mudança na preferência olfativa de machos em relação à fonte alimentar e ao odor da fêmea na presença dos tratamentos. Os testes foram conduzidos em olfatômetro em “Y”, com velocidade da corrente de ar em 1,0 L/min. Cada braço do olfatômetro foi conectado a um pote hermeticamente fechado contendo uma mistura de uma vagem, dois grãos, duas sementes (*Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max* L., *Arachis hypogaea*

L. e *Helianthus annuus* L.) e uma fêmea virgem de *E. heros* em maturidade sexual (idade de 13 dias). Em um dos braços, além do alimento e da fêmea, também foi inserido um papel filtro (6 cm) tratado com 0,2 mL das CL₉₀ de um dos tratamentos (OEs, compostos majoritários, imidacloprido e acetona - controle) determinadas nos bioensaios de concentração-mortalidade. No outro braço, foi inserido um papel filtro contendo apenas acetona. O delineamento foi inteiramente casualizado com 35 repetições.

Machos virgens, também em maturidade sexual (11 dias), foram colocados na abertura inicial do tubo. Cada observação foi encerrada quando o inseto atingiu o final de um dos braços do olfatômetro, ou quando atingiu o tempo limite de 10 min de observação. Os machos foram trocados a cada repetição.

Análise estatística

Os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios de toxicidade foram submetidos à análise de Probit para determinação das curvas de concentração-resposta utilizando o protocolo PROC PROBIT (SAS Institute, 2008).

Os dados de comportamento foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro Wilk ($P > 0,05$) e Brown-Forsythe ($P > 0,05$) para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade da variância, respectivamente. Quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade de variância eles foram submetidos à análise de variância paramétrica (ANAVA) e quando não atenderam aos pressupostos da ANAVA, eles foram submetidos à análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Posteriormente, os dados de preferência olfativa foram analisados pelo teste exato de Fisher. Todas as análises dos dados comportamentais foram feitas utilizando o programa SigmaPlot, versão 15.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos OEs

Foram identificados 15 e 17 compostos nos OEs do acesso *LgThy* e *LgCar* representando 99,5 e 98,9% da composição química dos óleos, respectivamente. Os OEs destes acessos foram denominados pelo composto majoritário, sendo o timol encontrado na proporção 44,91% (*LgThy* – quimiotipo timol) e o carvacrol na proporção 44,34% (*LgCar* – quimiotipo carvacrol) (Tabela 1).

Tabela1. Porcentagem dos majoritários dos OE de dois acessos de *L. gracilis* (*LgThy* e *LgCar*).

Composto	Índice de retenção	Acessos	
		<i>LgThy</i>	<i>LgCar</i>
Timol	1289	44,91	3,14
Carvacrol	1289	0,48	44,34
Total detectado (%)		99,5	98,9

Toxicidade

Os OEs dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* e seus compostos majoritários isolados foram tóxicos para ninfas de terceiro ínstar de *E. heros*. As CL₅₀ variaram de 0,20 a 0,77 g/mL. Timol foi o composto mais tóxico, entre os botânicos, sendo necessárias 0,20 mg/ mL para matar 50% da população de *E. heros*. A sua CL₅₀ foi inferior à observada para seu respectivo OE

(0,53 mg/mL) e semelhante ao inseticida imidacloprido (0,16 mg/mL). Já as toxicidades do OE do quimiotipo carvacrol de *L. gracilis* e seu composto isolado não diferiram pelo critério de sobreposição do intervalo de confiança (IC 95%) com a origem do intervalo (Tabela 2).

Tabela 2. Toxicidade dos OEs dos quimiotipos timol e carvacrol de *Lippia gracilis*, seus compostos majoritários isolados e do inseticida imidacloprido sobre ninfas de terceiro ínstar de *Euschistus heros*.

Compostos	<i>n</i> ^a	CL ₃₀	CL ₅₀	CL ₉₀	Slope (± SE)	χ ²	<i>P</i>
		(IC 95%) ^b	(IC 95%) ^b	(IC 95%) ^b			
		----- mg/ml -----					
OE <i>LgThy</i>	480	0,10 (0,04-0,18)	0,53 (0,31-0,82)	32,11 (17,44-75,90)	0,72 ± 0,07	5,95	0,43
OE <i>LgCar</i>	419	0,18 (0,08-0,32)	0,77 (0,48-1,11)	24,46 (13,23-64,16)	0,85 ± 0,10	2,63	0,75
Timol	300	0,071 (0,023-0,13)	0,20 (0,10-0,33)	2,82 (1,83-5,42)	1,13 ± 0,16	4,43	0,21
Carvacrol	360	0,12 (0,04-0,23)	0,50 (0,26-0,80)	17,50 (9,90-41,23)	0,83 ± 0,11	4,06	0,40
Imidacloprido	352	0,05 (0,01-0,11)	0,16 (0,05-0,28)	3,32 (2,08-7,78)	0,97 ± 0,18	6,32	0,18

^a número de insetos testados.

^b concentrações letais necessárias para matar 30, 50 e 90 % das populações e seus respectivos intervalos e confiança a 95%.

Preferência olfativa

Os machos adultos mostraram preferência pelas áreas sem tratamento de bioinseticidas (Fig. 4), possivelmente devido à detecção dos compostos voláteis presentes na área em uma tentativa de evitá-los (BRITO *et al.*, 2020), isso se dá, possivelmente, pela presença de um complexo de proteínas presentes nas antenas do inseto (LAUGHLIN *et al.*, 2008; TASZAKOWSKI *et al.*, 2023), em machos de *E. heros* há maior expressão dessas proteínas do que em fêmeas (FARIAS *et al.*, 2014).

Essas pistas olfativas são utilizadas pelos insetos para localizar parceiros sexuais e plantas hospedeiras, neste caso, as moléculas voláteis emitidas pelos OEs e compostos majoritários podem ter atuado como disruptor de informações para comunicação química, assim como ocorre para outros fitófagos (LÜRLING; SCHEFFER, 2007), essa interrupção na normalidade da comunicação pode resultar na não identificação do substrato alimentar e do parceiro sexual diminuindo as chances reprodutivas dos insetos (TRICOIRE-LEIGNEL *et al.*, 2012).

Todavia, se os insetos não ficam confusos e chegam até as áreas em que há resíduos de imidacloprido (Fig. 4), não haverá comprometimento do acasalamento, acrescentado ao fato de os machos aumentarem hormeticamente sua aptidão sexual quando estimulado pelo neonicotinoide (HADDI *et al.*, 2016). Assim, além da influência sobre os indivíduos que foram diretamente expostos aos tratamentos, estes podem afetar as gerações subsequentes (REBORA *et al.*, 2021).

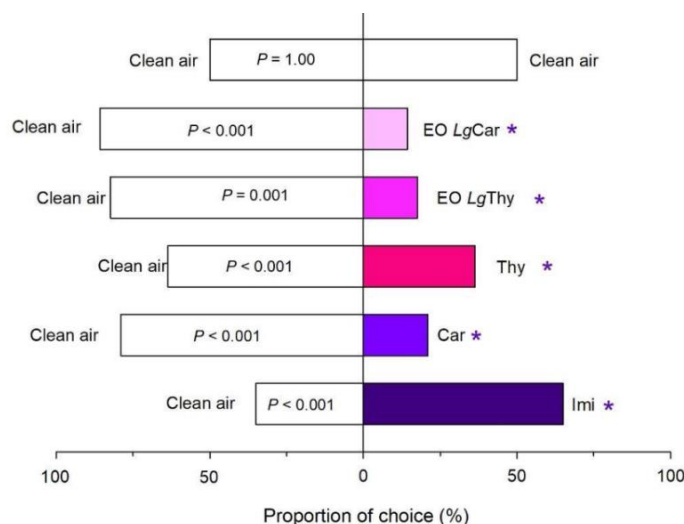


Figura 4. Resposta olfativa de machos de *Euschistus heros* a áreas tratadas com as CL₉₀ dos OEs dos quimiotipos timol (EO LgThy) e carvacrol (EO LgCar) de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários (Thy e Car) e do inseticida imidacloprido. Histogramas seguidos por asterisco indicam que houve diferença na escolhados machos entre os lados de cada braço do olfatômetro de tubo Y durante um período de 600 s, pelo teste exato de Fisher ($P < 0,05$). EO LgThy = OE de *Lippia gracilis* quimiotipo timol; EO LgCar = OE de *Lippia gracilis* quimiotipo carvacrol; Thy = timol; Car = carvacrol e Imi = imidacloprido.

CONCLUSÃO

Desta forma, este estudo evidencia o potencial do OE de *L. gracilis*, principalmente o composto majoritário timol, por seus efeitos na resposta olfativa do percevejo, como uma alternativa promissora para novas moléculas inseticidas no manejo de *E. heros*.

Palavras-chave: efeitos subletais; respostas olfativas; percevejo-marrom-da-soja.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPq, FAPITEC, UFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCO, S.; CARVALHO, L. B.; BIANCO, M. S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e de macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Solanum americanum*. **Planta Daninha**, v. 30, p. 87-95, 2012.

BRITO, F. DE A.; BACCI, L.; SANTANA, A. DA S.; SILVA, J. E. DA; NIZIO, D. A. DE C.; NOGUEIRA, P. C. DE L.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; MELO, C. R.; MELO, J. O. DE; BLANK, A. F. Toxicity and behavioral alterations caused by essential oils of *Croton tetradenius* and their major compounds on *Acromyrmex balzani*. **Crop protection**, v. 137, p. 105259, 2020.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

EUGENIO, F. C.; GROHS, M.; VENANCIO, L. P.; SCHUH, M.; BOTTEGA, E. L.; RUOSO, R.; SCHONS, C.; MALLMANN, C. L.; BADIN, T. L.; FERNANDES, P. Estimation of soybean

yield from machine learning techniques and multispectral RPAS imagery. **Remote Sensing Applications: Society and Environment**, v. 20, p. 100397, 2020.

FARIAS, L. R.; PAULA, D. P.; ZHOU, J. J.; LIU, R.; PAPPAS, G. J.; MORAES, M. C. B.; LAUMANN, R. A.; BORGES, M.; BIRKETT, M. A.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M.; BÁO, S. N. Identification and Expression Profile of Two Putative Odorant-Binding Proteins from the Neotropical Brown Stink Bug, *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 106-114, 2014.

HADDI, K.; MENDES, M. V.; BARCELLOS, M. S.; LINO-NETO, J.; FREITAS, H. L.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Sexual success after stress? Imidacloprid-induced hormesis in males of the neotropical stink bug *Euschistus heros*. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. 1-18, 2016.

HANLEY, M. E.; LAMONT, B. B.; FAIRBANKS, M. M.; RAFFERTY, C. M. Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 8, n. 4, p. 157-178, 2007.

LAUGHLIN, J. D.; HA, T. S.; JONES, D. N. M.; SMITH, D. P. Activation of Pheromone Sensitive Neurons Is Mediated by Conformational Activation of Pheromone-Binding Protein. **Cell**, v. 133, n. 7, p. 1255-1265, 2008.

LÜRLING, M.; SCHEFFER, M. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 7, p. 374-379, 2007.

MELO, C. R.; PICANÇO, M. C.; SANTOS, A. A.; SANTOS, I. B.; PIMENTEL, M. F.; SANTOS, A. C. C.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; CRISTALDO, P. F.; BACCI, L. Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. **Crop Protection**, v. 104, p. 47-51, 2018.

PANIZZI, J. DE B.; PADILHA, A. C.; CAGLIARI, D.; BUENO, F. A.; RAKES, M.; ZOTTI, M. J.; MARTINS, J. F. DA S.; GRÜTZMACHER, A. D. Differential impacts of pesticides on *Euschistus heros* (Hem.: Pentatomidae) and its parasitoid *Telenomus podisi* (Hym.: Platygastridae). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 6544, 2019.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

REBORA, M.; SALERNO, G.; PIERSANTI, S.; GORB, E. V.; GORB, S. N. Attachment devices and the tarsal gland of the bug *Coreus marginatus* (Hemiptera: Coreidae). **Zoomorphology**, v. 140, n. 1, p. 85-102, 2021.

SOMAVILLA, J. C.; REIS, A. C.; GUBIANI, P. D. S.; GODOY, D. N.; STÜRMER, G. R.; BERNARDI, O.; ANDERSON, T. Susceptibility of *Euschistus heros* and *Dichelops furcatus*

(Hemiptera: Pentatomidae) to Selected Insecticides in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 2, p. 924-931, 2020.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; KRAEMER, B.; PANIZZI, A.; HUSCH, P. E.; DELFINO VIEIRA, C. E.; REIS MARTINEZ, C. B.; NEGRÃO LOPES, I. O. Prevalence, damage, management and insecticide resistance of stink bug populations (Hemiptera: Pentatomidae) in commodity crops. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 22, n. 2, p. 99-118, 2020.

TASZAKOWSKI, A.; MASŁOWSKI, A.; DAANE, K. M.; BROŽEK, J. Closer view of antennal sensory organs of two *Leptoglossus species* (Insecta, Hemiptera, Coreidae). **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 617, 2023.

TRICOIRE-LEIGNEL, H.; THANY, S. H.; GADENNE, C.; ANTON, S. Pest insect olfaction in an insecticide-contaminated environment: Info-disruption or hormesis effect. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 58, 2012.

TORSONI, G. B.; DE OLIVEIRA APARECIDO, L. E.; DOS SANTOS, G. M.; CHIQUITTO, A. G.; DA SILVA CABRAL MORAES, J. R.; DE SOUZA ROLIM, G. Soybean yield prediction by machine learning and climate. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 151, n. 3, p. 1709-1725, 2023.

TUELHER, E. S.; DA SILVA, É. H.; RODRIGUES, H. S.; HIROSE, E.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Area-wide spatial survey of the likelihood of insecticide control failure in the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Science**, v. 91, p. 849-859, 2018.

WANG, L. X.; LIN, F. Y.; LI, L. H.; WEI, L. I.; ZHE, Y. A. N.; LUAN, W. J.; QIU, L. J. Genetic diversity center of cultivated soybean (*Glycine max*) in China –New insight and evidence for the diversity center of Chinese cultivated soybean. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 11, p. 2481-2487, 2016.

Efeitos subletais do essencial de *Lippia gracilis* sobre o percevejo-marrom-da-soja

Heloisa Safira Santos Pinheiro (Apresentadora)¹

Swamy Rocha Siqueira Abreu Tavares²

Camilla dos Santos Barbosa³

Virginia Elena Masiulionis⁴

Ana Paula Albano Araújo⁵

Arie Fitzgerald Blank⁶

Leandro Bacci⁷

¹Doutorado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe;

²Pesquisador. Polo Tecnológico Agroalimentar de Arapiraca. Universidade Estadual de Alagoas; ³Discente. Departamento de Engenharia Agrônômica. Universidade Federal de Sergipe; ⁴Pesquisador. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe; ⁵Docente. Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal de Sergipe; ^{6,7}Docente. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe.

INTRODUÇÃO

Efeitos subletais dos inseticidas podem ser tão ou mais importantes que a mortalidade, no entanto poucos estudos têm avaliado estes efeitos sobre *Euschistus heros*. Já foram relatados casos de aumento na frequência de acasalamento e atividade locomotora quando adultos de *E. heros* são expostos a inseticidas (CASTELLANOS *et al.*, 2019; TUELHER *et al.*, 2017). Surto populacionais de *E. heros* têm sido associados às alterações no comportamento de acasalamento e ao aumento da aptidão biológica em populações sob doses/concentrações subletais de inseticidas, efeito denominado hormese (MARGUS *et al.*, 2019; TUELHER *et al.*, 2017). Desta forma, o manejo de *E. heros* pode ser otimizado por meio da busca de novos princípios ativos, assim como da avaliação dos efeitos subletais destes compostos.

Os óleos essenciais de plantas (OEs) e seus compostos majoritários têm sido apontados como uma promissora ferramenta de controle, devido às suas propriedades biológicas. Além do seu efeito tóxico, OEs de plantas e seus compostos majoritários podem ocasionar efeitos subletais positivos ou negativos em relação ao desenvolvimento, reprodução, comportamento ou sobrevivência dos insetos. Tais efeitos podem influenciar diretamente a flutuação populacional de insetos praga (GIATROPOULOS *et al.*, 2022; KUCUK; KAPLAN, 2023).

Diante disso, no presente trabalho avaliamos a toxicidade e os efeitos subletais de dois quimiotipos do OE de *Lippia gracilis* Schauer e de seus compostos majoritários (timol e carvacrol) em comparação com o inseticida organossintético imidacloprido sobre o percevejo-marrom, *E. heros*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos compostos e análises químicas

Os OEs dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* foram obtidos dos acessos LgThy e LgCar, mantidos no banco de germoplasma no Campus Rural da UFS, São Cristóvão, SE, Brasil (10°55 S, 37°11' W, 18 m de altitude).

A extração do OE foi realizada de acordo com Tavares (2023) e as análises químicas para identificação e quantificação dos compostos foram realizadas de acordo com Cruz *et al.* (2013). Os compostos majoritários timol e carvacrol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA) e o inseticida organossintético imidacloprido foi adquirido comercialmente.

Concentração-mortalidade

Para obtenção das curvas de concentração-mortalidade, ninfas de terceiro ínstar de *E. heros* recém emergidas obtidas da empresa Pragas.com (Rua Princesa Isabel, Jardim Pacaembu, Piracicaba, SP) foram pesadas individualmente em balança de precisão para manter um padrão no tamanho ($0,004301 \pm 0,000456$ g) utilizado nos bioensaios. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 repetições. Cada repetição foi composta por cinco ninfas de terceiro ínstar, totalizando 60 ninfas/concentração/tratamento. A unidade experimental consistiu em uma placa de Petri (6 x 1,5 cm), com a borda interna coberta por uma fina camada de vaselina atóxica e o fundo forrado com disco de papel filtro. A vaselina foi empregada para evitar a subida das ninfas e mantê-las em contato com o tratamento, e o disco de papel filtro foi utilizado como substrato para receber os tratamentos.

As curvas foram estabelecidas utilizando inicialmente quatro concentrações (1, 5, 10 e 20 mg do composto por mL de solução) de cada tratamento. Em seguida, concentrações intermediárias (de cinco a oito) foram utilizadas para traçar as curvas de concentração-mortalidade. O papel filtro foi tratado com 200 µL de cada combinação tratamento x concentração com o uso de micropipeta de 100 a 1000 µL. No controle foi aplicado somente acetona. Após a aplicação dos tratamentos, as placas contendo o papel filtro tratados foram mantidas por 5 min em câmara de exaustão para permitir a evaporação do solvente. Em seguida, as ninfas de terceiro ínstar foram transferidas para cada uma das placas, as quais foram cobertas com tecido do tipo organza, a fim de impedir a fuga e facilitar a troca gasosa dos insetos. Testes preliminares indicaram que a acetona e a vaselina não afetaram a sobrevivência ou comportamento das ninfas de *E. heros*.

A mortalidade das ninfas foi avaliada 72h após a montagem do experimento. Foram considerados mortos os insetos que não apresentaram movimentação após o estímulo de um pincel.

Irritabilidade e caminhamento

Os bioensaios foram conduzidos segundo metodologia adaptada de Lima *et al.* (2020), em delineamento inteiramente casualizado, com 80 repetições por tratamento. Cada unidade experimental consistiu em uma placa de Petri forrada com papel filtro contendo uma ninfa de terceiro ínstar de *E. heros*.

Para avaliar o comportamento de irritabilidade, o papel filtro foi cortado simetricamente ao meio e dividido em duas áreas que foram tratadas separadamente (metade tratada e não-tratada). Na metade tratada foi aplicado 100 µL das CL₃₀ dos tratamentos determinadas nos bioensaios de concentração-mortalidade e na outra metade 100 µL de acetona. Para avaliar o comportamento de caminhamento, o papel filtro foi totalmente tratado com 200 µL das CL₃₀ e no controle foi aplicado somente acetona. No bioensaio de irritabilidade, as metades foram afixadas com fita dupla-face no fundo das placas. Os papéis filtro foram secos por 5 min em câmara de exaustão e depois acondicionados nas placas de Petri.

O movimento dos indivíduos foi gravado por 10 min, utilizando uma câmera de vídeo, equipada com lente Spacecom acoplada a um computador. Para avaliar o movimento, foi utilizado o software Ethovision XT (versão 8.5; Noldus Integration System, Sterling, VA). Os dados foram analisados utilizando o programa Studio 9. No bioensaio de irritabilidade foi avaliado o tempo de permanência dos insetos em cada lado da placa. Já no bioensaio de caminhamento foram obtidos

os dados de distância percorrida (mm), velocidade (mm/s), meandro ($^{\circ}$ /mm) e velocidade angular ($^{\circ}$ /s).

Análises estatísticas

Os dados de mortalidade obtidos com os experimentos foram submetidos à análise de Probit para a determinação das curvas de concentração-resposta para cada tratamento utilizando o procedimento PROC PROBIT do SAS TM (SAS Institute, 2008).

Os dados de comportamento foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro Wilk ($P > 0,05$) e Brown-Forsythe ($P > 0,05$) para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade da variância, respectivamente. Quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade de variância eles foram submetidos à análise de variância paramétrica (ANAVA) e quando não atenderam aos pressupostos da ANAVA, eles foram submetidos à análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Os dados de irritabilidade foram analisados a *posteriori* pelo teste de Wilcoxon a $P < 0,05$. Já os dados de caminhamento foram analisados a *posteriori* pelo método de Dunnett's ou método de comparação múltipla de Dunn's a $P < 0,05$, para verificar diferenças significativas entre os tratamentos com o controle, para análises paramétricas ou não-paramétricas, respectivamente. Todas as análises dos dados comportamentais foram feitas utilizando o programa SigmaPlot, versão 15.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Toxicidade

Os OEs dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* e seus compostos majoritários foram tóxicos para ninfas de terceiro ínstar de *E. heros*. O bioinseticida timol ($CL_{30} = 0,071$; $CL_{50} = 0,20$ e $CL_{90} = 2,82$ mg/mL) foi igualmente tóxico ao controle positivo (imidacloprido) em todas as concentrações letais. Na concentração letal necessária para matar 30% da população, a toxicidade do OE do quimiotipo timol de *L. gracilis* foi similar à toxicidade de timol e imidacloprido. Os valores de CL_{50} obtidos para os OEs dos quimiotipos timol e carvacrol de *L. gracilis* e carvacrol isolado foram superiores à CL_{50} do timol e não diferiram entre si (Fig. 1).

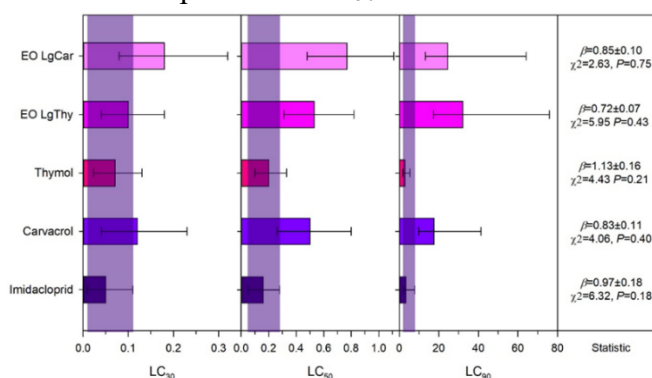


Fig. 1. Toxicidade dos OEs dos quimiotipos timol (EO LgThy) e carvacrol (EO LgCar) de *Lippia gracilis*, seus compostos majoritários isolados e do inseticida imidacloprido sobre ninfas de terceiro ínstar de *Euschistus heros*. Histogramas representam as concentrações letais necessárias para matar 30, 50 e 90 % das populações e as linhas de erro os respectivos intervalos de confiança a 95%. A área sombreada indica a faixa do intervalo de confiança do controle positivo (imidacloprido). β = inclinação da curva $\pm$ erro padrão.

Irritabilidade

Em todos os casos, os bioinseticidas causaram irritabilidade. Os insetos ficaram, em média, somente 31; 29; 23 e 29% do tempo no lado tratado com os OEs dos quimiotipos carvacrol e timol

e, seus majoritários, timol e carvacrol, respectivamente. O inseticida imidacloprido não causou irritabilidade nos insetos ($P = 0,264$) (Fig. 2).

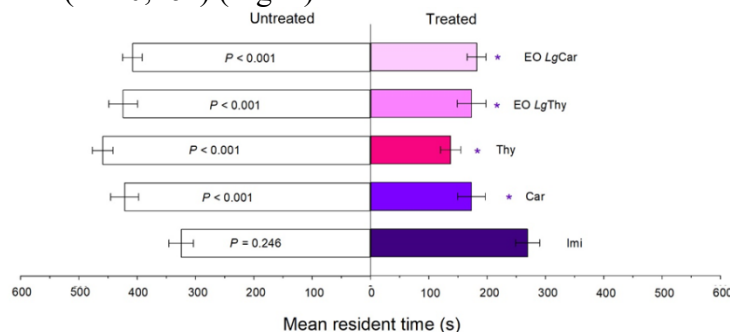


Fig. 2. Tempo médio de permanência de ninfas de terceiro instar de *Euschistus heros* em cada lado da arena parcialmente tratada com as CL₃₀ dos OEs dos quimiotipos timol (EO LgThy) e carvacrol (EO LgCar) de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários (Thy e Car) e do inseticida imidacloprido. Histogramas seguidos por asterisco indicam que houve diferença no tempo de permanência das ninfas entre o lado tratado e o não tratado por um período de 600 s, pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). EO LgThy = óleo essencial de *Lippia gracilis* quimiotipo timol; EO LgCar = óleo essencial de *Lippia gracilis* quimiotipo carvacrol; Thy = timol; Car = carvacrol e Imi = imidacloprido.

Caminhamento

O bioensaio para verificar alterações no comportamento de caminhada de ninfas de terceiro instar de *E. heros* causado pelos compostos foi realizado em arenas totalmente tratadas. De forma geral, o comportamento de caminhada de ninfas foi alterado pelos bioinseticidas e não afetado pelo imidacloprido (Fig. 3). A velocidade ($H = 55,79$; g.l. = 5; $P \leq 0,001$) e o deslocamento ($H = 57,51$; g.l. = 5; $P \leq 0,001$) foram reduzidos, à exceção da velocidade de ninfas expostas ao carvacrol isoladamente (Fig. 3A, C).

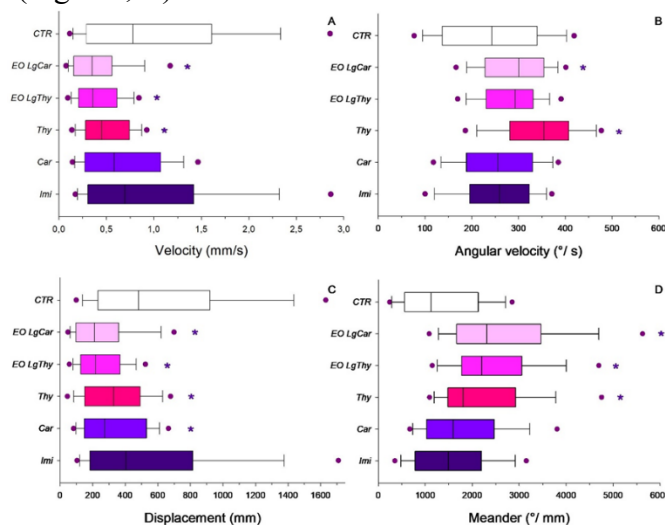


Fig. 3. Comportamento de deslocamento de ninfas de terceiro instar de *Euschistus heros* expostas por 600 s às CL₃₀ dos OEs dos quimiotipos timol (EO LgThy) e carvacrol (EO LgCar) de *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários (Thy e Car) e do inseticida imidacloprido. Os círculos no gráfico representam 5° e 95° percentis. As linhas de erro representam os 10° e 90° percentis e as bordas da caixa são os 25° e 75° percentis. As médias marcadas com asterisco diferem do controle pelo método de comparação múltipla paramétrica de Dunnett's ou não-paramétrica de Dunn's em $P < 0,05$. CRT = controle. EO LgThy = óleo essencial de *Lippia gracilis* quimiotipo timol; EO LgCar = óleo essencial de *Lippia gracilis* quimiotipo carvacrol; Thy = timol; Car = carvacrol e Imi = imidacloprido.

O OE do quimiotipo carvacrol de *L. gracilis* e o timol ocasionaram maiores velocidades angulares nos insetos ($H = 56,66$; g.l. = 5; $P \leq 0,001$) (Fig. 3B). Da mesma forma, foi observado o aumento de meandros ($H = 78,63$; g.l. = 5; $P \leq 0,001$) em ninfas expostas a estes compostos e ao OE do quimiotipo timol de *L. gracilis* (Fig. 3D).

Neste estudo, avaliamos os efeitos letais e subletais dos OEs de *L. gracilis* e seus compostos majoritários timol e carvacrol sobre o percevejo fitófago *E. heros*. Embora todos os OEs e seus majoritários tenham apresentado efeito tóxico sobre indivíduos do percevejo, o timol se destacou por exibir toxicidade comparável à observada para o inseticida organossintético (Fig. 1).

Além da toxicidade, os bioinseticidas causaram alterações comportamentais nos percevejos, um efeito que não foi observado para o neonicotinoide. Além dos efeitos neurotóxicos que podem estimular ou reduzir a mobilidade dos insetos, afetando assim seus padrões de movimento (DANTAS *et al.*, 2023), neste estudo a redução da capacidade de locomoção de *E. heros* tratados com os bioinseticidas pode estar relacionada ao aumento no número de autolimpezas do aparelho bucal. O aumento dessa atividade pode ser correlacionado à irritação e à percepção desses compostos como substâncias estranhas.

O imidacloprido, embora atue no sistema nervoso do inseto causando hiperexcitação (SPARKS; NAUEN, 2015), não alterou o padrão de caminamento do percevejo (Fig. 3), um resultado que já foi observado em Pentatomidae como o *Podisus nigispinus* (LIMA *et al.*, 2020), a ausência de efeito comportamental pode estar relacionada à resistência metabólica do *E. heros* ao inseticida (AZEVEDO *et al.*, 2022; CASTELLANOS *et al.*, 2019).

Os OEs têm efeito repelente e de irritabilidade reconhecidos (LEE, 2018), ou seja, formam uma barreira de vapor que visa impedir o inseto de entrar em contato com a superfície contaminada (NERIO *et al.*, 2010). Isso se deve, em grande parte, a sua composição química, com a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, uma vez que os majoritários isolados também demonstraram as mesmas propriedades repelentes (LIMA *et al.*, 2020). Por serem insetos generalistas, *E. heros* captam mais informações voláteis, com isso acabam tomando decisões mais lentas e menos precisas que fitófagos especialistas (STECK; SNELL-ROOD, 2018), provavelmente essa condição fez com que as ninfas entrassem em contato com o substrato contaminado e somente depois decidissem por estar no lado não tratado (Fig. 2).

De maneira geral, acredita-se que os percevejos possuem mecanismos comportamentais capazes de reduzir o contato com áreas contaminadas com xenobióticos (ROMERO *et al.*, 2009), isso se deve à presença de proteínas olfativas que permitem o recolhimento de pistas olfativas, possibilitando identificar se há na área tóxicos (TASZAKOWSKI *et al.*, 2023). Substratos contaminados correspondem, para o inseto, o custo de energia, de tempo e nutricionais para sua desintoxicação. Normalmente, resíduos diminuem o valor nutritivo e tendem a ser evitados, e se não houver outra possibilidade serão consumidos (SCHOWALTER, 2011), ocasionando intoxicação e consequentemente mortalidade.

CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou o potencial de toxicidade e os efeitos subletais dos OEs de *L. gracilis* e seus compostos majoritários timol e carvacrol sobre *E. heros*. Além do efeito tóxico promissor do timol (semelhante ao do organossintético), esse composto também causou irritação e com consequente redução na capacidade de locomoção. Portanto, esses bioinseticidas, especialmente o timol, podem ser considerados como alternativas para novas moléculas de inseticidas, reduzindo os efeitos indesejados do manejo de *E. heros*.

Palavras-chave: ecotoxicologia; bioinseticidas; comportamento; *Euschistus heros*.

AGRADECIMENTOS

CAPES, CNPQ, FAPITEC, UFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, K. E. X.; CUNHA, G. R.; MANTILLA-AFANADOR, J. G.; FERRAZZA, L. B.; CASTELLANOS, N. L.; HADDI, K.; LIMA, G. D. A.; OLIVEIRA, E. E. Sex-dependent body mass and respiratory responses on *Euschistus heros* individuals resistant to imidacloprid. **Agricultural and Forest Entomology**, p. 1-9, 2022.
- CASTELLANOS, N. L.; HADDI, K.; CARVALHO, G. A.; PAULO, P. D. DE; HIROSE, E.; GUEDES, R. N. C.; SMAGGHE, G.; OLIVEIRA, E. E. Imidacloprid resistance in the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*: selection and fitness costs. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 2, p. 847–860, 2019.
- CRUZ, E. M. DE O.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, D. DE A.; ARAUJO, S. A. DE; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; BACCI, L.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. DE H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 198–202, 2013.
- DANTAS, J. O.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARAÚJO, A. P. A.; SILVA, J. E.; BRITO, T. B.; ANDRADE, V. S.; PINHEIRO, H. S. S.; TAVARES, S. R. S. A.; BLANK, A. F.; BACCI, L. Formicidal Potential of Thymol Derivatives: Adverse Effects on the Survival and Behavior of *Acromyrmex balzani*. **Agriculture**, v. 13, n. 7, p. 1–17, 2023.
- GIATROPOULOS, A.; KARAMAOUNA, F.; AMPATZI, A.; PAPACHRISTOS, D.; MICHAELAKIS, A. Sublethal effects of oregano essential oil and its major compound carvacrol on biological parameters of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 242, 108392, 2022.
- KUCUK, M. E.; KAPLAN, A. The effect of thymol on the development of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 320–327, 2023.
- LEE, M. Y. Essential Oils as Repellents against Arthropods. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2018.
- LIMA, A. P. S.; SANTANA, E. D. R.; SANTOS, A. C. C.; SILVA, J. E.; RIBEIRO, G. T.; PINHEIRO, A. M.; SANTOS, Í. T. B. F.; BLANK, A. F.; ARAÚJO, A. P. A.; BACCI, L. Insecticide activity of botanical compounds against *Spodoptera frugiperda* and selectivity to the predatory bug *Podisus nigrispinus*. **Crop Protection**, v. 136, p. 1–7, 2020.
- MARGUS, A.; PIIRONEN, S.; LEHMANN, P.; TIKKA, S.; KARVANEN, J.; LINDSTRÖM, L. Sublethal Pyrethroid Insecticide Exposure Carries Positive Fitness Effects Over Generations in a Pest Insect. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- NERIO, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, 2010.

ROMERO, A.; POTTER, M. F.; HAYNES, K. F. Behavioral Responses of the Bed Bug to Insecticide Residues. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 1, p. 51-57, 2009.

SCHOWALTER, T. D. **Insect ecology: an ecosystem approach**. Academic. 2011.

STECK, M. K.; SNELL-ROOD, E. C. Specialization and accuracy of host-searching butterflies in complex and simple environments. **Behavioral Ecology**, v. 29, n. 2, p. 486-495, 2018.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.

TASZAKOWSKI, A.; MASŁOWSKI, A.; DAANE, K. M.; BROŽEK, J. Closer view of antennal sensory organs of two *Leptoglossus species* (Insecta, Hemiptera, Coreidae). **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2023.

TAVARES, S. R. S. A. *Lippia gracilis* e seus compostos majoritários: Efeitos na sobrevivência, biologia e comportamento de *Euschistus heros*. 86f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2023.

TUELHER, E. S.; SILVA, É. H. DA; FREITAS, H. L.; NAMORATO, F. A.; SERRÃO, J. E.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E. Chlorantraniliprole-mediated toxicity and changes in sexual fitness of the neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 1, p. 397–405, 2017.

Fungos entomopatogênicos da região semiárida do estado de Sergipe: isolamento, caracterização e aplicação no controle biológico de pragas agrícolas

Tárcio Souza Santos (apresentador)^{1,3}

Marcelo da Costa Mendonça^{2,3}

¹Pós doutorado, Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe;

²Docente, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Tiradentes (UNIT); ³Pesquisador, Laboratório de Controle Biotecnológico de Pragas (LCBiotec), Empresa de Desenvolvimento Agropecuário do Estado de Sergipe (EMDAGRO).

INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos são microrganismos estabelecidos e utilizados como biocontroladores de artrópodes invertebrados, em especial, de insetos-pragas em cultivos agrícolas (SHARMA et al., 2023). Esses microrganismos apresentam variações intra e interespecíficas em sua eficácia inseticida, produção de metabólitos secundários e tolerância a fatores abióticos, como temperatura e radiação UV (LICONA-JUÁREZ et al., 2023). Acredita-se que as interações ocorrentes entre os fungos entomopatogênicos e insetos hospedeiros são mediadas pelas condições climáticas incidentes no meio ambiente, podendo, a longo prazo, modular a fisiologia desses microrganismos causando diferenciações metabólicas (DIAS et al., 2021). Com isso, a prospecção de novos fungos entomopatogênicos, em regiões com temperaturas e taxa de radiação solar elevadas pode ser promissora para a obtenção de fungos entomopatogênicos mais tolerantes a esses fatores abióticos (QUESADA-MORAGA et al., 2023).

Nesse sentido, a região semiárida do Brasil, em especial, do estado de Sergipe, apresenta-se como local promissor para a busca por novos fungos entomopatogênicos, pois essa região tem como principais características a escassez de chuvas, baixa umidade e altos índices de temperatura e radiação solar (FARIAS, 2013; IBGE, 2024). Além disso, estudos anteriores indicam que a região semiárida do Brasil abriga grande diversidade de espécies de vegetais, animais e microrganismos com potencial biotecnológico, entretanto mais estudos são necessários a fim de revelar o potencial das espécies presentes nesse ambiente (SILVA et al., 2019; SILVA e SIQUEIRA, 2023). Com isso, o presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar fungos entomopatogênicos da região semiárida do estado de Sergipe/Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de solo

Amostras de solo foram coletadas em 10 municípios localizados na região semiárida do estado de Sergipe (Frei Paulo, Carira, Pinhão, Simão Dias, Canindé do São Francisco, Poço Redondo, Monte Alegre, Nossa Senhora da Glória, Porto da Folha e Itabi), com no mínimo um e no máximo três pontos de coletas distintos em cada município, totalizando 24 pontos de coleta. Para a realização da coleta de solo, a vegetação da superfície do solo foi removida e o solo foi coletado a uma profundidade de 20 cm, com auxílio de um trado manual. De cada ponto amostral

foi coletado aproximadamente 500 g de solo, que foi acondicionado em saco plástico estéril e transportado para o laboratório, onde foram armazenadas a 4 °C até seu processamento.

Isolamento de fungos

Inicialmente o solo coletado foi seco em temperatura ambiente, para reduzir a presença de nematóides. Em seguida, o solo foi umedecido com água destilada estéril e nele foram adicionadas larvas de *Tenebrio molitor* Fabricius, 1798 (Coleoptera: Tenebrionidae), aproximadamente 10 larvas para 100 g de solo (método inseto-isca - usado para isolamento de fungos entomopatogênicos). Os insetos foram mantidos em contato com o solo umedecido, em sala climatizada (25°C) por 10 dias, para que caso houvesse a presença de esporos de fungos entomopatogênicos no solo, estes pudessem infectar os insetos. Os insetos foram avaliados diariamente e as larvas mortas foram recolhidas, lavadas em álcool etílico (70%) e água destilada estéril, e transferidas para placas de Petri estéreis (35x10mm) forradas com papel de filtro umedecido, para favorecer a crescimento do fungo no corpo do inseto. Em seguida, o fungo crescido na superfície das larvas mortas de *T. molitor*, foram repicados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) suplementado com Cloranfenicol (0,25 g/L) e Tetraciclina (0,20 g/L). Os fungos obtidos foram repicados sucessivamente em meio de cultura sólido até a obtenção de culturas puras.

Avaliação de patogenicidade sobre pragas agrícolas

Os isolados de fungos obtidos foram submetidos a avaliação do seu potencial entomopatogênico sobre os seguintes insetos-pragas agrícolas: *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Plutellidae), popularmente conhecido como traça-das-crucíferas, *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido como moleque-da-bananeira, e *Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1915 (Hemiptera: Aleyrodidae), conhecido como mosca-negra-dos-citros.

Lagartas de *P. xylostella* (2º instar) foram transferidas para discos de folhas de couve manteiga (*Brassica oleracea* Linnaeus 1753), com 8 cm de diâmetro, previamente tratados com suspensão de conídios aéreos dos fungos entomopatogênicos, produzida com solução de Tween 80® 0,05% e padronizada para concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹. Os discos de couve contendo as lagartas de *P. xylostella* foram acondicionados em placas de Petri, e mantidas em sala climatizada (25±2°C, UR 60±10%, fotofase 12h). O experimento foi avaliado diariamente por 7 dias e novos discos de couve (não tratados) foram dispostos para as lagartas no terceiro e sexto dia após o início do experimento. As lagartas mortas foram transferidas para câmara úmida (placa de Petri contendo papel filtro umedecido) para confirmar a morte do inseto pela ação do fungo (NOAH et al., 2022). O experimento foi conduzido com 6 repetições por tratamento, tendo 20 lagartas em cada repetição.

Insetos adultos de *C. sordidus* foram submersos nas suspensões de conídios aéreos dos isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^8 conídios.mL⁻¹) por 5 segundos, e, posteriormente, transferidos para potes plásticos com a tampa perfurada (60x100mm), e alimentados com pedaço de pseudocaule de bananeira. Os insetos foram avaliados diariamente por 24 dias e a alimentação foi substituída por um novo pedaço de pseudocaule a cada 3 dias. Os potes contendo os insetos foram mantidos em sala climatizada (25±2°C, UR 60±10% e fotofase 12h) até o final da avaliação. Os insetos mortos foram desinfetados com álcool etílico (70%), em seguida, lavados com água destilada e transferidos individualmente para câmara úmida, para confirmação da morte pelo fungo. O experimento foi conduzido com 10 repetições por tratamento, tendo 5 insetos em cada repetição.

Folhas de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) contendo ninfas de *A. woglumi* foram coletadas em propriedade rural no município de Estância/Sergipe. Em laboratório, as folhas foram avaliadas em estereoscópio (x40) e apenas as ninfas de 2º instar do inseto foram mantidas nas folhas. Em seguida, as folhas foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), e enxaguadas em água destilada. As folhas foram então pulverizadas (pulverizador do tipo airbrush 10 psi) com suspensão de conídios aéreos dos isolados dos fungos (1 mL de suspensão na concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ por folha). As folhas tratadas tiveram seu pecíolo envolto com algodão umedecido e foram transferidas para caixas do tipo Gerbox, seladas com filme plástico, e acondicionadas em sala climatizada (25±2°C, UR 60±10% e fotófase 12h). A avaliação foi realizada após 6 dias da aplicação dos fungos, observando-se a presença de ninfas infectadas ou não infectadas em estereoscópio (x40). O experimento foi conduzido com 5 repetições por tratamento, tendo 20 ninfas em cada repetição.

Identificação morfológica

Os isolados de fungos com ação entomopatogênica confirmada na avaliação de patogenicidade foram avaliados em relação as suas características morfológicas para identificação a nível de gênero. Para isso, inicialmente foram observadas as características de crescimento em meio de cultura sólido BDA, como cor e textura das colônias. Em seguida, lâminas foram preparadas com fragmentos das colônias crescidas no meio sólido e coradas com corante Azul de metileno para observação da morfologia dos conídios e conidióforos dos fungos, em microscopia óptica, e comparação com chave de identificação (HUMBER, 2012).

Análise estatística

A mortalidade acumulada dos insetos tratados com as suspensões fúngicas de conídios aéreos dos diferentes isolados de fungos foi corrigida pela fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925) e submetida a Análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software SPSS versão 23.0 (IBM Corp., 2015). Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. (GRAPHPAD SOFTWARE, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e avaliação de patogenicidade sobre pragas agrícolas

12 isolados de fungos foram obtidos através do isolamento realizado nas amostras de solo coletadas na região semiárida do estado de Sergipe. Durante a avaliação de patogenicidade foi observada diferenças significativas entre os fungos e a sua capacidade de promover a mortalidade dos insetos tratados com suspensões de conídios aéreos. Para as lagartas de 2º instar de *P. xylostella*, 6 isolados dos fungos (19, 18, 23, 1 e 12) promoveram elevadas taxas de mortalidade nos insetos tratados, variando entre 80,79 e 93,91%. Os demais isolados testados promoveram mortalidade inferior a 13% (Figura 1A).

A avaliação da patogenicidade de fungos sobre *C. sordidus* indica que os isolados obtidos não apresentaram significativo potencial patogênico sobre esse inseto, sendo o isolado 19 o fungo que promoveu a maior mortalidade nos insetos tratados ($\cong 30\%$). Os demais isolados fúngicos testados promoveram mortalidade em menos de 10% dos insetos tratados (Figura 1B).

Dentre os fungos prospectados foi possível observar que cinco isolados (17, 1, 18, 12 e 19) apresentaram elevada patogenicidade sobre *A. woglumi*, com a mortalidade dos insetos tratados variando entre 83,85 e 95,36%. O isolado 23 promoveu a mortalidade de 26,94% dos insetos tratados com seus conídios e os demais isolados de fungos testados não promoveram mortalidade em *A. woglumi* (Figura 1C).

A variação observada na patogenicidade de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos pode estar relacionada com a capacidade do fungo de produzir diferentes metabólitos com ação inseticida, como enzimas ou micotoxinas, ou com a capacidade de absorver nutrientes do corpo dos insetos (GOTTI et al 2023; MEJÍA et al., 2024). Sendo assim, a observação da patogenicidade dos fungos isolados durante a prospecção de fungos entomopatogênicos é uma etapa que assegura a obtenção de isolados com eficiência comprovada para utilização no controle de pragas agrícolas. Além disso, essa etapa pode evidenciar a existência de especificidade de ação nos isolados coletados, como pode ser observado em nosso resultado para os isolados 1, 12, 17, 18 e 19, que apresentaram elevada patogenicidade sobre *P. xylostella* e *A. woglumi*, porém baixa efetividade sobre *C. sordidus*. Isso também foi observado para o isolado 23, que apresentou elevada patogenicidade sobre *P. xylostella* e baixa ou nenhuma efetividade sobre *A. woglumi* e *C. sordidus*, respectivamente.

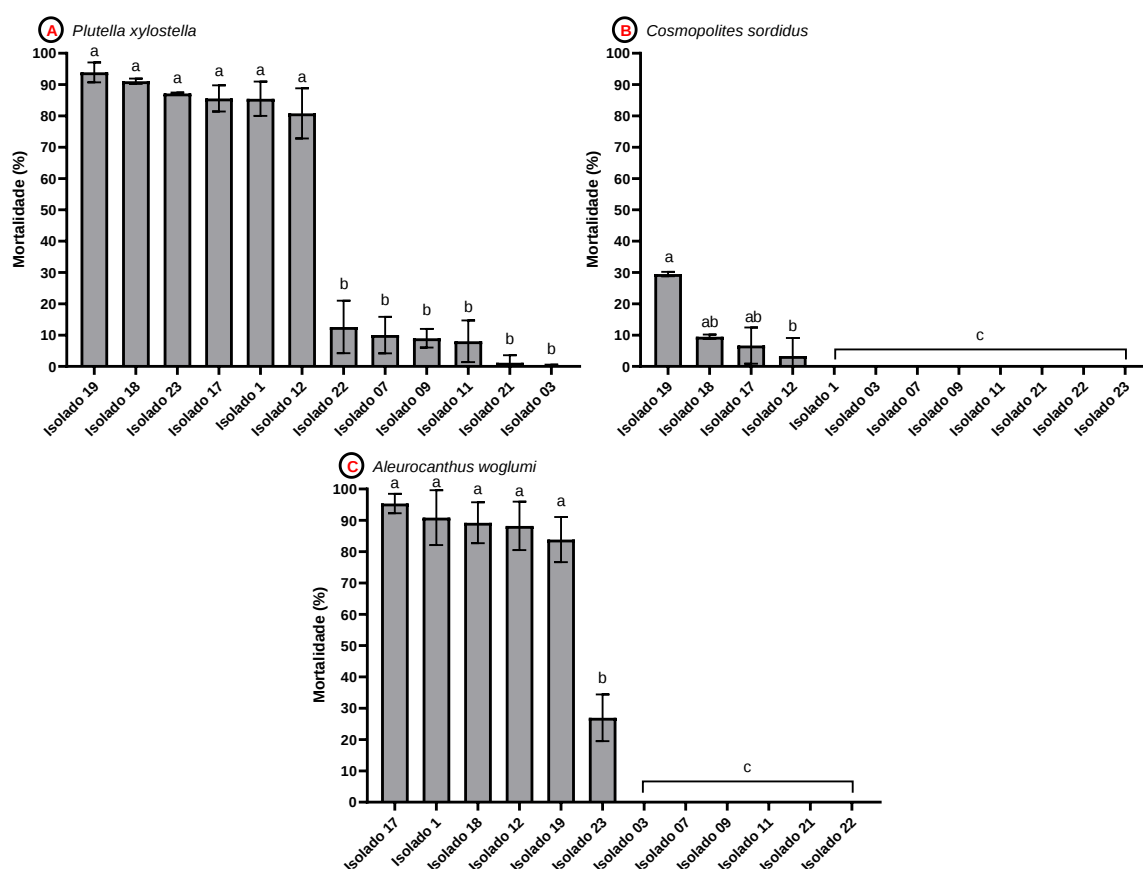


Figura 1. Patogenicidade de conídios aéreos de fungos prospectados na região semiárida do estado de Sergipe sobre pragas agrícolas: A) *Plutella xylostella*; B) *Cosmopolites sordidus*; C) *Aleurocanthus woglumi*.

Identificação morfológica

Os 6 isolados de fungos com ação entomopatogênica confirmada (isolado 1, 12, 17, 18, 19 e 23) foram caracterizados morfolologicamente. Os isolados 12, 17, 18, 19 e 23 apresentaram características morfológicas semelhantes, tendo colônias com coloração branca e textura aveludada ao ser crescido em meio BDA, pela observação macroscópica, e conídios hialinos com morfologia circular, quando observados em microscópio óptico (400x) (Figura 2A e B). Já o isolado 1

apresentou colônias com coloração inicialmente branca, tornando-se verdes com o passar do tempo de incubação, ao ser crescido em meio BDA. Além disso, também foi observada a presença de hifas aéreas nas colônias. Em microscópio óptico (400x), foi possível observar que o isolado 1 apresenta conídios aéreos de coloração verde e em forma de bastonete (Figura 2C e D).

Ao comparar as características observadas com a chave de identificação (HUMBER, 2012) os isolados 12, 17, 18, 19 e 23 foram identificados como pertencentes ao gênero *Beauveria* sp. e o isolado 1 foi identificado como pertencente ao gênero *Metarhizium* sp.

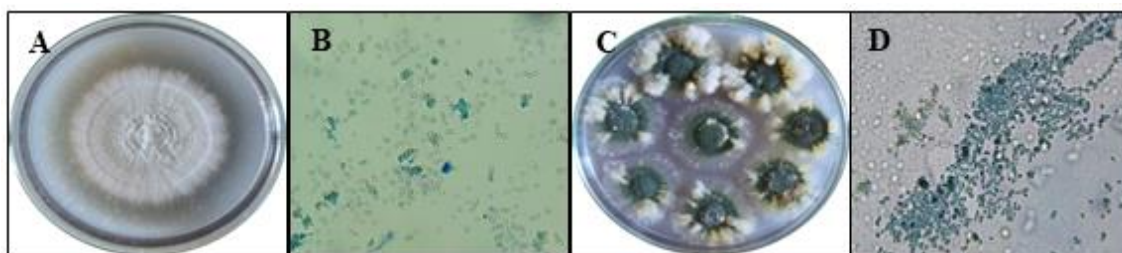


Figura 2: Características morfológicas dos fungos prospectados na região semiárida do estado de Sergipe. A) Colônia de fungo do gênero *Beauveria* (isolado 17); B) Conídios aéreos de fungo do gênero *Beauveria* (isolado 17); C) Colônia de fungo do gênero *Metarhizium* (isolado 1); D) Conídios aéreos de fungo do gênero *Metarhizium* (isolado 1).

CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível concluir que fungos entomopatogênicos ocorrem naturalmente em solos da região semiárida do estado de Sergipe. Além disso, dentre os isolados prospectados, 6 isolados (isolado 1, 12, 17, 18, 19 e 23), pertencentes aos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, apresentam elevada patogenicidade sobre *P. xylostella* e *A. woglumi*, sendo isolados de fungos entomopatogênicos com elevado potencial para uso no controle de pragas agrícolas.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos, prospecção microbiana, controle biológico de pragas agrícolas.

AGRADECIMENTOS

EMDAGRO, CNPq, CAPES, FAPITEC, UFS e PPGAGRI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v. 18, p. 265–267, 1925.
- BARBOSA, L. F. S.; SANTOS, A. C. D. S.; DINIZ, A. G.; ALVES, A. L.; DE OLIVEIRA, A. F. M.; DA COSTA, A. F.; TIAGO, P. V. Entomopathogenicity of fungi in combination with *Ricinus communis* extract for the control of *Aleurocanthus woglumi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 169, p. 838-847, 2021.
- DIAS, L. P.; SOUZA, R. K. F.; PUPIN, B.; RANGEL, D. E. N. Conidiation under illumination enhances conidial tolerance of insect-pathogenic fungi to environmental stresses. *Fungal Biology*, v. 125, ed. 11, p. 891-904, 2021. Doi:10.1016/j.funbio.2021.06.003.
- FARIAS, M. C. V. Apresentando Sergipe. In: PRATA, A. P. N.; AMARAL, M. C. E.; FARIAS, M. C. V.; ALVES, M. V. Flora de Sergipe. Editora Triunfo, v.1, p. 19-34, 2013.

GONZÁLEZ, D. N.; ÁVALOS CHÁVEZ, M. A.; LEZAMA GUTIÉRREZ, R.; CUPUL, W. C.; OCHOA, J. M.; VELASCO, E. G. Suitability of *Cordyceps bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for biological control of *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) in an organic Mexican banana plantation: laboratory and field trials. **Journal of Plant Disease Protection**, v. 125, p. 73–81, 2018.

GOTTI I. A.; MOREIRA, C. C.; DELALIBERA, I.; DE FINE LICHT, H. H. Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 1594, 2023.

GRAPHPAD SOFTWARE. GraphPad Prism version 8.01 for Windows. La Jolla, CA, USA, 2018.

HUMBER, R. A. Chapter VI – Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey, L. A. (Eds). Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition), Academic Press, p. 151-187, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama – Sergipe. 2024. Acessado em 21 de setembro de 2024. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/se/panorama>>.

IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY, 2015.

LICONA-JUÁREZ, K. C.; ANDRADE, E. P.; MEDINA, H. R.; OLIVEIRA, J. N. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RANGEL, D. E. N. Tolerance to UV-B radiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi*. Fungal Biology, 2023. Doi:10.1016/j.funbio.2023.04.004.

MEJÍA, C.; ROCHA, J.; SANABRIA, J.; GÓMEZ-ÁLVAREZ, M. I.; QUIROGA-CUBIDES, G. Performance of *Metarhizium rileyi* Nm017: nutritional supplementation to improve production and quality conidia. **3 Biotech**, v. 14, n. 3, p. 89, 2024.

QUESADA-MORAGA, E.; GONZÁLEZ-MAS, N.; YOUSEF-YOUSEF, M.; GARRIDO-JURADO, I.; FERNÁNDEZ-BRAVO, M. Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. **Journal of Pest Science**, 2023. Doi:10.1007/s10340-023-01622-8.

REYES-HARO, L.; PRINCE, G.; GRANJA-TRAVEZ, R. S.; CHANDLER, D. Phenotypic and genotypic characterization of fifty strains of *Beauveria spp.* (Ascomycota, Cordycipitaceae) fungal entomopathogens from diverse geographic origins against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Pest Management Science**, 2024.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; YADAV, P. K. Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 9, n. 2180857, p. 1-21, 2023. Doi: 10.1080/23311932.2023.2180857.

SILVA, A. I. A.; SIQUEIRA, C. G. Diversidade enzimática de fungos associados a plantas da Caatinga. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 11, ed. 1, p. 1–9, 2023.
Doi:10.20873/jbb.uft.cemaf.v11n1.silva

SILVA, I. L.; SILVA, L. A. O.; COELHO, L. C. B. B. Chapter 11 - The Brazilian Caatinga Biome and Its Biotechnological Potential. In: ADUNOYE, G. O.; BELLO, E. I.; OTU, F.; Mushtaq, R. *Advances in Applied Science and Technology*. Book Publisher International, ed. 1, p.1-20, 2019.

Formulação bioinseticida à base de conídios de fungo entomopatogênico microencapsulados por *Spray Drying*

Matheus Goulart de Jesus Seabra (apresentador)¹

Tárcio Souza Santos²

Patrícia Severino³

Marcelo da Costa Mendonça⁴

¹Discente, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Tiradentes (UNIT); ²Pós doutorado, Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe; ³Pesquisador, Laboratório de Controle Biotecnológico de Pragas (LCBiotec), Empresa de Desenvolvimento Agropecuário do Estado de Sergipe (EMDAGRO); ⁴Docente, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Tiradentes (UNIT).

INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados no controle biológico de pragas devido à sua capacidade de infectar e eliminar insetos e ácaros, causando epizootias naturais (IRSAD et al. 2023). Quando produzidos em larga escala, esses fungos atendem à demanda por soluções em sistemas de cultivo agroecológico e orgânico e são comercializados em formulações pulverizáveis e formulações de forma seca, e diante da crescente resistência das pragas aos pesticidas químicos, eles se destacam como alternativas ecologicamente corretas (DESAI et al., 2019).

Entretanto, sua eficácia é frequentemente comprometida pela sensibilidade a fatores abióticos, como temperatura, radiação e umidade demandando novas estratégias para melhorar sua estabilidade e desempenho (MÉNDEZ-GONZÁLEZ et al. 2022). Dentre as alternativas, a microencapsulação de propágulos fúngicos em biopolímeros por *Spray Drying* (SD) é uma abordagem promissora, pois permite a obtenção de formulações secas com baixo teor de umidade e atividade de água, fatores críticos para a estabilidade dos microrganismos durante o armazenamento, além de aumentar sua resistência a condições ambientais adversas (Felizatti et al., 2021).

A secagem por pulverização (*Spray Drying* - SD), amplamente utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica, produz microesferas secas que proporcionam alta estabilidade e reduzido risco de contaminação microbiana devido ao baixo teor de umidade (DANTAS et al. 2024). Embora essa técnica seja bem estabelecida, sua aplicação em bioinseticidas microencapsulados ainda é limitada, especialmente com o uso de biopolímeros como alginato de sódio e maltodextrina, que são biocompatíveis, biodegradáveis e fornecem proteção térmica e osmótica aos fungos (MARTÍNEZ-CANO et al. 2022; XIAO et al. 2022).

Neste estudo, apresentamos o desenvolvimento de uma formulação de isolados nativos de *Beauveria bassiana* microencapsulada em biopolímeros por secagem por pulverização.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos fungos entomopatogênicos

Os isolados PSI e SE119 de *Beauveria bassiana* foram obtidos do Banco de Fungos Entomopatogênicos do LCBiotec (Emdagro, São Cristóvão/SE). As amostras são mantidas em meio BDA e armazenadas em tubos criogênicos com glicerol a 10% a -20°C.

Efeito das temperaturas na viabilidade de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* secos em *Spray Drying*

B. bassiana foi cultivado em arroz, conforme Ferreira (2004). Os conídios foram separados do substrato usando Tween 80® (0,05%) e a suspensão foi ajustada para 1×10^9 conídios/mL. Para testar a tolerância à secagem por atomização, 100 mL da suspensão foi seca em SD (HAUOK, SD1.8L) a 60°C e 70°C, com fluxo de ar de 2400 L/h⁻¹, ar comprimido de 5.94×10^6 L/h⁻¹, e taxa de alimentação de 0,6 L/h⁻¹ (BRAGA et al., 2019). A viabilidade pós-secagem foi avaliada por unidades formadoras de colônia (UFC), em triplicata.

Avaliação da viabilidade de conídios de *B. bassiana* secos em *Spray Drying*

0,1 g de conídios secos foram agitados em 10 mL de Tween 80® (0,05%) por 30 min (150 rpm). A diluição de 10^6 conídios/mL foi selecionada, e 100 µL foram inoculados em placas de Petri com meio BDA, Cloranfenicol (0,25 mg/mL) e Tetraciclina (0,20 mg/mL). As placas foram incubadas a 25±2°C, fotofase de 12 h, por 5 dias em câmara BOD (coloque por extenso). A viabilidade foi analisada em termos de unidades formadoras de colônia (UFC) no 3º e 5º dia de incubação, utilizando a fórmula de Braga et al. (2019) (Equação 1):

Equação 1: $UFC = N^\circ \text{ de colônias} \times \text{Fator de correção do volume} \times \text{Fator de diluição}$

Os dados de UFC foram transformados em percentual, onde o valor da UFC foi dividido pelo valor da concentração de conídios na suspensão inicial e multiplicado por 100 (equação 2).

$$\text{Equação 2: } \frac{\text{Valor da UFC (conídios/mL)}}{\text{Concentração inicial de conídios (conídios/mL)}} \times 100$$

A suspensão utilizada para secagem também foi avaliada quanto sua viabilidade inicial (controle) por avaliação de UFC, utilizando metodologia semelhante à descrita anteriormente.

Desenvolvimento de formulação à base de conídios aéreos de *B. bassiana* encapsulados em alginato de sódio e maltodextrina por *Spray Drying*

Para o microencapsulamento de *B. bassiana*, soluções de alginato de sódio (AS) (1, 2 e 3%) e suspensão fúngica (1×10^9 conídios/mL) foram preparadas e homogeneizadas por 30 min. As misturas foram secas por SD conforme descrito no tópico 1.2. A formulação foi selecionada de acordo com a viabilidade dos conídios. O mesmo procedimento foi realizado com maltodextrina (MT) a 5, 8 e 10%.

Posteriormente, foram testadas combinações de polímeros utilizando 2% de AS e 8% de MT, com secagem em triplicata para avaliação de viabilidade, teor de umidade e atividade de água. Após confirmar a viabilidade, o teste foi repetido para o isolado SE119.

Caracterizações físico-químicas da formulação microencapsulada

A formulação contendo 2% de AS e 8% de MT foi caracterizada em teor de umidade, atividade de água e MEV. A análise da formulação selecionada ocorreu por método gravimétrico, em duplicata. Amostras de 0,1 g foram secas em estufa a 120°C até peso constante e calculada com base na metodologia da A.O.A.C. (2005). A atividade de água (a_w) foi realizada utilizando equipamento analisador de atividade de água de bancada (Aqualab, Series 3 TE). A morfologia e o tamanho dos microencapsulados foram analisados por microscopia eletrônica de varredura

(HITACHI, TM 3000). As amostras foram recobertas com prata para melhorar a dispersão de elétrons.

Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$) através do software SPSS 22.0.0 (IBM Corp., 2015). Os gráficos foram construídos através do software GraphPad Prism 8 (GRAPHPAD SOFTWARE, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito das temperaturas na viabilidade de conídios aéreos de *B. bassiana* secos em *Spray Drying*

A viabilidade dos conídios de *B. bassiana* secos por *SD* diferiu significativamente em relação a temperatura inicial utilizada no processo, sendo observado que a viabilidade dos conídios variou de $55,2 \pm 5,27\%$ e $39,8 \pm 3,89\%$ com a utilização da temperatura inicial de 60 e 70°C, respectivamente ($T_{1,4}=17,11$, $p = 0,01442$) (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* após secagem por *Spray Drying* com diferentes temperaturas.

Temperatura (Ti/To)*	Viabilidade (%)**
60/37	$55,2 \pm 5,27$ a
70/44	$39,8 \pm 3,89$ b

*Ti/To - Temperaturas de entrada e saída de ar, respectivamente.

** Percentual de viabilidade seguido de desvio padrão e teste de Tukey ($p < 0,05$).

A redução na viabilidade de conídios secos por *SD* foi semelhante à observada na atomização de *Trichoderma asperellum*, cuja viabilidade variou de 67% a 0% com temperaturas de 60°C e 120°C, respectivamente. O aumento da temperatura promoveu a obtenção de conídios murchos e danificados, indicando que a temperatura afeta diretamente sua estrutura, com impacto direto sobre as membranas e viabilidade (BRAGA et al., 2019).

Durante a secagem, observou-se maior deposição de conídios nas paredes internas da câmara de secagem a 60°C comparado a 70°C (Figura 8). O material seco a 60°C apresentou aspecto viscoso, indicando um teor de umidade elevado, enquanto o material seco a 70°C assumiu uma forma mais seca e em pó. O aspecto de umidade a 60°C pode comprometer a estabilidade dos conídios durante o armazenamento e microencapsulamento (KIM et al., 2019; ZIAEE et al., 2019). Assim, a temperatura de 70°C foi selecionada para as etapas subsequentes de desenvolvimento da formulação.

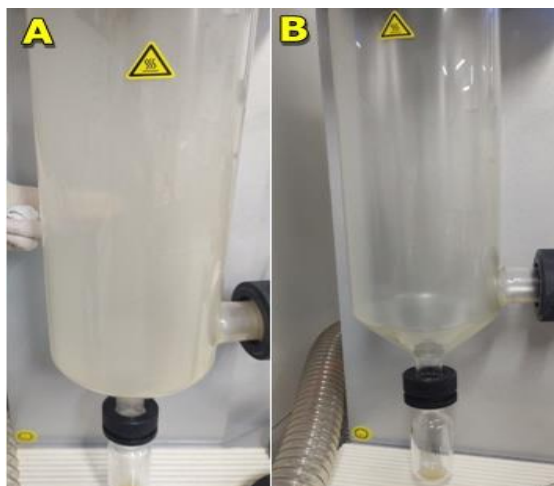


Figura 1. Aspecto visual da câmara de secagem do *Spray Drying*, demonstrando os conídios de *Beauveria bassiana* aderidos as paredes internas, quando secos nas temperaturas 60°C (A) e 70°C (B).

Desenvolvimento de formulação à base de conídios aéreos de *B. bassiana* encapsulados em alginato de sódio e maltodextrina por *Spray Drying*

A utilização de AS como material de parede promoveu melhorias na viabilidade dos conídios de *B. bassiana* secos por *SD*, sendo influenciada diretamente pela concentração do polímero ($F_{3,8} = 148,923$, $p = 0,000$). Dentre as concentrações de AS testadas, a concentração de 2% promoveu maior taxa de preservação da viabilidade dos conídios durante o processo de secagem ($51,6 \pm 0,75\%$) (Figura 1).

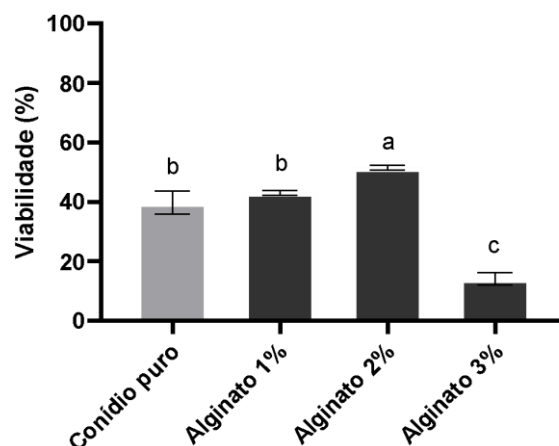


Figura 2. Viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* puro e encapsulados em alginato de sódio após secagem em *Spray Drying* à 70°C.

As análises de secagem com AS como material de parede mostraram que o aumento da sua concentração reduz a degradação dos conídios de *B. bassiana* durante o *SD*. A viabilidade dos conídios sem o polímero foi de $39,8 \pm 3,89\%$, enquanto a formulação com 2% de AS apresentou a viabilidade de $51,6 \pm 0,75\%$, seguida pela formulação com 1% de alginato ($43,1 \pm 0,79\%$). No entanto, a concentração de 1% não diferiu significativamente da suspensão não formulada, sugerindo que essa concentração de AS é insuficiente para preservar a viabilidade do fungo. Já a

concentração de 3% de alginato reduziu a viabilidade para $16,6 \pm 6,13\%$, possivelmente, causando um efeito tóxico ao microrganismo.

A capacidade de proteção térmica da AS foi confirmada em outros estudos, como o de Noor et al. (2022), que relatou preservação de 93,88% de viabilidade da bactéria *Proteus penneri* com 1% de alginato a 125°C. No presente estudo, uma concentração de 2% de alginato mostrou maior eficiência. Entretanto, concentrações elevadas ($>3\%$) aumentam a viscosidade e a heterogeneidade, prejudicando a viabilidade devido à má distribuição e maior exposição ao calor (Keshani et al., 2015). Concentrações altas também podem causar estresse osmótico e efeitos citotóxicos ($>2\%$), comprometendo os propágulos fúngicos (WOOD, 2010; TØNDERVIK et al., 2014). Portanto, é necessário otimizar a concentração de AS para manter a viabilidade. O AS oferece proteção térmica aos conídios de *B. bassiana* no SD, mas sua eficácia é limitada por questões de viscosidade, homogeneidade do material e citotoxicidade em altas concentrações.

Com a finalidade de explorar as possibilidades de outros agentes encapsulantes, com efeito termoprotetor, também foi avaliado o efeito das concentrações de 5, 8 e 10% de MT no encapsulamento de conídios de *B. bassiana* por SD, sendo observada diferença na viabilidade do fungo de acordo com a concentração de MT utilizada ($F_{3,8}=32,951$, $p = 0,000$) (Figura 2).

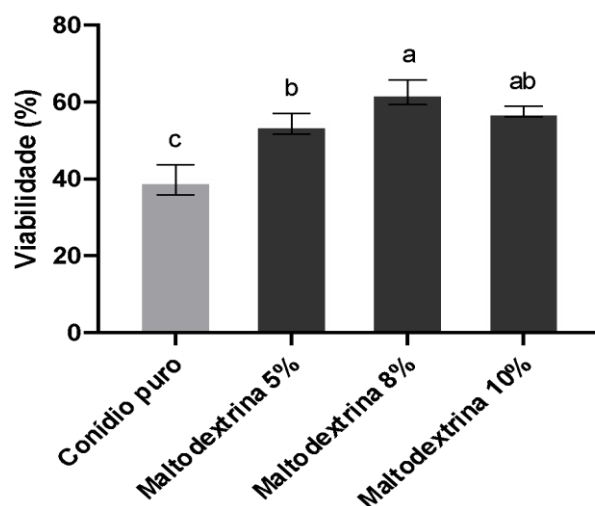


Figura 3. Viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* puro e encapsulados em diferentes concentrações de maltodextrina após secagem em *Spray Drying* à 70°C.

As diferentes concentrações de MT utilizadas como agente encapsulante resultaram em variações na viabilidade dos conídios após o processo de secagem por atomização a 70°C. O encapsulamento com 8% de MT apresentou a melhor preservação da viabilidade dos conídios ($62,61 \pm 3,22\%$), seguido pelas concentrações de 10% ($57,61 \pm 1,43\%$) e 5% ($54,37 \pm 2,65\%$). Esses resultados indicam que o aumento da concentração de MT não necessariamente melhora a preservação dos conídios, sugerindo que existe um ponto de eficácia máxima em torno de 8%, corroborando com Bagdat et al., (2023).

Com o objetivo de obter uma formulação microencapsulada com maior preservação da viabilidade dos conídios, foi testada uma combinação das concentrações de polímeros que mostraram melhores resultados de preservação de viabilidade (2% de AS + 8% de MT) com os isolados PSI e SE119 (Figura 3).

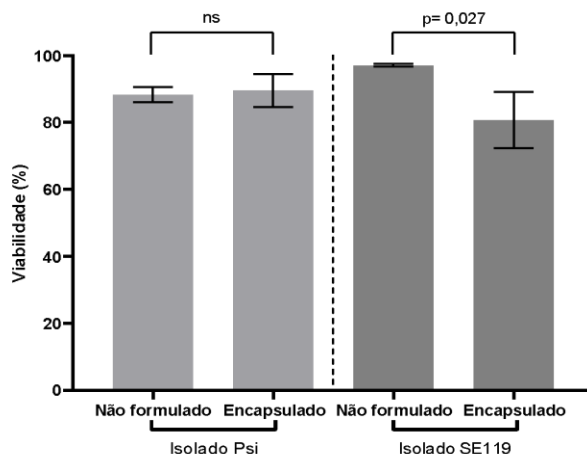


Figura 4. Viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* puro (PSI e SE119) e encapsulados secos (conídio+alginato+maltodextrina) após secagem em *Spray Dryer* em 70/48°C (Ti/To).

Os resultados mostraram que a combinação de alginato (AS) e maltodextrina (MT) proporciona um efeito sinérgico na proteção térmica durante a secagem dos propágulos encapsulados. A viabilidade dos conídios encapsulados pela combinação dos polímeros (2% AS + 8% MT) foi superior aos efeitos dos polímeros individualizados. A formulação com 2% de AS e 8% de MT manteve a viabilidade dos conídios de PSI sem diferença significativa em relação ao controle, não encapsulado ($F_{1,4} = 0.161$, $p = 0.709$). Embora, este resultado não tenha se repetido para o isolado SE119, quando comparado com o controle (não encapsulado) ($F_{1,4} = 58.69$, $p = 0.00156$), ainda assim, a viabilidade do fungo encapsulado (AS + MT) foi superior aos resultados de secagem com os polímeros individualizados. Campos et al. (2014), verificaram que a combinação de AS e MT no encapsulamento por SD resultou em maior viabilidade de *Enterobacter* sp., no qual a viabilidade é atribuída à ação sinérgica dos polímeros, que apresentou baixa viscosidade e capacidade de preencher o interespaçamento para células, fortalecendo a matriz encapsulante. Assim, a associação de MT com AS é capaz de promover um aumento na preservação de microrganismos secos em SD em comparação ao uso isolado de cada polímero.

A formulação de conídios de *B. bassiana* microencapsulados com 2% de AS e 8% de MT apresentou um teor de umidade de $6,19\% \pm 0,07$ e atividade de água (a_w) de $0,33 \pm 0,00$. Esses parâmetros são ideais para a preservação da viabilidade dos conídios durante o armazenamento, uma vez que níveis de umidade abaixo de 10% e a_w entre 0,3 e 0,6 são recomendados para a estabilidade de fungos entomopatogênicos (LYN et al., 2010; SYAMALADEVI et al., 2016).

Caracterizações físico-químicas da formulação microencapsulada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O encapsulamento e as características das micropartículas foi confirmado e analisado por micrografias eletrônicas de varredura (MEV) de conídios de *B. bassiana* não-formulados e microencapsulados por SD com 2% de AS e 8% de MT (Figura 12).

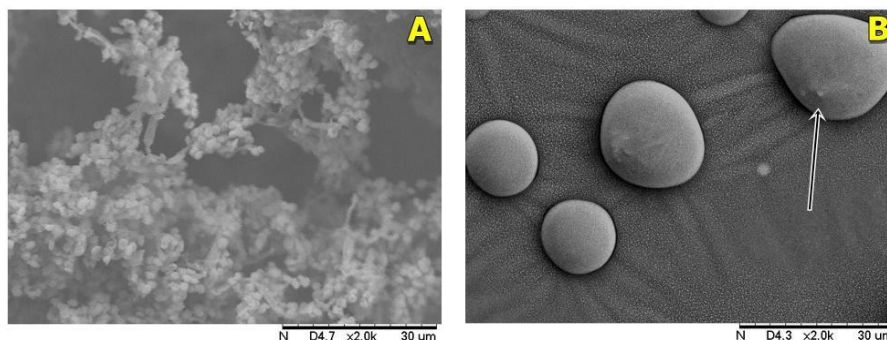


Figura 5. Micrografias eletrônicas de varredura de conídio de *Beauveria bassiana* não-formulado em “A”; “B” representa as micropartículas secas de conídios de *Beauveria bassiana* encapsuladas por alginato de sódio em concentração de 2% + maltodextrina em concentração de 8% (fotos tiradas a 2000 x). A seta indica a presença de conídio de *Beauveria bassiana* próximo a superfície da micropartícula (B).

Na Figura 12A, os conídios não encapsulados apresentam-se arredondados. Na Figura 12B, as micropartículas encapsuladas com AS e MT têm superfície lisa, morfologia irregular e tamanhos variados, sem conídios aderidos à superfície. Essas características são semelhantes às micropartículas de *Enterococcus mundtii* encapsuladas em AS (2%) e MT (10%) por SD, que também exibiram superfície lisa e formatos irregulares (SAKOU et al., 2022).

CONCLUSÃO

O aumento da temperatura reduz a viabilidade de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* através da técnica de secagem por SD. A adição de alginato de sódio e maltodextrina promoveu o aumento da preservação da viabilidade dos conídios, apresentando efeito protetor significativo com a combinação dos dois polímeros. O formulado apresenta características físico-químicas próprias de microencapsulados via SD e está conformidade com o estabelecido pelos padrões de controle de qualidade do CIPAC para formulações no controle de pragas.

Agradecimentos

EMDAGRO, CNPq, UFS, CAPES, FAPITEC/SE, Laboratório de Análise de Alimentos e ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários I, ambos da UFS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. T.; FARIA, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. Planaltina (DF), **Embrapa Cerrados**, p. 26-31, 2010.

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, MD: AOAC, 2005.

BAGDAT, E. S.; AKMAN, P. K.; KUTLU, G.; TORNUK, F. Optimization of spray-drying process parameters for microencapsulation of three probiotic lactic acid bacteria selected by their high viability rate in sucrose and fructose levels and high temperatures. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, p. 1-12, 2023.

BRAGA, A. B.; COSTA, C. J.; POMELLA, A. W.; RIBEIRO, E. J.; SANTOS, L. D.; ZOTARELLI, M. F. Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the

microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidia by spray drying. **Powder Technology**, v. 347, p. 199-206, 2019.

DANTAS, A.; PIELLA-RIFÀ, M.; COSTA, D. P.; FELIPE, X.; GOU, P. Innovations in spray drying technology for liquid food processing: design, mechanisms, and potential for application. **Applied Food Research**, v. 4, n. 1, p. 100382, 2024.

DESAI, S.; PRASAD, T. V.; KUMAR, G. P.; PETER, J.; AMALRAJ, L. D. Harnessing entomopathogenic fungi for enhanced farm productivity and profitability. In: **Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 2. Soil & Agroecosystems**, p. 205-230, 2019.

FELIZATTI, A. P.; MANZANO, R. M.; RODRIGUES, I. M. W.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; FERNANDES, J. B.; FORIM, M. R. Encapsulation of *Beauveria bassiana* in biopolymers: improving microbiology of insect pest control. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 704812, 2021.

FERREIRA, J. M. S. Protocolo para produção massal de fungos entomopatogênicos: I-*Beauveria bassiana* (Vuill.). Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004.

IRSAD, S.; HAQ, E.; MOHAMED, A.; RIZVI, P. Q.; KOLANTHASAMY, E. Entomopathogen-based biopesticides: insights into unraveling their potential in insect pest management. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1208237, 2023.

KESHANI, S.; DAUD, W. R. W.; NOUROUZI, M. M.; NAMVAR, F.; GHASEMI, M. Spray drying: an overview on wall deposition, process and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 152-162, 2015.

MARTÍNEZ-CANO, B.; MENDOZA-MENESES, C. J.; GARCÍA-TREJO, J. F.; MACÍAS-BOBADILLA, G.; AGUIRRE-BECERRA, H.; SOTO-ZARAZÚA, G. M.; FERREGRINO-PÉREZ, A. A. Review and perspectives of the use of alginate as a polymer matrix for microorganisms applied in agro-industry. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4248, 2022.

MÉNDEZ-GONZÁLEZ, F.; CASTILLO-MINJAREZ, J. M.; LOERA, O.; FAVELA-TORRES, E. Current developments in the resistance, quality, and production of entomopathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 115, 2022.

NOOR, E.; YUSRON, M.; SITORUS, R. D. M. C. *Proteus penneri* encapsulation with maltodextrin and sodium alginate using a spray-drying method. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e49621, 2022.

SAKOU, S.; DERDAK, R.; POP, O. L.; VODNAR, D. C.; ADDOUM, B.; TELEKY, B. E.; EL KHALFI, B. Effect of encapsulated probiotic in inulin-maltodextrin-sodium alginate matrix on the viability of *Enterococcus mundtii* SRBG1 and the rheological parameters of fermented milk. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 1713-1719, 2022.

SELVAMUTHUKUMARAN, M. (Editor). Handbook on spray drying applications for food industries. 1st Ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 2019.

SYAMALADEVI, R. M.; TANG, J.; VILLA-ROJAS, R.; SABLANI, S.; CARTER, B.; CAMPBELL, G. Influence of water activity on thermal resistance of microorganisms in low-moisture foods: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 353-370, 2016.

TØNDERVIK, A.; SLETTA, H.; KLINKENBERG, G.; EMANUEL, C.; POWELL, L. C.; PRITCHARD, M. F.; HILL, K.; KHAN, S.; CRAINE, K. M.; ONSØYEN, E.; RYE, P. D.; WRIGHT, C.; THOMAS, W. D.; HILL, K. E. Alginate oligosaccharides inhibit fungal cell growth and potentiate the activity of antifungals against *Candida* and *Aspergillus* spp. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112518, 2014.

WOOD, J. M. Osmotic stress. In: **Bacterial stress responses**, p. 133-156, 2010.

XIAO, Z.; XIA, J.; ZHAO, Q.; NIU, Y.; ZHAO, D. Maltodextrin as wall material for microcapsules: a review. **Carbohydrate Polymers**, p. 120113, 2022.

ZIAEE, A.; ALBADARIN, A. B.; PADRELA, L.; FEMMER, T.; O'REILLY, E.; WALKER, G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: critical parameters and experimental process optimization approaches. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 300-318, 2019.

Propriedades antioxidantes do feno de *Moringa oleifera* e seu efeito sobre a capacidade reprodutiva de carneiros

Michele Pereira da Silva (Apresentadora)¹

Gladston Rafael de Arruda Santos²

Matheus Batista de Oliveira³

Julio Constantino Jerí Molina⁴

Evandro Neves Muniz⁵

Rafael Dantas dos Santos⁶

Ana Mara de Oliveira e Silva⁷

Iranildo Soares Bispo⁸

Hymerson Costa Azevedo⁹

¹Mestrado, Programa de Pós Graduação Integrado em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe; ²Docente, Programa de Pós Graduação Integrado em Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe; ³Doutorado, Programa de Pós Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe ⁴Bolsista, Embrapa Tabuleiros Costeiros. ⁵Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros; ⁶Pesquisador, Embrapa Semiárido. ⁷Docente, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Sergipe; ⁸Bolsista, Embrapa Tabuleiros Costeiros. ⁸Discente, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Sergipe. ⁹Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros.

INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* (MO) é uma planta com grande adaptação ao clima semiárido, tem fácil propagação e resistência, alto potencial de crescimento, alto valor nutricional, rica em proteínas, carboidratos e minerais. Tem sido recomendada para a suplementação proteica de ruminantes, possibilitando a formação de bancos de proteína. Possui quantidades de taninos e saponinas consideradas baixas que não afetam negativamente a saúde da animal e grande quantidade de ácidos graxos insaturados especialmente o oleico (SOBRAL et al., 2020).

A MO também contém em sua composição, diferentes polifenóis, lipídios, glicosídeos, flavonóides, ácidos orgânicos, carotenoides, ácido ascórbico e muitos outros antioxidantes naturais, que a torna uma fonte alimentar rica, com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (MOUSA et al., 2019). A MO pode ser oferecida na alimentação animal na forma in natura, ensilada ou fenada, sem restrições referentes à quantidade. Em forma de feno a MO pode compor rações concentradas como importante fonte proteica, possibilitando a substituição de componentes convencionais da ração (LISITA et al., 2018).

Considerando que o sêmen ovino é rico em ácidos graxos poliinsaturados com alta sensibilidade à peroxidação lipídica, os antioxidantes contidos na MO podem diminuir a lipoperoxidação, aumentando o seu sistema de defesa antioxidante (SILVA, 2024). Esse trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes do feno de MO (F-MO) e seu efeito sobre o potencial reprodutivo de carneiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com o número de protocolo nº 442022. O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Semiárido, localizado nos municípios de Nossa Senhora da Glória e Graccho Cardoso. Foram utilizados 28 carneiros adultos, com peso médio de $69,36 \pm 1,29$ kg selecionados a partir de exames andrológicos que compreenderam o exame clínico geral e especial dos órgãos reprodutivos e análise do sêmen (CBRA, 2013; MARTINS et al., 2016; TOKER et al., 2016). Os carneiros foram divididos em quatro grupos de acordo com as dietas experimentais sendo mantidos em baias coletivas (7 carneiros/baia).

Análise de compostos bioativos e capacidade antioxidante da Moringa

Foram realizadas análises de bioativos da MO *in natura* e F-MO que se baseou na quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides dos seus extratos, avaliados por diferentes mecanismos incluindo capacidade antirradicalar e redutora, a partir de curvas de resposta preparadas em diferentes concentrações (3,10, 30, 100, 300 e 1000 µg). A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Swain e Hills (1959) com algumas modificações. Os flavonoides foram determinados pelo método de Jia et al. (1999) com algumas modificações. Os ensaios para mensuração da capacidade antioxidante *in vitro* descritos abaixo foram realizados segundo Brand-Willians et al. (1995). Para ensaio do radical ABTS (Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) uma alíquota de 30 µL dos extratos foi transferida para microplacas contendo 300 µL deste radical que foram lidas em espectrofotômetro (734 nm). Para a análise do poder de redução de ferro, uma alíquota de 9 µL dos extratos foi transferida para uma microplaca, onde foram acrescentados 27 µL de água destilada e 270 µL do reagente FRAP que correspondeu a 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloretoférrico 20 mM. A microplaca foi mantida a 37°C por 30 minutos para então ser avaliada em espectrofotômetro (595 nm) utilizando-se o reagente FRAP como branco para calibração. Os resultados foram expressos em µM de equivalentes de sulfato ferroso/mL de extrato.

Colheita e análise do sêmen e desenvolvimento ponderal dos carneiros

Durante o período experimental efetivo de 60 dias, foram realizadas colheitas e análises de sêmen a cada 15 dias (D1, D15, D30, D45 e D60) para avaliação do potencial reprodutivo dos carneiros. Além disso, foram feitas pesagens corporais dos carneiros no D1, D15, D45 e D60 utilizando balança mecânica móvel tipo gaiola. O sêmen foi colhido com auxílio de eletroejaculador e submetido a avaliações seminais e espermáticas. As avaliações seminais compreenderam o volume (VL), concentração espermática (CON) e número total de espermatozoide (NTE) seguindo metodologias adaptadas daquelas recomendadas pelo CBRA (2013). As avaliações espermáticas compreenderam a motilidade (MOT), vigor (VE), morfologia, integridade e funcionalidade da membrana plasmática e integridade do acrossomo. A MOT e o VE foram avaliados imediatamente após a colheita adicionando-se 10µL de sêmen em 150 µL de solução de X-Cell® aquecida a 37 °C. Uma alíquota de 10µL da mistura foi transferida para uma lâmina e coberta por uma lamínula aquecidas (37 °C) sendo avaliada em um microscópio ótico com aumento de 400x sendo a MOT mensurada numa escala de 0 a 100% e o VE de 1 a 5.

A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada através da transferência de alíquotas de sêmen de 10 µL para 500 µL de solução tampão fosfato-salino com glutaraldeído a 0,2% aquecidos a 37 °C. Dessa mistura foram retirados 10 µL para serem analisados 200 espermatozoides por meio de microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x, sob óleo de

imersão, que foram classificados com defeitos maiores (DMA) e menores (DME). Foi realizada a soma dos DMA e DME para determinar o número de espermatozoides com defeitos espermáticos totais (DT).

Para análise de integridade da membrana plasmática foram utilizadas alíquotas de sêmen coradas com solução de eosina-nigrosina e para avaliação de integridade de acrossomo (IA) foi utilizada a associação dos corantes Trypan Blue e Giemsa segundo Martins et al. (2016).

Capacidade antioxidante *in vitro* do plasma seminal

Amostras de sêmen foram submetidas a duas centrifugações, primeira à 1000 g por 10 min e segunda à 4000 g por 20 min. O sobrenadante referente ao plasma seminal foi retirado e armazenado à -20 C°, para posterior análise (GLANDER et al., 2002). Foi aplicado o método FRAP em triplicata, seguindo a mesma metodologia utilizada para os extratos que foi descrita anteriormente.

Análise estatística

Os dados dos compostos bioativos e da capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de MO in natura e F-MO estão apresentados em média e desvio padrão de três ensaios independentes e as diferenças entre as amostras foram avaliadas pelo teste t Student. Os dados de integridade da membrana plasmática e do acrossomo, bem como capacidade antioxidante total do plasma seminal foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguido o teste de Tukey.

Os demais dados das avaliações seminais e espermáticas foram analisados utilizando-se o programa computacional SAS 9.1®. Esses dados não apresentaram homocedasticidade e distribuição normal e foram analisados com estatística não paramétrica. Para tanto foram submetidos à análise de comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Wallis e de comparações de médias pelo teste Dunn. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação de compostos bioativos da Moringa

Os resultados dos teores dos compostos fenólicos totais e flavonoides no F-MO estão expostos na tabela 1. Observou-se que o F-MO não diferiu significativamente da MO quanto ao teor de fenólicos totais ($P < 0,05$). Já em relação aos flavonoides, foi observada uma diferença significativa ($P < 0,05$) demonstrando que o F-MO tem maior teor comparado à MO.

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato etanólico do feno e da Moringa *in natura*.

Amostra	Fenólicos totais(mg Eq AG/g)	Flavonoides (mg Eq CAT/g)
Feno de Moringa (F-MO)	33,38 ± 2,27 ^a	4,75 ± 0,38 ^a
Moringa <i>in natura</i> (MO)	33,64 ± 3,05 ^a	3,88 ± 0,30 ^b

mg Eq AG/g = miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama; mg Eq CAT/g= miligramas de equivalentes de catequina por grama; os dados são apresentados como média ± desvio padrão; Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras

Capacidade antioxidante da Moringa

A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos do feno (F-MO) e da Moringa *in natura* (MO) apresentaram alto poder redutor quando comparados aos da MO que apresentaram menor capacidade de redução de íons férricos.

As análises de DPPH, ABTS e FRAP demonstraram que o feno tem maior ($P < 0,05$) capacidade antioxidante quando comparado com a MO (Tabela 2).

Tabela 2. Capacidade antioxidante do extrato etanólico do feno e da Moringa *innatura*.

Amostra	DPPH IC50 (µg/mL)	ABTS IC50 (µg/mL)	FRAP Eq Suf. Ferroso (1000 mg/mL)
Feno de Moringa (F-MO)	802,00 ± 36,76 ^a	1091,78 ± 269,31 ^a	418,08 ± 18,17 ^a
Moringa <i>in natura</i>	1840,38 ± 160,45 ^b	2943,82 ± 460,20 ^b	146,83 ± 16,89 ^b

DPPH= Composto químico orgânico 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; ABTS= ácido 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico); FRAP= Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante de Redução do Ferro); Suf Ferroso= Sulfato Ferroso. IC50 = Concentração inibitória média; Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias das amostras.

Análises seminais e espermáticas

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes às análises do sêmen VL, COM MOT, VE, DT e IA demonstrando que os grupos experimentais não diferiram ($p > 0,05$) quanto a estes parâmetros analisados.

Tabela 3. Avaliações do sêmen realizadas no decorrer do experimento em carneiros alimentados com diferentes níveis de feno de *Moringa Oleifera* (F-MO).

Coletas	Análises	Grupos					
		G0	G10	G20	G30	Média	E. P
D1	VL (mL)	1,200	1,050	1,216	1,366	1,208	1,735
	CON ($\times 10^6$ sptz/mL)	1,359	1,401	3,485	5,347	2,898	0,159
	MOT (%)	66,666	70,000	75,000	71,666	70,833	0,686
	VE (1-5)	3,000	3,000	3,666	3,333	3,250	5,529
	DT (%)	4,042	4,042	1,667	4,833	3,646	0,124
	IA (%)	0,250	0,000	0,200	0,000	0,113	0,066
D15	VL (mL)	0,816	1,266	0,733	1,100	0,979	0,124
	CON ($\times 10^6$ sptz/mL)	2,353	1,251	2,231	3,638	2,368	0,490
	MOT (%)	71,666	73,333	71,666	71,666	72,083	0,417
	VE (1-5)	3,166	3,166	3,166	3,166	3,166	0,000
	DT (%)	9,625	9,625	2,250	4,042	6,386	1,906
	IA (%)	0,000	0,000	1,000	0,833	0,458	0,267
D30	VL (mL)	1,116	1,200	1,000	1,200	1,129	0,047
	CON ($\times 10^6$ sptz/mL)	3,166	1,230	3,095	3,216	2,677	0,483
	MOT (%)	70,000	73,333	73,333	68,333	71,250	1,250
	VE (1-5)	3,166	3,166	3,333	3,166	3,208	0,048
	DT (%)	6,583	6,583	17,250	10,875	10,323	2,521
	IA (%)	32,830	57,166	47,500	65,500	50,749	7,014

D45	VL (mL)	1,116	1,016	0,800	1,283	1,054	0,101
	CON ($\times 10^6$ spz/mL)	2,818	2,490	1,569	3,733	2,653	0,447
	MOT (%)	68,333	76,666	73,333	75,000	73,333	1,800
	VE (1-5)	3,166	3,166	3,333	3,333	3,250	0,056
	DT (%)	11,417	11,417	8,833	7,042	9,677	1,069
	IA (%)	0,000	0,000	6,333	0,333	1,667	1,557
D60	VL (mL)	1,083	1,166	1,033	1,083	1,091	0,028
	CON ($\times 10^6$ spz/mL)	2,747	1,472	3,125	1,377	2,180	0,444
	MOT (%)	71,666	75,000	76,666	78,333	75,416	1,423
	VE (1-5)	3,333	3,333	3,666	3,833	3,541	0,125
	DT (%)	4,500	4,500	2,083	1,292	3,094	0,828
	IA (%)	3,666	37,000	16,500	0,333	14,37475	8,308

G0 = 0% de F-MO; G 10 = 10% de F-MO; G 20= 20% de F-MO; G 30= 30% de F-MO; D1= Primeira coleta; D15= Segunda coleta; D30= Terceira coleta; D45= Quarta coleta; D60= Quinta coleta; VL=Volume do sêmen; CON= Concentração espermática; MOT= Motilidade espermática; VE= Vigor espermático; DT= defeitos totais; IA= Integridade de acrossomo; E P= Erro Padrão.

O volume de sêmen obtidos no presente estudo ficaram entre os valores normais relatados para a espécie de 0,5 a 2,0 ml (MAIA et al., 2011), que variam a depender do método de coleta, da quantidade de serviços, entre outros. Syarifuddin et al. (2021) também não observaram alterações no volume do sêmen de bodes alimentados com dieta contendo folhas de MO, alegando que o resultado pode ter ocorrido devido ao baixo uso deste alimento.

Os valores de MOT e VE encontrados no presente trabalho são considerados próximos ou iguais aos valores mínimos para classificar os carneiros como aptos à reprodução segundo o CBRA (2013). A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides apresentou diferenças altamente significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos que receberam dieta contendo F-MO em comparação com o grupo controle independente da quantidade e do dia de administração (Figura 1). Estudos anteriores com ovinos, caprinos e bovinos demonstram efeitos positivos da ingestão da moringa nos parâmetros avaliados (ANGGARA et al., 2021; SYARIFUDDIN et al., 2021).

Estes resultados podem ter sido obtidos em consequência da melhora no desenvolvimento das células espermáticas, resultando na diminuição da peroxidação lipídica, da geração de radicais livres que prejudicam essas células e aumento do sistema de defesa antioxidante.

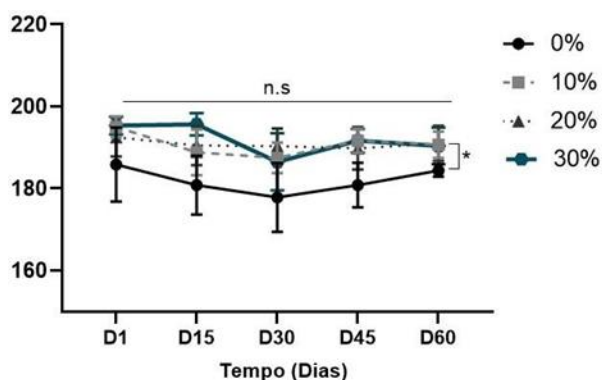


Figura 1. Análise da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides no sêmen de carneiros alimentados com dietas contendo diferentes quantidades de feno de Moringa (F-MO).

* Diferença ($p < 0,0001$) entre os grupos alimentados com dietas contendo diferentes quantidades de F-MO

Moringa (G10 = 10%, G20 = 20% e G30 = 30%) quando comparados ao controle (G0 = 0%) em todos os momentos avaliados (D1, D15, D30, D45 e D60). n.s significa que não houve diferença entre os momentos dentro do mesmo grupo ($P>0,05$).

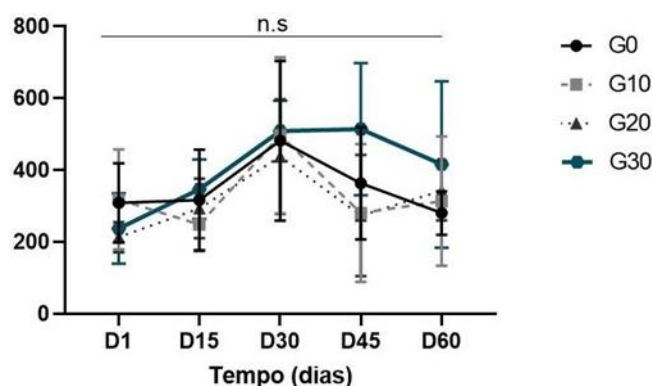


Figura 2. Capacidade antioxidante total do plasma seminal em carneiros alimentados com dietas contendo diferentes quantidades de feno de Moringa (F-MO): G0 = 0%, G10 = 10%, G20 = 20% e G30 = 30% em todos os momentos avaliados (D1, D15, D30, D45 e D60). n.s significa que não houve diferença dentro do mesmo grupo em relação aos momentos avaliados ($P>0,05$).

A presença de enzimas antioxidantes no plasma seminal ovino também pode contribuir para a manutenção da qualidade espermática e consequentemente do sêmen contra os danos oxidativos influenciando sua fertilidade (CAVALCANTE et al., 2013). Entretanto não foi observada diferenças significativas entre os grupos para capacidade antioxidante total do plasma seminal (Figura 2).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o feno potencializa a capacidade antioxidante da *Moringa oleifera* e que sua presença na composição de dietas aumenta o potencial reprodutivo de carneiros.

Palavras-chaves: espermatozoides; fertilidade; ovinos; sêmen.

AGRADECIMENTOS

UFS, CAPES, FAPITEC, CNPQ, EMBRAPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGGARA, F. D.; YUSUF, M.; TOLENG, A. L.; SAHIRUDDIN; MASTURI; HASRIN. Supplementation of Moringa (*Moringa oleifera*) leaf meal block on the quality of Bali bull semen. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v 788, 012144, 2021.
- BRAND -WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C.: Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v. 28 (1), p.25–30, 1995.

CAVALCANTE, J.M.M.; AGUIAR, G.V.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.; MOURA, A.A.A.; NUNES, J.F. Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.37, n.3, p.254-259, 2013.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal., v.3, p.15-26, 2013.

GLANDER, H.J., LAMMERT, A., PAASCH, U., GLASOW, A., KRATZSCH, J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. **Andrologia**, v. 34, p.227–233, 2002.

JIA, Z.; TANG, M.; WU, J.; The determination of favonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

LISITA, F. O.; JULIANO, R. S.; MOREIRA, J. S. **Cultivo e processamento da moringa na alimentação de bovinos e aves**. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2018. 32 p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 139).

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p.175-179, 2011.

MARTINS, C. F., DODE, M.A.N., FELICIANO SILVA, A. E. D. Atlas de morfologia espermáticabovina. 1ª ed., Brasília, Embrapa, p. 24-26, 2016.

MOUSA, A. A.; GANSH H. A. E.; ELDAIM, M. A. A.; MOHAMED M. A. E.; MORSI, A. H.; SABAGH, H. S. E. Protective effect of Moringa oleifera leaves ethanolic extract against thioacetamide – Induced hepatotoxicity in rats via modulation of cellular antioxidant, apoptotic and inflammatory markers. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, n. 31, 2019.

SILVA, M. P. Propriedades antioxidantes do feno de *Moringa Oleifera Lam.* e seu efeito sobre a capacidade reprodutiva de carneiros [dissertação]. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe; p.39, 2024.

SOBRAL., A. J. S.; MUNIZ, E. N. SILVA, C. N. Caracterização da Moringa oleifera Lam e sua utilização na alimentação animal. **Ciência Animal**., v.30, n.2, p.68-79, 2020.

SWAIN, T., HILLS, W.E. The phenolic constituents of Punus domestica. Iquantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 19, p.63–68, 1959.

SYARIFUDDIN, N.A.; RIZAL, M.; RIYADHI, M.; WAHDI, A. Semen quality of etawah crossbreed bucks fed with urea Moringa Molasses multinutrient block supplemented with native grass basal feed. **Advances in Biological Sciences Research**, v. 17, p.215-223, 2021.

TOKER, M. B.; ALCAY, S.; GOKCE, F.; USTUNER, B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. **Cryobiology**. v.72, p.205-209, 2016.

Influência do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na qualidade do semen de carneiros

Matheus Batista de Oliveira¹

Julio Constantino Jerí Molina²

Hymerson Costa Azevedo³

¹Mestre em Ciências. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe;

²Doutor em Ciências. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe;

³Docente, Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um processo que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo (Barbosa *et al.*, 2010). Este desequilíbrio provoca danos às células de um modo geral e aos espermatozoides que também são vulneráveis pela limitada capacidade intrínseca de prevenir a peroxidação excessiva dos substratos e de mitigar parcial ou totalmente a produção de EROs (SILVA e GADELLA, 2006) justificando a necessidade de proteção exógena (TAYLOR, 2001).

Os espermatozoides de ovinos são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido à presença elevada de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática (BUCAK *et al.*, 2007). A elevada concentração de EROs no sêmen pode desencadear o estresse oxidativo, impactando negativamente o metabolismo energético, a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA dos espermatozoides (BAUMBER *et al.*, 2002; BILODEAU *et al.*, 2002). Neste sentido, substâncias com ação antioxidante têm um papel crucial na prevenção do estresse oxidativo, mantendo a integridade, funcionalidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides (NAJAFI *et al.*, 2017).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma proteína essencial para o desenvolvimento, função e sobrevivência das células neuronais e pode contribuir para manutenção da qualidade de células reprodutivas pela proteção contra danos oxidativos (SKAPER, 2012). Essa proteção ocorre pela capacidade do BDNF de proteger as células contra os radicais livres (Li *et al.*, 2016). A presença do BDNF no sêmen está associada à redução dos níveis de óxido nítrico e ao aumento da motilidade, assim como redução da peroxidação lipídica, contribuindo para a manutenção da fluidez da membrana plasmática e viabilidade espermática (SAFARI *et al.*, 2017). Além disso, o BDNF também estimula a produção de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, importantes para a defesa contra o estresse oxidativo em espermatozoides (XIU *et al.*, 2020).

A incorporação de antioxidantes ao sêmen, a exemplo do BDNF, pode desempenhar um papel crucial na preservação da qualidade espermática, promovendo a proteção contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, diminuindo, evitando ou mesmo melhorando a sua integridade e funcionalidade. A melhoria nesses parâmetros espermáticos pode representar um aumento no desempenho reprodutivo de carneiros por meio do impacto positivo gerado à qualidade do sêmen e da eficiência das suas tecnologias associadas de conservação, como a refrigeração e criopreservação, e de uso a exemplo da inseminação artificial (IA) e da fertilização in vitro.

Objetivou-se avaliar a qualidade do sêmen de carneiros após exposição a diferentes concentrações ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com o número de protocolo 0035/2020.

Animais experimentais e manejo

Foram utilizados cinco (n=5) carneiros sexualmente maduros do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros que foram considerados aptos à reprodução após realização de exames clínico andrológicos segundo recomendações do CBRA (2013). Os carneiros possuíam peso médio de 60 kg, com idade entre 3 e 5 anos, bom estado nutricional e libido.

Colheita e processamento de sêmen

A colheita do sêmen foi feita pelo método da vagina artificial modelo LABRA-2020 com água aquecida ($\sim 52^{\circ}\text{C}$) e ovelha em estro natural. Os ejaculados foram coletados e transferidos para tubos graduados (15 mL) e mantidos em banho-maria (37°C). Posteriormente foram avaliados seguindo-se recomendações do CBRA (2013): volume (mL), vigor espermático (0 a 5), motilidade espermática total (0 a 100%), concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL) e número total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz). Apenas aqueles ejaculados com valores de motilidade $\geq 70\%$ e vigor $\geq 3,0$ foram selecionados para o experimento.

Amostras de sêmen foram removidas de cada ejaculado e diluídas em solução salina fosfatada (PBS) contendo ou não BDNF (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) mantendo-se uma concentração espermática final de 200 espermatozoides/mL. Foram formados os seguintes grupos que variaram quanto à concentração final do BDNF: 0 $\mu\text{g/L}$ (controle); 10 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$; 40 $\mu\text{g/L}$ e 80 $\mu\text{g/L}$. Os grupos experimentais foram submetidos às análises espermáticas após serem expostos por 5 minutos às soluções sob incubação em banho-maria a 37°C , sendo considerado para efeito de análise o tempo inicial (T5), e o de 30 minutos (T30) de exposição.

Análises espermáticas

Cinética espermática

Amostras de sêmen (5 μL) dos grupos experimentais foram diluídas a uma concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL em solução avaliadora pré-aquecida a 37°C para avaliação da cinética espermática. Alíquotas foram mantidas a 37°C por 5 minutos e dispostas em uma câmara (Makler®) para captura de imagens usando uma câmera de vídeo conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon® 50i, Japão), sob aumento de 100 vezes contando-se 600 células/campo. As imagens foram processadas pelo software Sperm Class Analyzer (SCA, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain) sendo analisados os parâmetros cinéticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), linearidade ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$), retilinearidade ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), índice de oscilação ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100$) e hiperatividade (HYPER). Foram considerados como móveis apenas aqueles espermatozoides que apresentaram valores de $\text{VCL} \geq 20 \mu\text{m}/\text{segundo}$. Os espermatozoides móveis foram ainda classificados como rápidos (RAP) quando apresentavam $\text{VCL} \geq 200$. Espermatozoides que apresentaram $\text{STR} > 80\%$ foram

considerados progressivos e com $LIN \geq 40\%$ caracterizados com movimento linear. Foram utilizados os dados dos parâmetros de cada espermatozoide das amostras para análise.

Funcionalidade da membrana plasmática

Foi avaliada a funcionalidade da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico (HOST; JEYENDRAN *et al.*, 1984), que se baseia na observação das caudas enroladas ou inchadas dos espermatozoides após exposição a uma solução hiposmótica de 100 mOsm. Amostras de sêmen foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Foram contados 200 espermatozoides por amostra, considerando aqueles com cauda enrolada ou inchada como possuidores de membrana plasmática funcional (HOST+).

Integridade de membrana plasmática

Para a análise da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides (IMP) uma alíquota de sêmen (5 µL) foi submetida à associação dos fluorocromos SYBR-14 e iodeto de propídio (20 mM; Live/Dead Sperm Viability®). Foram contados 200 espermatozoides sob imersão em óleo, sob magnitude de 1000 vezes, em microscópio de epifluorescência (Nikon® 50i, Japão), usando o filtro com comprimento de onda de excitação de 450–490 e de emissão de 515 nanômetros. As membranas plasmáticas dos espermatozoides foram classificadas como: íntegras (cabeça corada de verde) e lesadas (cabeça corada de vermelho) sendo os resultados expressos em percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (IMP+).

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) foi avaliado utilizando a sonda fluorescente CellROX Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) em uma concentração final de 5 µM (Castro *et al.*, 2016). Foi realizada a leitura de 200 espermatozoides sob imersão em óleo, sob magnitude de 1000 vezes, em microscópio de epifluorescência (Nikon® 50i, Japão), usando o filtro com comprimento de onda de excitação de 450–490 e de emissão de 515 nanômetros. Os espermatozoides foram classificados de acordo com a intensidade da coloração verde observada na cabeça como possuindo (verde intenso) ou não (verde fraco) sinais de estresse oxidativo sendo os resultados expressos em percentual de espermatozoides sem sinais de estresse oxidativo (EO-).

Potencial de membrana mitocondrial

O potencial da membrana mitocondrial dos espermatozoides (PMM) foi avaliado através da coloração com JC-1 (5,50,6,60-tetracloro-1,10,3,30-iodeto de tetraetilbenzimidazolil-carbocianina, T3168, Invitrogen), seguindo protocolo descrito por Oztürk *et al.* (2020). Foi preparada uma solução estoque de JC-1 (1,53 mM) em solução de dimetilsulfóxido que após a filtração foi armazenada a -20 °C. Foram contados 200 espermatozoides sob magnitude de 400 vezes, em microscópio de fluorescência (Nikon® 50i, Japão). A fluorescência amarela ou laranja emitida pela peça intermediária indicava alto potencial de membrana mitocondrial. Por outro lado, a coloração verde da peça intermediária indicou baixo potencial de membrana mitocondrial. Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM+).

Delineamento experimental e análise estatística

Para estudar os efeitos da concentração de BDNF (Fator 1), tempos de exposição (Fator 2) e da interação entre eles, os dados foram submetidos à estatística paramétrica e não paramétrica. Para determinar o cumprimento dos pressupostos necessários para aplicação de estatística

paramétrica, os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Hartley). Aqueles que não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram transformados pelo arco seno da raiz quadrada. Aqueles que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade antes (MT, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH e WOB) e após terem sido transformados (MP, BCF, HYPER, RAP, IMP+, PMM+) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo Teste F e, posteriormente, foi aplicado o teste post-hoc de Tukey para comparar as médias entre si. Para estas análises foi utilizado um modelo misto (PROC MIXED) usando-se a seguinte equação:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Onde: Y_{ij} é a variável dependente ou parâmetro espermático, μ é a média de todas as observações, T_i representa o efeito das concentrações de BDNF (0, 10, 20, 40 e 80 µg/L), β_j é o efeito dos tempos de exposição ao BDNF (T5 e T30), $(T\beta)_{ij}$ representa o efeito da interação entre as concentrações e os tempos de exposição ao BDNF, e ε_{ij} representa o erro experimental.

Para os dados que mesmo após a transformação permaneceram sem distribuição normal (STR, EO- e HOST+) foi aplicada estatística não paramétrica, utilizando-se uma análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis com o teste post-hoc de Dunn. Todas as avaliações foram feitas considerando-se 95% de confiança e usando-se o SAS® (Versão 9.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos aos efeitos das concentrações e tempo de exposição ao BDNF e da interação entre estes dois fatores estão expostos respectivamente nas Tabelas 1 e 2, e na Figura 1.

Não foi observado nenhum efeito ($P > 0,05$) das concentrações de BDNF (Fator 1) sobre os parâmetros cinéticos dos espermatozoides. As concentrações de BDNF afetaram significativamente ($P < 0,05$) o HOST+, IMP+, EO- e PMM+ sendo 10 µg/L a que apresentou os maiores percentuais de espermatozoides com estas características.

O tempo de exposição ao BDNF (Fator 2) influenciou significativamente ($P < 0,05$) os parâmetros MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB e HYPER. Os valores destes parâmetros foram menores ($P < 0,05$) no T30 em relação ao T5. Os demais parâmetros STR, ALH, BCF, RAP, HOST+, IMP+, EO- e PMM+ não foram influenciados ($P > 0,05$) pelo tempo de exposição ao BDNF.

Tabela 1. Médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco de carneiros submetido à diferentes concentrações do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

Parâmetros	Concentrações de BDNF (µg/L)				
	0	10	20	40	80
HOST+ (%)	56,60 $\pm$ 10,00 ^b	74,80 $\pm$ 27,80 ^a	61,20 $\pm$ 7,94 ^b	53,60 $\pm$ 5,05 ^b	60,90 $\pm$ 4,34 ^b
IMP+ (%)	48,80 $\pm$ 4,70 ^b	76,80 $\pm$ 2,82 ^a	41,80 $\pm$ 4,02 ^b	43,90 $\pm$ 12,26 ^{bc}	33,80 $\pm$ 9,12 ^c
EO- (%)	38,20 $\pm$ 14,92 ^b	68,40 $\pm$ 6,05 ^a	35,10 $\pm$ 3,72 ^b	37,60 $\pm$ 6,85 ^b	34,80 $\pm$ 18,77 ^b
PMM+ (%)	48,0 $\pm$ 10,81 ^b	75,80 $\pm$ 5,94 ^a	42,30 $\pm$ 7,54 ^b	41,50 $\pm$ 5,52 ^b	29,30 $\pm$ 5,05 ^c

HOST+ – membrana plasmática funcional; IMP+ membrana plasmática íntegra; EO- – sem estresse oxidativo; PMM+ – alto potencial de membrana mitocondrial. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 2. Médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco de carneiros submetido à diferentes tempos de exposição ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

Parâmetros	Tempo de exposição (min)	
	T5	T30
MT (%)	72,31 $\pm$ 18,56 ^a	50,40 $\pm$ 19,08 ^b
MP (%)	36,17 $\pm$ 25,17 ^a	7,94 $\pm$ 7,67 ^b
VCL (μ m/s)	158,92 $\pm$ 20,21 ^a	131,77 $\pm$ 24,35 ^b
VSL (μ m/s)	94,11 $\pm$ 20,75 ^a	69,89 $\pm$ 18,96 ^b
VAP (μ m/s)	105,99 $\pm$ 24,20 ^a	78,42 $\pm$ 17,66 ^b
LIN (%)	59,66 $\pm$ 7,49 ^a	52,18 $\pm$ 9,57 ^b
WOB (%)	66,39 $\pm$ 7,87 ^a	59,52 $\pm$ 5,65 ^b
HYPER (%)	5,73 $\pm$ 5,24 ^a	2,27 $\pm$ 3,71 ^b

T5 e T30 – tempos de exposição ao BDNF de 5 minutos e de 30 minutos respectivamente; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; VCL – velocidade curvilínea; VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade do percurso médio; LIN – linearidade; WOB – índice de oscilação dos espermatozoides; HYPER – hiperatividade. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

A análise das interações entre concentrações e tempos de exposição ao BDNF revelou efeito significativo ($P < 0,05$) apenas sobre o HOST+. A interação de 10 μ g/L de BDNF com T30 apresentou maior ($P < 0,05$) HOST+ em relação às demais interações.

Esse foi o primeiro trabalho a investigar o efeito da adição de diferentes concentrações de BDNF sobre a qualidade do sêmen fresco de carneiros. Nesse trabalho foi observado que a adição da proteína BDNF conferiu efeitos positivos à qualidade espermática na concentração de 10 μ g/L. A adição do BDNF no sêmen fresco de humanos em uma concentração semelhante (0,133 nM; aproximadamente 9,5 μ g/L) também foi benéfica à qualidade espermática, pelo aumento da atividade mitocondrial e motilidade e redução da peroxidação lipídica (SAFARI *et al.*, 2017). No nosso trabalho, não encontramos melhoria da qualidade da motilidade como descrito pelos autores, entretanto, detectamos benefícios diretos e indiretos semelhantes pelos maiores percentuais de espermatozoides com membrana plasmática funcional e íntegra, menor estresse oxidativo e alto potencial de membrana mitocondrial.

Níveis acima de 10 μ g/L de BDNF (20, 40 e 80 μ g/L) mantiveram a cinética inalterada, mas não foram capazes de evitar a redução da funcionalidade e integridade de membrana plasmática, do potencial de membrana mitocondrial e do estresse oxidativo dos espermatozoides. A adição de 10 μ g/L BDNF pode ter sido a única capaz de ter ampliado a atividade da catalase e regulado enzimas antioxidantes, a exemplo da glutatona e diminuído a ativação da SOD, estabilizando a concentração de EROs em níveis aceitáveis, prevenindo assim o estresse oxidativo nos espermatozoides (NAJAFI *et al.*, 2017).

A adição do BDNF no sêmen de carneiros melhorou a atividade mitocondrial dos espermatozoides supostamente por sua atuação em regular o metabolismo e o potencial de membrana mitocondrial, cujo efeito pode ser atribuído ao estímulo da ativação da via PI3K/Akt (LI *et al.*, 2012). A investigação dos efeitos da concentração de 10 μ g/L de BDNF na ativação da PI3K/Akt pode ajudar a entender o seu mecanismo de regulação do metabolismo e proteção antioxidante no espermatozoide uma vez que essa via pode manter a motilidade, viabilidade, integridade do DNA e potencial de membrana mitocondrial, inibindo a ativação das caspases e eventos ligados à apoptose (KOPPERS *et al.*, 2011; BOLANOS *et al.*, 2014).

O fato de 10 µg/L de BDNF ter apresentado os melhores efeitos sobre a qualidade dos espermatozoides em relação às maiores concentrações pode ser atribuído à regulação da expressão gênica que frequentemente segue o mecanismo de dose-resposta, onde concentrações mais baixas podem resultar em modulações específicas e desejadas. Embora maiores concentrações de BDNF ainda possam ativar os receptores, a saturação ou ativação excessiva de outras vias de sinalização interligadas por retroatividade podem comprometer a expressão gênica (KOCHEN *et al.*, 2022). A concentração de 10 µg/L mostrou-se como o limiar de dose-resposta capaz de ativar todos os receptores do BDNF e promover efeitos benéficos sobre os espermatozoides. Concentrações superiores a esse valor parecem gerar um excesso do fator, o que não potencializa os efeitos positivos e pode até reduzi-los.

O fato de ter sido observada uma melhoria no percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional quando o sêmen foi incubado com 10 µg/L durante 30 minutos reforça a superioridade desta concentração. É de se esperar que haja uma natural deterioração das estruturas e funções dos espermatozoides no sêmen de carneiro submetido a uma solução com baixa concentração em elementos que o conservem apropriadamente sob temperaturas elevadas como a de 37°C. O uso de diluidor de sêmen adequado à espécie contendo elementos específicos além daqueles que mantêm o pH e a osmolaridade como o PBS poderia manter os espermatozoides em condições que os ajudassem a suportar melhor o tempo de incubação. Estes elementos específicos encontrados na composição destes meios poderiam promover a estabilização da membrana plasmática e fornecer energia metabólica necessárias aos espermatozoides para enfrentar o desafio imposto pela incubação. A ausência desses componentes no meio de incubação deve ser considerada na interpretação dos resultados quanto à qualidade dos espermatozoides. Apesar do meio de incubação utilizado por nós não possuir todos os elementos para manutenção dos espermatozoides sob incubação, a concentração de BDNF de 10 µg/L foi capaz de manter a qualidade espermática mesmo após 30 minutos representada pelo maior percentual destas células com membrana plasmática funcional. As demais concentrações não tiveram o mesmo desempenho, provavelmente não sendo capazes de evitar os danos oxidativos que naturalmente ocorreram durante a incubação.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição do BDNF na concentração de 10 µg/L melhora a qualidade do sêmen de carneiros.

Palavras-chave: antioxidantes; cinética espermática; membrana plasmática; neurotrofinas; ovinos.

AGRADECIMENTOS

UFS, CAPES, FAPITEC, CNPQ, EMBRAPA.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. DE; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BAUMBER, J. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1025–1033, 2002. DOI: 10.1016/S0093-691X(01)00710-5.

BILODEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 3, p. 1105–1122, 2002.

BOLANOS, G. J. M.; BALAO, S. C. M.; MARTIN, P. M.; ANTOLIN, M. R. Phosphorylated AKT preserves stallion sperm viability and motility by inhibiting caspases 3 and 7. **Reproduction**, v. 148, n. 2, p. 221–235, 2014.

BUCAK, M. N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060–1067, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.12.004.

CASTRO, L. S. et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/8213071.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2013.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219–228, 1984. DOI: 10.1530/jrf.0.0700219.

KOCHEN, M. A. et al. Dynamics and Sensitivity of Signaling Pathways. **Current Pathobiology Reports**, v. 10, p. 11–22, 2022. DOI: 10.1007/s40139-022-00230-y.

KOPPERS, A. J. et al. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 436, p. 687–698, 2011. DOI: 10.1042/BJ20110114.

LI, C. et al. The expression and putative role of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 636–643, 2012. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.003.

LI, M.; CHANG, H.; XIAO, X. BDNF Val66Met polymorphism and bipolar disorder in European populations: A risk association in case-control, family-based and GWAS studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 218–233, 2016.

NAJAFI, A. *et al.* Effect of brain-derived neurotrophic factor on sperm function, oxidative stress and membrane integrity in human. **Andrologia**, v. 49, p. e12601, 2017. DOI: 10.1111/and.12601.

ÖZTÜRK, A. E. *et al.* The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. **Cryobiology**, v. 95, p. 157-163, 2020.

SAFARI, H. *et al.* Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on sperm quality of normozoospermic men. **Human Fertility**, v. 21, p. 248–254, 2017 DOI: 10.1080/14647273.2017.1346301.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958–978, 2006. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.010.

SKAPER, S. D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. In: **Neurotrophic factors: Methods and protocols**. New York: Springer, 2012. p. 1–12.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 189–197, 2001. DOI: 10.1016/S1382-6689(01)00099-0.

XIU, M. H. *et al.* Interrelationships between BDNF, Superoxide Dismutase, and Cognitive Impairment in Drug-Naive First-Episode Patients with Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 1498–1510, 2020.

ANEXO – PROGRAMAÇÃO

DIA 23/08/2024 – Sexta-Feira

09h00 – 09h15: Abertura

09h15 – 09h30: Análise química dos óleos essenciais extraídas de plantas de *Croton blanchetianus* coletadas em municípios de Sergipe. (Palestrante: Fabiany de Andrade Brito)

09h30 – 09h45: Caracterização molecular de germoplasma de *Croton blanchetianus* coletado em municípios do Estado de Sergipe. (Palestrante: Itamara Bomfim Gois)

09h45 - 10h00: Caracterização morfoagronômica de germoplasma de *Croton blanchetianus* do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da UFS. (Palestrante: Ryan Santos Ribeiro)

10h00 - 10h15: Caracterização química dos óleos essenciais de acessos de *Croton grewioides*. (Palestrante: Laura Catharine Dória Prata Lima)

10h15 – 10h30: coffee break

10h30 - 10h45: Toxicidade do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre *Spodoptera frugiperda*. (Palestrante: Sandy Maria Santos Passos)

10h45 - 11h00: Tabela de vida de *Podisus nigrispinus* tratados com óleo essencial de *Lippia sidoides*. (Palestrante: Valfran Silva Andrade)

11h00 - 11h15: Toxicidade do óleo essencial de *Croton grewioides* sobre *Podisus nigrispinus* (Palestrante: Heloisa Safira Santos Pinheiro)

11h15 - 11h30: Resposta olfativa do *Euschistus heros* tratados com o óleo essencial de *Lippia gracilis*. (Palestrante: Sandy Maria Santos Passos)

11h30 - 11h45: Efeitos subletais do essencial de *Lippia gracilis* sobre o percevejo-marrom-da-soja. (Palestrante: Heloisa Safira Santos Pinheiro)

14h00 - 14h30: Fungos entomopatogênicos da região semiárida do estado de Sergipe: isolamento, caracterização e aplicação no controle biológico de pragas agrícolas. (Palestrante: Tarcio Souza Santos)

14h30 - 14h45: Formulação bioinseticida à base de conídios de fungo entomopatogênico microencapsulados por Spray Drying. (Palestrante: Matheus Goulart de Jesus Seabra)

14h45 - 15h00: Propriedades antioxidantes do feno de *Moringa oleifera* e seu efeito sobre a capacidade reprodutiva de carneiros (Palestrante: Michele Pereira da Silva)

15h00 - 15h15: Influência do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na qualidade do sêmen de carneiros. (Palestrante: Matheus Batista de Oliveira)

15h15 - 15h45: Mesa Redonda: Perspectivas e ações necessárias para transformar recursos genéticos do semiárido em produtos sustentáveis para o agronegócio. (Debatedores: Arie Fitzgerald Blank, Leandro Bacci, Hymerson Costa Azevedo, Gladston Rafael de Arruda Santos, Marcelo da Costa Mendonça)

15:45h - Encerramento