



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS/AGROECOSSISTEMAS DA AMAZÔNIA**

**ERYKA DE NAZARÉ REZENDE MORAES**

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE DUAS ESPÉCIES DE MUSGOS (Bryophyta) E  
AÇÃO DE SEUS EXTRATOS SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)  
(Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO (*Zea mays* L.)**

**Tese apresentada à Universidade Federal Rural  
da Amazônia, como parte das exigências do  
Curso de Doutorado em Ciências Agrárias: área  
de concentração Agroecossistemas da Amazônia,  
para obtenção do título de Doutor.**

**Orientador:**

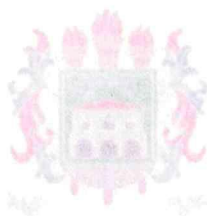
**Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa**

**Co-Orientador:**

**Dr. Wilson José Mello e Silva Maia**

**BELÉM-PA**

**2014**



Moraes, Eryka de Nazaré Rezende

Constituintes químicos de duas espécies de musgos (Bryophyta) e ação de seus extratos sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays* L.) / Eryka de Nazaré Rezende Moraes. - Belém, 2014.

129 f.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Belém, 2014.

Área de concentração Agroecossistemas da Amazônia.

1. *Sematophyllum subsimplex* – análise química. 2. *Leucobryum martianum* – análise química. 3. *Spodoptera frugiperda* – controle. 4. Inseticida. I. Título.

CDD – 588.2





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS/AGROECOSSISTEMAS DA AMAZÔNIA

ERYKA DE NAZARÉ REZENDE MORAES

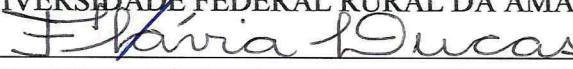
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE DUAS ESPÉCIES DE MUSGOS (Bryophyta) E  
AÇÃO DE SEUS EXTRATOS SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH)  
(Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO (*Zea mays* L.)

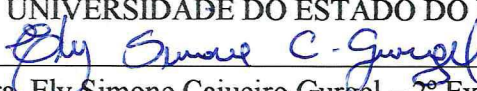
Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do  
Curso de Doutorado em Ciências Agrárias: Área de concentração Agroecossistemas da  
Amazônia, para obtenção do título de Doutor.


Aprovado em 12 /02 /2014.

BANCA EXAMINADORA


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa - Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

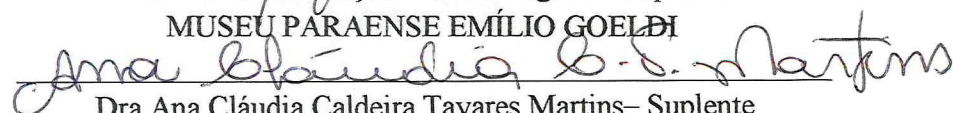
  
\_\_\_\_\_  
Dra Flávia Cristina Araújo Lucas – 1º Examinador  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ely Simone Cajueiro Gurgel – 2º Examinador  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alessandro Silva do Rosário – 3º Examinador  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Manoel Tavares de Paula – 4º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria das Graças Bichara Zoghbi – Suplente  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

  
\_\_\_\_\_  
Dra Ana Cláudia Caldeira Tavares Martins – Suplente  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI

*Se a luta é muito grande, nunca perca a fé, olhai para Deus... Ele entrará na guerra e pelejará por você. Levante os seus olhos e veja o sobrenatural acontecer, pois as promessas de Deus nunca falham... Ele não desiste de você, modifica a sua trajetória e lhe entrega a vitória, tudo por seu imenso amor.*

*Ele não desiste !!!*

*Marquinhos Gomes – “Não Morrerei”(adaptado)*

Dedico,

*A Deus, minha inspiração, minha força, meu amor maior.*

*Aos meus pais Paulo e Edna Moraes.*

*Ao Meu esposo e filhos Luiz, Luize e Emmanuel  
Guimarães*

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pois sem **Ele** nada em minha vida seria possível, quando tudo parecia perdido **Ele** me deu forças e me resgatou em rumo a vitória.

Aos meus pais PAULO e EDNA pelo grande incentivo, amor incondicional e dedicação para que eu pudesse chegar até aqui com dignidade e força de vontade.

Aos meus amores LUIZ e LUIZE, pela força, apoio, afeto, carinho e por acreditar que tudo seria possível. Ao meu baby Emmanuel que ainda no ventre materno, me acompanhou nesta jornada.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ) pela bolsa concedida;

À Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, pela realização do curso de Doutorado;

Ao coordenador do curso de Doutorado, Prof<sup>o</sup> Dr. Francisco de Assis Oliveira, pelas palavras sábias de apoio, incentivo e colaboração para conclusão deste curso.

As secretárias da Pós-graduação, Shyrlei e Shyrle pelo carinho, amizade e disponibilidade em colaborar com seus atendimentos.

Ao Prof. Dr. Roberto Cesar Lobo e o Prof. Dr. Wilson Maia pela disponibilidade na orientação e pelo conhecimento repassado.

Aos graduandos da UFRA, Thiago, Alan e Nájla pela ajuda e momentos de descontração no LABIN/ICA/UFRA;

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela logística na pessoa da Dra. Anna Luiza Ilkiu-Borges, Coordenadora do Departamento de Botânica e do Lab. de Briologia, pela grande ajuda e colaboração em todos os momentos que precisei utilizar as dependências da Instituição para estudo, identificação e triagem das espécies de briófitas.

À Universidade Federal do Pará na pessoa da Dra Eloísa Andrade, Coordenadora do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), pela disponibilidade em realizar as análises fitoquímicas, junto a Rafaela, técnica deste mesmo laboratório, pelo auxílio na preparação das amostras dos aromas e leitura cromatográfica.

Aos Doutores Alberto e Mara Arruda, coordenadores do Laboratório da Central de Extração Química da Universidade Federal do Pará (UFPA). A equipe deste laboratório na pessoa do Elinaldo pela permissão e auxílio na preparação dos extratos, e aos novos amigos Manolo e Jesiel, Doutorandos essenciais para preparação dos extratos, quanto na preparação das concentrações testadas.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições feitas no trabalho;

Às Dra. Manuela Fernandes da Silva e Maria das Graças Zoghbi, por aceitar a me orientar no início do curso, mesmo não podendo dar continuidade no decorrer do doutorado.

À Dra. Regina Lobato Lisboa mãe na carreira científica que me ensinou muito do que sei e do que sou como pesquisadora.

Aos professores deste curso pelos conhecimentos repassados;

À minha inseparável amiga e irmã de alma, Rita de Cássia, amiga para toda vida e todos os momentos, seja na elaboração desta Tese ou em qualquer momento. uma parceria eterna.

Ao meu compadre M.Sc. Alcindo Martins, pela amizade e incentivo.

Às briólogas e colegas de trabalho do Laboratório de Briologia-MPEG, Ana Claudia, Ana Paula, Eline, Eliete e Luciana pelos bons e momentos de alegria.

Ao Dr. Alessandro Rosário (MPEG), pelo incentivo, apoio, além da grande amizade.

A Dra. Ely Simone pela amizade e pelo seu apoio no momento em que precisei.

Ao bolsista de PIBIC, Giovani, aluno da Dra. Ana Claudia, que se prontificou a colaborar regando as mudas de milho.

Ao grande “Doquinha” funcionário desta instituição, pessoa agradabilíssima e sempre disponível para tudo que precisei para condução do experimento.

Aos colegas de Doutorado pelo companheirismo durante o curso;

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho O meu muito obrigado.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b>	p. 11
<b>ABSTRACT GENERAL</b>	12
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO..</b>	13
1.1. IMPORTÂNCIA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS BRIÓFITAS	13
1.2. PROPRIEDADE ANTIFÁGICA (FAGODETERRENTE) E/OU INSETICIDA DAS BRIÓFITAS	16
1.3 A CULTURA DO MILHO, O DANO CAUSADO PELA LAGARTA-DO-CARTUCHO <i>Spodoptera Frugiperda</i> E A PERSPECTIVA DO USO DE EXTRATOS DE BRIÓFITAS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE PRAGAS..	19
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	23
<b>2. Constituintes Químicos voláteis de duas espécies de briófitas (Bryophyta), ocorrentes na Amazônia brasileira, Pará, Brasil</b>	36
<b>RESUMO.</b>	36
<b>ABSTRACT</b>	37
<b>2.1. INTRODUÇÃO.</b>	38
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
2.2.1. ÁREA DE ESTUDO E ESCOLHA DAS ESPÉCIES DE MUSGOS	42
2.2.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	43
2.2.3 OBTENÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS	44
2.2.4 ANÁLISE DO CONCENTRADO VOLÁTIL EM POR CG-EM	44
2.2.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	45
<b>2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	45
2.3.1 CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS	46
<b>REFERÊNCIAS</b>	52
<b>3. EFEITO DO EXTRATO DE <i>Sematophyllum subsimplex</i> (Hedw). Mitt. (Bryophyta) SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO (<i>Zea mays</i> L.).</b>	64
<b>RESUMO</b>	65
<b>ABSTRACT</b>	65
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b>	66
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	68
3.2.1 SELEÇÃO, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.	68
3.2.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO	69
3.2.3 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES	69
3.2.4. BIOENSAIO EM LABORATÓRIO	70
3.2.4.1 Criação de <i>spodoptera frugiperda</i>	70
3.2.4.2 Experimento: Teste por ingestão sem chance de escolha	71
3.2.4.3 Procedimentos estatísticos	72
3.2.4.4. Análise dos dados	72
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	73

3.3.1 FAGODETERRÊNCIA	73
3.3.1.1 Após 24 horas	73
3.3.1.2 Após 48 horas	74
3.3.1.3. Após 72 horas	76
3.3.2 MORTALIDADE	79
3.3.2.1 Após 24 horas	79
3.3.2.2 Após 48 horas	80
3.3.2.3 Após 72 horas	81
REFERÊNCIAS	86
4. EFEITO DE EXTRATO DE <i>Leucobryum martianum</i> (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall. (Bryophyta) NO CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO ( <i>Zea mays</i> L.)	93
RESUMO	93
ABSTRACT	94
4.1 INTRODUÇÃO	95
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	97
4.2.1 SELEÇÃO, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	97
4.2.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO	98
4.2.3 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES	99
4.2.4 BIOENSAIO EM LABORATÓRIO	99
4.2.4.1. Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	99
4.2.4.2. Experimento: teste por ingestão sem chance de escolha	100
4.2.4.3. Delineamento experimental	101
4.2.4.4. Análise dos dados	101
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
4.3.1 HERBIVORIA	102
4.3.1.1 Após 24 horas	102
4.3.1.2 Após 48 horas	103
4.3.1.3 Após 72 horas	105
4.3.2 MORTALIDADE	107
4.3.2.1 Após 24 horas	107
4.3.2.2 Após 48 horas	108
4.3.2.3 Após 72 horas	110
REFERÊNCIAS	113
CONCLUSÕES GERAIS	120
ANEXOS	122



## RESUMO GERAL

As briófitas (musgos, hepáticas e antóceros), são plantas amplamente distribuídas no mundo com aproximadamente 15.100 espécies. As análises químicas deste grupo tiveram início no século XIX e nas últimas décadas, as pesquisas fitoquímicas dos constituintes briofíticos e sua atividade biológica vem progredindo. Isto é possível devido ao maior entendimento sobre a biologia das suas espécies e ao refinamento progressivo em técnicas analíticas. Aproximadamente 1.000 espécies de briófitas já foram analisadas quanto a sua química e os resultados demonstraram que as substâncias identificadas são de interesse, pertencendo as classes dos terpenos, compostos aromáticos e fenólicos, aldeídos, esteróides, acetogeninas, alcalóides (flavonóides), taninos, saponinas, ácidos graxos, glicosídeos cardíacos, onde apresentaram aromas característicos, sabor amargo ou pungente, além de exibir propriedades medicinais, antibióticas, antifúngicas, antiviral, antifágicas, citotóxicas entre outras. No Brasil, o conhecimento químico se restringe apenas a dois trabalhos de briófitas. Diante de um campo promissor para ciência e considerando as comprovações científicas, o presente trabalho teve como objetivo determinar a composição química de *Sematophyllum subsimplex* Hedw. Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall. ocorrentes na Amazônia brasileira e avaliar a bioatividade dos seus compostos no controle da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) no 2º instar em milho. As coletas foram realizadas no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Bárbara, Pará, o material foi seco ao sol e conservado em ambiente refrigerado. Foi feito o processo de identificação, triagem, e desidratação e os constituintes voláteis foram obtidos por micro destilação-extração simultânea (DES) e analisados por cromatografia de fase gasosa/espectrometria de massas (CG-EM) em sistema Thermo. O extrato foi obtido por trituração e maceração a frio com etanol PA e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram aplicados cinco tratamentos (2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/µL e o controle com DMSO) para a realização dos testes de mortalidade e fagodeterência sobre as lavas de 2º instar de *S. frugiperda* com avaliação nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância, para fagodeterência e suas médias comparadas pelo teste U de Mann-Whitney e para mortalidade foi aplicado o teste de Fischer com modificação de Tocher. Foram identificados 42 constituintes químicos, pertencentes ao grupo terpenos, ácidos graxos, aldeídos, hidrocarbonetos aromáticos, álcool, ésteres e éteres. O hidrocarboneto aromático naftaleno obteve maior área relativa em ambas as espécies, o composto Saffrol é constatado pela primeira vez em musgo. De acordo com as análises do composto volátil pode-se estimar que as espécies estudadas são fontes de terpenos, ácidos graxos, aldeídos aromáticos. Os bioensaios com *S. subsimplex* revelaram que a concentração de 0,25µg/µl foi positiva para fagodeterência logo após 24 horas, e mortalidade acentuada em todas as concentrações dos tratamentos sugerindo efeito tóxico. Para *Leucobryum martianum*, a aplicação do extrato sugeriu fagodeterência independente da concentração, e na mortalidade o tratamento na concentração de 0,25µg/µl apresentou um possível efeito tóxico após 48 horas. Conclui-se que a concentração de 0, 25µg/µl, é suficiente para controlar a lagarta no 2º instar. Este trabalho é o primeiro no Brasil a testar os efeitos inseticida e/ou fagodeterrente (antifágico) das espécies de musgos selecionadas para o estudo, servindo como subsídio para trabalhos futuros que também possam enveredar para esse ramo promissor que é o conhecimento dos constituintes químicos ativos de briófitas.

**Palavras-chave:** Fitoquímica, Extratos vegetais, *Sematophyllum subsimplex*, *Leucobryum martianum*, Inseticida, Fagodeterência.



## ABSTRACT GENERAL

Bryophytes (mosses, liverworts and hornworts) are widely distributed plants in the world with approximately 15,100 species. The chemical analyzes of this group began in the nineteenth century and in recent decades, the phytochemical researches of the bryophytes constituents and their biological activity is progressing. This is possible due to the greater understanding of the biology of their species and the progressive refinement in analytical techniques. Approximately 1,000 species of bryophytes have been analyzed for their chemical and the results demonstrated that the identified substances are of interest, belonging to the classes of terpenes, aromatic and phenolic compounds, aldehydes, steroids, acetogenins, alkaloids (flavonoids), tannins, saponins, fatty acids, cardiac glycosides, which showed characteristic aromas, bitter or pungent taste, besides exhibiting medicinal, antibiotic, antifungal, antiviral, antifeedant, cytotoxic, and other properties. In Brazil, the chemical knowledge is confined to two works of bryophytes. Facing a promising field for the science and considering the scientific evidences, the present study aimed to determine the chemical composition of *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. and *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. occurring in the Brazilian Amazon, and assess the bioactivity of its compounds in controlling of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in the second instar on corn. The collections were made in Parque Ecológico de Gunma, municipality of Santa Bárbara, Pará State, the material was dried under the sun and kept refrigerated. The process for identifying, sorting, and dehydration was performed and the volatile constituents were obtained by micro simultaneous distillation extraction (SDE) and analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) in Thermo system. The extract was obtained by trituration and cold maceration with PA ethanol and diluted in dimethylsulfoxide (DMSO). Five treatments were applied (2.0, 1.0, 0.5 and 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and the control with DMSO) for the realization of mortality and antifeedant tests in larvae of second instar of *S. frugiperda* with evaluation at intervals of 24, 48 and 72 hours. The experimental data were subjected to analysis of variance, for antifeedant and their means compared by Mann-Whitney U test and for mortality was applied Fischer's test with Tocher's modification. 42 chemical constituents were identified belonging to the group of terpenes, fatty acids, aldehydes, aromatic hydrocarbon, alcohol, esters and ethers. The aromatic hydrocarbon naphthalene obtained the highest relative area in both species, the saffrole compound is found for the first time in moss. According to the analyzes of the volatile compound, it is possible to estimate that studied species are sources of terpenes, fatty acids, aromatic aldehydes. The bioassays with *S. subsimplex* revealed that the concentration of 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  were positive for the antifeedant effect after 24 hours and increased mortality in all treatment concentrations, suggesting toxic effect. To *Leucobryum martianum*, the application of the extract suggested antifeedant effect independent of concentration, and in mortality the treatment in the concentration of 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  presented a possible toxic effect after 48 hours. It was concluded that the concentration of 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  is sufficient to control the caterpillar in the second instar. This work is the first in Brazil to test the insecticide effects and/or antifeedant activity of species of mosses selected for the study, serving as a resource for future works that may also embark to this promising branch that is the knowledge of the active chemical constituents of bryophytes.

**Keywords:** phytochemical, plant extracts, *Sematophyllum subsimplex*, *Leucobryum martianum*, insecticide, antifeedant activity.



## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 IMPORTÂNCIA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS BRIÓFITAS

As briófitas são representadas por três linhagens distintas de plantas criptogâmicas terrestres: os antóceros (Antocerotophyta), as hepáticas (Marchantiophyta) e os musgos (Bryophyta) (CRANDALL-STOTLER; STOTLER, 2000; STOTLER; CRANDALL-STOTLER, 2005; GOFFINET; BUCK, 2004). Estão amplamente distribuídas no mundo com 15.100 a 18.000 espécies (GRADSTEIN et al., 2001), sendo 1.521 listadas para flora do Brasil e 561 para Amazônia brasileira (COSTA, 2010).

São plantas avasculares, de porte discreto no ecossistema, apresentando uma estrutura relativamente simples, devido não possuírem epiderme e nem cutícula (RAO, 1982; GLIME, 2007). Apesar do tamanho diminuto (maioria até 10 cm), esse grupo possui ampla distribuição geográfica, ocupando quase todos os ecossistemas terrestres; toleram situações ambientais extremas, com exceção dos ambientes marinhos, onde ainda não foi relatada nenhuma ocorrência (DELGADILLO; CÁRDENAS, 1990; FRAHM, 2003; LEMOS-MICHEL, 2001; LISBOA, 1993).

A importância ecológica das briófitas é de grande relevância (SHEPHERD, 2003), pois são pioneiras no processo de sucessão vegetacional, estabilizando o solo, proporcionando meio adequado para germinação das sementes e estabelecendo as comunidades vegetais (WELCH, 1984). Auxiliam na composição da biomassa dos ecossistemas, no controle da erosão do solo e assoreamento dos rios, já que geralmente desenvolvem-se em tapetes extensos que conseguem reter grande quantidade de água (ANDO; MATSUO 1984; GLIME, 2007). Crescem em hábita diversos, colonizam diferentes substratos (inclusive cupinzeiros e concretos), tendo preferência por lugares úmidos e sombrios, devido à dependência da água para se reproduzir (DELGADILLO; CÁRDENAS, 1990; FUDALI, 2000; GLIME; SAXENA, 1991; LISBOA, 1993; MORAES, 2006; SCHOFIELD, 1985).

Um dos principais usos das briófitas é como indicadores ambientais ou bioindicadores (ANDO; MATSUO, 1984; GLIME, 2007). Como indicadores ecológicos, estudos mostram serem boas indicadoras da qualidade do solo nas florestas, das condições de pH e níveis de água; como indicadores de depósitos minerais, podem concentrar minerais do solo ou do substrato que se encontram. Algumas espécies são associadas a depósitos minerais como os “musgos do cobre” que ocorrem em ambientes com alta concentração deste mineral



(SCHATZ, 1995). São indicadoras de poluição ambiental, pois concentram a deposição de material seco sobre seu gametófito, por transportarem água e nutrientes com facilidade entre as células devido à falta de vasos lignificados e por acumularem metais de forma passiva. Estudos nesse sentido são desenvolvidos principalmente na Europa, China e Japão (ANDO; MATSUO, 1984; CAMPOS, 1999; FATOBA et al., 2012; FOAN, SIMON, 2012; GLIME, 2007; LISBOA; ILKIU-BORGES, 1995; LISBOA; ILKIU-BORGES, 1996; MORAES; LISBOA, 2006; RAO, 1982; SCHATZ, 1995).

Economicamente, podem ser empregadas em decoração, como meio de cultura para orquídeas, em jardinagem, como aditivo para o solo, combustível (turfa), material de enchimento, acondicionamento e transporte de mudas e vasos de bonsai. São utilizadas na fabricação de uísque escocês e produzem fragrâncias e sabores característicos (ANDO; MATSUO, 1984; DELGADILLO; CÁRDENAS, 1990; DING, 1982; GLIME, 2007; 2013; MOLOZZI et al., 2003; WU, 1982).

É possível que uma das características que ajudou as briófitas a sobreviver e manter, seu lugar na flora atual tenha sido o seu teor de compostos biologicamente ativos. Estes protegem as plantas delicadas, não somente de fungos, vírus e microorganismos, mas de insetos e lesmas, que são comuns nos hábitats das briófitas. Esses componentes bioquímicos provavelmente vêm compensar a falta de uma cutícula espessa e do córtex em briófitas (PERES, 2004; SAXENA; HARINDER, 2004; SIMÕES, 2007).

O uso das briófitas como plantas medicinais é conhecido desde tempos antigos, por distintos grupos étnicos (FERNANDEZ; SERRANO, 2009). Algumas espécies de *Barbula* Hedw, *Bryum* Hedw, *Mnium* W.m, *Philonotis* Brid, e as espécies *Octoblepharum albidum* Hedw e *Polytrichum juniperum* Hedw. eram utilizadas por índios norte-americanos como medicamentos, para curar feridas, hematomas, queimaduras, febre e dores no corpo (STURTEVANT, 1954; FERNANDEZ; SERRANO, 2009). Na França, *Marchantia polymorpha* L. foi consumida para aumentar a diurese (BASILE et al., 1998).

Na cultura européia utilizavam espécies do gênero *Sphagnum* por suas propriedades absorventes (bandagens) e seus efeitos bactericidas, sobretudo em forma de compressas para tratar feridas durante a primeira guerra mundial (FERNÁNDEZ, SERRANO, 2009). Assim como uso antibiótico na Ásia, Alemanha (FRAHM, 2004), Inglaterra (WREN, 1956), China (DING, 1982; WU, 1982), Índia (WATTS, 1891) e conhecido no Brasil (PINHEIRO et al., 1989).

*O uso do extrato etanólico de Rhodobryum giganteum (Schwaegr.) Par. incrementa o fluxo de sangue na aorta em mais de 30%, sendo seu efeito clinicamente comprovado para a cura de angina, quando administrado em ratos brancos (LI; ZHAO, 2009).*

Contudo, apesar das análises químicas das briófitas terem começado no início do século XIX, apenas em 1970 os biólogos, químicos e farmacêuticos começaram a ter interesse na composição química desse grupo de plantas (FERNANDEZ; SERRANO, 2009). Supõe-se que esse extenso período sem estudos seja atribuído a demora para aquisição de grandes quantidades de material (mesma espécie), bem como os procedimentos laboriosos necessários para obtenção de substância pura (ZINSMEISTER et al., 1991; BASILE et al., 1998).

Asakawa e colaboradores (1982; 1995) alavancaram os estudos sobre os constituintes químicos de briófitas, reportando muitas informações onde comprovaram que essas plantas contêm grandes quantidades de metabólitos secundários de interesse, pertencentes a diversas classes químicas como terpenos (mono, di, tetra e sesquiterpenos), compostos aromáticos (naftaleno, flavonoides, bisbibenzyl), alcalóides, aldeídos, ácidos carboxílicos, ácidos graxos, compostos fenólicos, glicosídeos, esteróides e taninos e alcoois. Foram reportados muitos novos esqueletos moleculares encontrados somente em briófitas, como por exemplo, pinguisanes, isolado pela primeira vez de *Aneura pinguis* (L.) Dumort. e alguns sesquiterpenos que são enantiômeros de plantas vasculares (ASAKAWA, 1981; 1982; 1990a; 1990b; 1993; 1995; 1999; 2001; 2007; ASAKAWA et al., 1980; 1988; 2013; WADA; MUNAKATA, 1971).

Atualmente as pesquisas fitoquímicas dos componentes briofíticos têm alcançado grande interesse científico, e os conhecimentos vêm crescendo rapidamente. Um fato que favoreceu e colaborou com melhores estudos foi o refinamento progressivo das técnicas analíticas, no qual poucos miligramas de uma substância passaram a ser suficientes para a caracterização de sua estrutura (FERNANDEZ; SERRANO, 2009).

Aproximadamente 1.000 espécies de briófitas já foram investigadas quanto aos seus componentes químicos orgânicos, e as informações sobre os resultados encontram-se em diferentes regiões do mundo como China, Japão, Índia, Estados Unidos, Nova Zelândia, Nigéria, entre outras (ADEBIYI et al., 2012; ADIO, 2005a, 2005b; ASAKAWA, 1982, 1990a, 1990b, 1993, 1995, 1999, 2007, 2008; BHATTARAI et al., 2008; CANSU et al., 2013; CLARKE; ROBINSON, 2008; DEY; NATH De, 2012; FATOBA et al., 2003, 2012; FRAN; KIRCHHOFF, 2002; FRAHM, 2004; GUO LEI et al., 2008; JOCKOVIC et al., 2008; NAGASHIMA et al., 2002; PEJIN et al., 2012; RAUHA et al., 2000; SABOVLJEVIC et al., 2010, 2011, 2012; SABOVLJEVIC et al., 2001; XIE; LOU, 2009).



No Brasil, esse conhecimento é incipiente, restringindo-se a apenas a dois trabalhos: o primeiro, realizado no estado do Pará, onde foram testados os efeitos antibactericidas dos extratos de 25 espécies de briófitas (musgos e hepáticas), incluindo *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex C. Muell (PINHEIRO et al., 1989). O segundo, desenvolvido no estado do Ceará, analisou o extrato do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw e sua atividade antibactericida, cujos testes mostraram atividade inibitória para todas as linhagens de bactérias testadas (VIDAL et al., 2012).

O grupo dos musgos e dos antóceros são quimicamente menos estudados em relação ao das hepáticas, devido este último grupo, conter em sua estrutura oleocorpos, que acumulam terpenóides lipofílicos aromáticos, destacando-se o gênero *Plagiochila* (Dumort.) Dumort. (Asakawa, 1981). De todo conhecimento químico, farmacológico, como fontes de cosméticos e drogas agrícolas, associado ao grupo de briófitas foram testados e comprovados o potencial antimicrobiano (antifúngica, antibacteriana, antiviral) citotóxico, antioxidante, anti-inflamatório, carcinogênico, inibição enzimática e alelopática, cardiotônica (aumento do fluxo sanguíneo coronário), “antifeedant” (fagodeterrente), inseticida e toxicidade diante de moluscos e peixes (ABHIJIT; JITENDRA, 2012; ANDE et al., 2010; ASAKAWA et al., 1980; 1988; BUKVIČKI et al., 2012; FRAHM; KIRCHHOFF, 2002; HAINES; RENWICK, 2009; MARKHAM et al., 2006; NAGASHIMA et al., 2004; SABOVLJEVIC et al., 2001; VATS; ALAM, 2013). Muitos componentes apresentam aromas característicos e um intenso sabor amargo ou pungente (ALAM, 2012; ASAKAWA, 2007).

Pode-se afirmar que as atividades biológicas encontradas nos constituintes químicos de briófitas, assim como os efeitos da aplicação dos seus extratos, descritos em literatura, evidenciam que o grupo possui um potencial para substâncias ativas pouco comuns dentro do estudo da química de produtos naturais e que em muitas ocasiões incluem novos tipos estruturais (ASAKAWA, 1981). Isto abre perspectivas e ideias para refletir sobre a sua aplicabilidade em diferentes áreas do conhecimento.

## 1.2. PROPRIEDADE ANTIFÁGICA (FAGODETERRENTE) E/OU INSETICIDA DAS BRIÓFITAS

Como norma geral as briófitas não são lesadas por insetos, caracóis ou lesmas provavelmente devido à presença de compostos antifágicos (ASAKAWA et al., 1988; DVIDSON; LONGTON, 1987; GLIME, 2007). Benesova et al. (1969) isolaram um

sesquiterpeno, conhecido como pungsona da hepática *Aneura pingues* (L.) Dum., onde este composto possui forte efeito antifágico. Wada e Munakata (1971), testaram a atividade deste composto frente a *Spodoptera littoralis* Boisduval, um lepdóptero que ocorre no Japão que em estado de larva se alimenta de folhas e apresentou uma inibição da alimentação na concentração de 0.5%.

Nas briófitas, especialmente nas hepáticas, existem muitos compostos antifágicos, como o gymnocolin de *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dumort ou os isolados de *Jasmesoniella autumnalis* (DC.) Steph, sobre diferentes espécies de *Spodoptera*. Também encontra-se os precursores ou intermediários da rota de síntese de alguns compostos com mesmo efeito, como o poligodial, isolado de *Porella vernicosa* Lindb., que além de ação antifágica é importante para síntese de outro composto, o warburganal, que se mostrou potente frente a *Spodoptera exemptata* (Walker) (ASAKAWA, 1982; 2007). O composto plagiochiline A, é um sesquiterpeno que possui uma forte propriedade pungente sobre a mesma espécie de lagarta, e pode ser encontrado em espécies de *Plagiochila fruticosa* Mitt., *P. Hattoriana* Inoue, *P. ovalifolia* Mitt. e *P. yokogurensis* Stephani (ASAKAWA, 1982).

Estudos mais recentes mostram como os extratos de briófitas atuam como venenos estomacais. Um deles, desenvolvido na Universidad de Bonn, levou Frahm e Kirchhoff (2002) a testarem o efeito antifágico (fagodeterrente) do extrato do musgo *Neckera crispa* Hedw. e da hepática *Porella obtusata* Gros Morne sobre a lesma *Arion lusitanicus* Mabilie (Gastropoda: Pulmonata: Arionidae). Os resultados mostraram-se satisfatórios, concluindo que o extrato é também um bioinseticida fraco (veneno estomacal) em pragas animais.

Saxena e Harinder (2004) realizaram testes em casa de vegetação com ingredientes ativos responsáveis por efeitos antimicrobianos. Foram isolados e identificados o Polygodial de espécies do gênero *Porella*, o Norpiguisono de *Conocephalum conicum* L. Dumort e Lunularin de *Lumularia cruciata* L., onde revelaram que plantas de tomate, pimenta, pepinos e trigo tratadas com os extratos das hepáticas foram distintamente menos afetadas por infecções fúngicas de *Phytophthora infestans* Mont. do que as plantas não foram tratadas. No entanto, esses extratos, segundo autores não têm sido aplicados em ambientes agrícolas.

Labbe' et al. (2005) estudaram os compostos químicos da espécie *Balantiopsis cancellata* (Nees) Steph., onde isolaram quatro ésteres sendo 2-phenylethyl benzoate, 2-phenylethyl ciscinnamate, 2-phenylethyl *trans*-cinnamate e isotachin B. Estes foram testados no controle da atividade fagodeterrente sobre a lagarta *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera), cujo resultado foi positivo para fagodeterência.



Markham et al. (2006) avaliaram a atividade inseticida à base de proteínas de 23 espécies entre samambaias e musgos, contra os insetos praga da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith e lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.:Noctuidae). Os extratos protéicos do musgo *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid e das samambaias *Asplenium platyneuron* (L.) BSP., *Athyrium pycnocarpon* (Spreng.) Tidstr., *Gymnocarpium dryopteris* (L.) Newmn e *Onoclea sensibilis* L., causaram redução de danos nos discos das folhas de soja *Glycine max.* (L.) Merr. utilizadas nos experimentos, como também no crescimento larval.

Perry et al. (2008), relataram a presença dos sesquiterpenos Clavigerin A, B e C na hepática *Lepidolaena clavigera* (Hook.f.) Trevis., da Nova Zelândia. Estes compostos apresentaram atividades antifágica e citotóxica sobre os insetos *Tineola bisselliella* Hummel (Lepidoptera) e larva *Anthrenocerus australis* Hope (Coleoptera).

Haines e Renwick (2009) compararam a aceitabilidade e qualidade de quatro espécies de musgo na pré-ingestão e pós-ingestão da lagarta generalista, *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), as espécies *Bryum argenteum* Hedw. *Climacium americanum* Brid., *Leucobryum glaucum* (Hedw.) e *Sphagnum warnstorffii* Russ foram comparadas com duas dietas de controle (alface e gérmen de trigo). Nos ensaios sem chance de escolha, as lagartas consumiram menos da dieta e mais do controle. O único musgo consumido em quantidade o suficiente para avaliar as respostas do pós-ingestivo foi *C. americanum*. Nos ensaios com chance de escolha, o musgo *L. glaucum* foi pouco consumido e os resultados evidenciaram atividade fagodeterrente para a maioria dos musgos citados.

Ande et al. (2010) avaliaram a atividade inseticida de quatro espécies de musgos sendo *Calymperes afzelii* SW., *Thuidium gratum* (P. Beauv.) Jaeg, *Bryum coronatum* Schwaegr. e *Barbula lambarenensis* (Hook.) Spreng., contra a broca do caule do milho. Todos os extratos testados apresentaram alguma atividade tóxica contra o ataque da lagarta. O de *C. afzelii* e *B. coronatum* que obtiveram atividade melhor do que o Tricel, o inseticida inorgânico que foi usado como controle.

Atualmente as abordagens químicas de briófitas tem sido bem sucedidas tanto para descobrir elevados níveis de compostos, as vezes com novas características estruturais, quanto para testar o uso de extratos para atividades biológicas relevantes, direcionadas para o desenvolvimento de novos fármacos ou agroquímicos. É fato que, para o Brasil, não há estudos químicos das briófitas no controle da antifagia e /ou mortalidade em insetos, bem como quanto ao potencial dos seus compostos químicos briofíticos. Portanto, este trabalho é



pioneiro neste sentido, onde se analisou as espécies *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. e *Leucobryum martianum* Hampe ex Müll. Hal.

### 1.3. A CULTURA DO MILHO, O DANO CAUSADO PELA LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera Frugiperda* E A PERSPECTIVA DO USO DE EXTRATOS DE BRIÓFITAS COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE PRAGAS.

O milho (*Zea mays*) é uma cultura de grande importância para a economia no mundo, sendo um produto estratégico para nutrição humana e animal, principalmente na avicultura, suinocultura e bovinocultura (de corte e de leite) e por seu valor agrônomo no sistema plantio direto. Além dessas finalidades, o milho é cultivado para a extração do bioetanol nos Estados Unidos, como também é utilizado na indústria química e alimentícia, de onde se obtém mais de quinhentos derivados (ALVES; AMARAL, 2011; CASA et al., 2006). Concomitantemente a várias espécies agrônômicas de plantas, o milho vem sendo bastante utilizado em trabalhos envolvendo sistemas agroflorestais (DANIEL et al., 2004).

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor de grãos no mundo, refletindo em acréscimos de produtividade, sendo o milho cultivado em 95,6% dos municípios brasileiros (FARINELLI; FORNASIERI FILHO, 2006; LANDAU, 2010). No levantamento da safra 2012/13, foram produzidos cerca de 79.077,9 mil toneladas de grãos (safras normal e safrinha) em uma área de aproximadamente 15,84 milhões de hectares, sendo considerada uma safra recorde, com evolução de 8,4% ao se comparar com o desempenho da safra anterior (AGRIANUAL, 2013; CONAB, 2013). Entretanto, existem alguns fatores que contribuem para a perda de produtividade desta cultura, destacando-se os insetos-praga.

Dentre as pragas que atacam o milho, a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a praga-chave, provocando prejuízos irreparáveis, pois danifica a cultura nos seus diferentes estádios fisiológicos (BIANCO, 1991; ROSA et al., 2009). As perdas de produtividade no Brasil pelo ataque desta praga podem chegar a 60%, dependendo do genótipo, estágio de desenvolvimento da planta e época de cultivo (CARVALHO, 1970; CRUZ; TURPIN, 1982; CARNEVALLI; FLORCOVSKI, 1995; CRUZ et al., 1999).

Os insetos recém-eclodidos geralmente iniciam sua alimentação pela casca dos próprios ovos, posteriormente raspam a folha sem perfurar. As lagartas maiores, especialmente a partir do segundo ínstar, começam a migrar para outras plantas, dirigindo-se,

em menor número, para a região do cartucho, onde se alimentam das partes mais tenras, causando danos as espigas. (GRUPOCULTIVAR, 1999).

Nos últimos anos a ocorrência de *S. frugiperda* tem sido generalizada logo após a emergência da cultura, reduzindo o número de plantas na área. Esse ataque necessita de cuidados especiais, principalmente se na primeira safra o manejo for inadequado. (CRUZ, 1995; CRUZ et al., 1999). A opção pelo controle deve ser efetuada entre os estádios de 3 e 10 folhas desenvolvidas e quando forem constatadas 20% de plantas atacadas. No entanto, para a semeadura de safrinha, o nível de controle ocorre quando aproximadamente 10% das plantas apresentam o cartucho com sintoma de ataque (CRUZ; TURPIN, 1982; CRUZ, 1997; CRUZ et al., 1999).

O controle de *S. frugiperda*, tem sido realizado principalmente com agrotóxicos (defensivos agrícolas), que são aplicados assim que a ocorrência da lagarta é detectada, e na maioria das vezes, sem a adoção de critérios mínimos de manejo, o que pode ocasionar o enfraquecimento do controle (PEREIRA, 2007).

Paralelamente ao consumo de agrotóxicos no Brasil, vem a grande preocupação da sociedade com o meio ambiente, devido aos resíduos de pesticidas nos alimentos, contaminação da cadeia alimentar, resistência de patógenos e insetos-praga a certos princípios ativos, gerando um desequilíbrio biológico e redução da biodiversidade; como também a intoxicação de agricultores (BETTIOL; MORANDI, 2009).

O emprego de estratégias de manejo integrado deve ser inserido nos programas de controle da lagarta-do-cartucho, com a finalidade de obtenção de resultados econômicos e ecológicos favoráveis (FARINELLI; FORNASIERI FILHO, 2006), pois este inseto também pode provocar danos em outras gramíneas (Poaceae) de importância agrônoma como arroz, trigo, sorgo, entre outras (BUSATO et al., 2002; CRUZ, 1995; CRUZ; MONTEIRO, 2004).

Dentre essas estratégias, está a utilização de produtos naturais derivados de plantas na forma de extratos orgânicos, como uma alternativa no manejo desta praga (GUERRA, 1985; LEÃO, 1996; SANTIAGO et al., 2008; SMITH, 2005; SOUZA, 2004). É um método viável e eficaz, para redução dos custos, preservação do ambiente e dos alimentos contra contaminação química, tornando-se prática adequada à agricultura sustentável (KÉITA et al., 2001; ROELD, 2001).

A ação dos compostos químicos extraídos das plantas confere nas pragas um efeito que pode ser por repelência, fagodeterrência (inibição total ou parcialmente a ingestão de alimentos), inibição de oviposição, alterações no sistema hormonal, distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases (ROELD, 2001;



SAITO; LUCCHINI, 1998, VENDRAMIM; GUZZO 2009). É importante salientar que o sucesso das investigações depende, principalmente, do grau de interação entre a Biologia, Química, Farmacologia e a Agronomia (PHILIPPI JR., 2000; VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

Nesse sentido as briófitas tem chamado a atenção dos pesquisadores por ser um grupo diverso, com várias substâncias químicas com bioatividade muito interessante (DULGER et al., 2005; CHOBOT et al., 2006; MILAR et al., 2007; SABOVLJEVIC et al., 2006, 2010. SINGH et al., 2007; TONGUC; MERCILI, 2007; ULKA; KARADGE, 2010; VELJIC et al., 2009, 2010). Porém, apesar do refinamento progressivo em técnicas analíticas, o conhecimento relacionado a fitoquímica das briófitas ainda é incipiente embora muitos novos compostos para a ciência tenham sido descritos a partir de espécies do grupo (SABOVLJEVIC; SABOVLJEVIC, 2008). A falta de projetos que possam interligar o conhecimento de profissionais da química, ciências agrárias com a briologia em busca de uma mesma proposta científica, contribuem bastante para essa carência de informações.

A potencialidade das espécies de briófitas para produção de extratos com atividade de inseticidas orgânicos e de fagodeterrência entre outras aplicabilidades é fato notório. Portanto, a importância desse estudo justifica-se pelo fato de que com o amplo conhecimento botânico das briófitas, surge a necessidade de direcionar também as investigações científicas para uma área de diferente aplicação como a fitoquímica a qual já é desenvolvida fora do Brasil.

O conhecimento científico deste grupo de plantas no Brasil e na Amazônia, se resume apenas em dois trabalhos de PINHEIRO et al. (1989) e VIDAL et al. (2012) porém, nenhum está relacionado com a proposta aqui apresentada.

Diante do exposto, foram levantadas duas hipóteses para este estudo: a) Os componentes químicos orgânicos presentes nas espécies de musgos *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall apresentam atividades biológicas de interesse; b) as substâncias presentes nos extratos dos musgos *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. possuem potencial biológico com efeito inseticida e/ou fagodeterrente no controle de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae).

## OBJETIVO GERAL

Identificar a composição química de duas espécies de musgos Bryophyta e testar a bioatividade dos seus compostos na forma de extratos no controle de larvas de 2º instar de

*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) no milho (*Zea mays*) em condições controladas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar os constituintes voláteis das espécies de musgo *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. que ocorrem na Amazônia brasileira.
2. Avaliar o efeito da ação inseticida e/ou fagodeterrente (antifágica) dos extratos etanólicos de *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. em larvas de 2º instar de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho.

Esta Tese foi organizada em quatro capítulos. Capítulo 1: Contextualização Geral Capítulo 2 (Artigo 1): Constituintes químicos voláteis de duas espécies de Briófitas (Bryophyta), ocorrentes na Amazônia brasileira, Pará, Brasil; Capítulo 3 (Artigo 2): Efeito do extrato de *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. (Bryophyta) sobre a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays* L.); Capítulo 4 (Artigo 3): Efeito do extrato de *Leucobryum martianum* (hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. (Bryophyta) no controle de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays* L.).

Os três artigos estão formatados de acordo com as normas das revistas às quais serão submetidos, porém, a formatação das margens e páginas está de acordo com as normas de apresentação de Tese da Universidade Federal Rural da Amazônia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHIJIT, D.; JITENDRA, N.D. Antioxidative Potential of Bryophytes: Stress Tolerance and Commercial Perspectives: A Review. **Pharmacologia**, v.3, p.151-159, 2012.
- ADEBIYI A. O., OYEDEJI, A. A, CHIKWENDU, E. E., FATOKE, O. A. Phytochemical Screening of Two Tropical Moss Plants: *Thuidium gratum* P. Beauv and *Barbula indica* Brid Grown in Southwestern Ecological Zone of Nigeria. **American Journal of Analytical Chemistry** 3, 836-839. 2012.
- ADIO, A.M.; KÖNIG, A.W. Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenioides*. **Phytochemistry**. v.66, p.599-609, 2005a.
- ADIO, A. M.; KÖNIG, A. W., Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (hepaticae). 2005. 266p. **Dissertation Master's degree. Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg. Hamburg, 2005b.**
- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p.295-332, 2013.
- ALAM, A. Some Indian bryophytes known for their biologically active compounds. **IJA BPT**. v.3, p.239-246, 2012.
- ALVES, H.C.R.; AMARAL, R. F. INFORME RURAL ETENE. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste/ETENE; Ambiente de Estudos, Pesquisas e Avaliação - AEPA Ano V-Setembro de 2011. Nº 16. Disponível em <http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/does/ireano5n16.pdf>. em: 30 de junho de 2013.
- ANDE, A.T.; WAHEDI, J.A.; FATOBA, P.O. Biocidal Activities of Some Tropical Moss Extracts Against Maize Stem Borers. **Ethnobotanical Leaflets**, v.14, p.479-90, 2010.
- ANDO, H.; MATSUO, A. Applied Bryology. In: SCHULTZE-MOTEL, W. (ed.), **Advances in Bryology**, J. CRAMER, v. 2, p.133-230, 1984.
- ASAKAWA, Y. Biologically active substances obtained from bryophytes. **The Journal of Hattori Botanical Laboratory**, 50: 123-142. 1981.
- ASAKAWA, Y. Chemical Constituents of Hepaticae. In: W. HERZ, H. GRISEBACH, G.W. KIRBY (Eds.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Springer, Vienna, v. 42, p.1-285, 1982.



ASAKAWA, Y. Terpenoids and Aromatic Compounds with Pharmacological Activity from Bryophytes. In: D.H. ZINSMEISTER, R. MUES (Eds.). **Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy.**, Oxford University Press, Oxford, p.369. 1990a,

ASAKAWA, Y. Biologically active substances from bryophytes. In: R. N. CHOPRA, S.C. BHATLA (Eds.) **Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry**, CRC Press, Boca Raton, p.259-287, 1990b.

ASAKAWA, Y. Biologically Active Terpenoids and Aromatic Compounds from Liverworts and the Inedible Mushroom *Cryptoporus volvatus*. In: S.M. COLEGATE, R.J. MOLYNEUX (Eds.). **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**, CRC Press, Boca Raton, p.319-347, 1993.

ASAKAWA, Y. Chemical Constituents of the Bryophytes. In: W. HERZ, G.W. KIRBY, R.E. MOORE, W. STEGLICH, TAMM, C. (Eds.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Springer, Vienna, v. 65, 562p. 1995.

ASAKAWA, Y. Phytochemistry of Bryophytes. Biologically Active Terpenoids and Aromatic Compounds from Liverworts. In: **Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Defense**; Romeo, J.T., Ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, p.319-342, 1999.

ASAKAWA, Y. Recent advances in phytochemistry of bryophytes – acetogenins, terpenoids and bis(bibenzyl)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinian and European liverworts. **Phytochemistry**, v.56, p.297-312, 2001.

ASAKAWA, Y. Biologically active compounds from Bryophytes. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, n. 4: p.557-580, 2007.

ASAKAWA, Y.; TOYOTA, M.; TAKEMOTO, T.; KUBO, I.; NAKANISHI, K., Insect antifeedant secoaromadendrane-type sesquiterpenes from *Plagiochila* species. **Phytochemistry**, v.9, n10, p.2147-2154, 1980.

ASAKAWA, Y.; DAWSON, G.W.; GRIFFITHS, D.C.; LALLEMAND, J.-Y.; LEY, S.V.; MORI, K.; MUDD, A.; PEZECHK-LECLAIRE, M.; PICKETT, J.A.; WATANABE, H.; CHRISTINE, M.; WOODCOCK, e ZHONG-NING, Z. Activity of drimane antifeedants and related compounds against aphids, and comparative biological effects and chemical reactivity of (-)- and (+)- polygodial. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n 10, p.1845-1855, 1988.

ASAKAWA Y.; LUDWICZUK, A.; NAGASHIMA, F.; KINGHORN A.D.; FALK, H.; KOBAYASH, J. Chemical Constituents of Bryophytes: Bio- and Chemical Diversity,

Biological Activity, and Chemosystematics. In: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer, 780 p. 2013.

BASILE, A., GIORDANO, S., SORBO, S., VOUTTO M.L., IELPO M.T.L., CASTALDO COBIANCHI, R.: Antibiotic effects of *Lunularia cruciata* (Bryophyta) extract. *Phannaceutical Biology*, 36: 25-28. 1998.

BHATTARAI, H.D., B. PAUDEL, H.S. LEE, Y.K. LEE AND J.H. YIM. Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King George Island, Antarctica. **Phyther. Res.**, 22: 1635-1639, 2008

BIANCO, R. **Pragas do milho e seu controle**. In: IAPAR. A cultura do milho no Paraná. Londrina: IAPAR, Circular 68. p.187-221. 1991.

BENESOVA, V., Z. SAMEK, V. HEROUT & F. SORM. On terpenes. CXCVIII. Isolation and structure of pinguicic acid from *Aneurapinguicis* (L.) Dum. Coll. Czech. **Chem. Commun.** 34: 582-592. 1969.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil**. In: Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Ed. Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. Jaguariuna. Embrapa. 341p. 2009.

BUKVIČKI, D.; VELJIĆ, M.; SOKOVIĆ, M.; GRUJIĆ, S.; MARIN, P. D. Antimicrobial activity of methanol extracts of *Abietinella abietina*, *Neckera crispa*, *Platyhypnidium riparoides*, *Cratoneuron filicinum* and *Campylium protensum* mosses. **Arch. Biol. Sci., Belgrade**, v.64, n. 3, p.911-916, 2012.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTINS, A.F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotrop. Entomol.** 31: 525-529, 2002.

CAMPOS, M.F.G. Musgos aquáticos como indicadores da contaminação das águas superficiais por metais pesados. Aplicação à bacia hidrográfica do rio Ave. **Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Tese de Mestrado em Saúde Pública**, 1999.

CANSU, T.B.; YAYLI, B.; OZDEMIR, T.; BATAN, N.; ALPAY KARAOGLU, S.; YAYLI, N. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwagr.) growing in Turkey. **Turk J Chem.**, v.37, p.213-219, 2013.



CARNEVALLI, P.C.; FLORCOVSKI, J.L. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio em milho (*Zea mays* L.) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797). **Ecossistema, Pinhal**, v.20, p.41-49, 1995.

CARVALHO, R.L.P. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes cultivares de milho, em condições de campo. 1970. 170f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**. 31:427-439, 2006.

CHOBOT V, KUBICOVA L, NABBOUT S, JAHODAR L, VYTLACILOVA J. **Fitoterapia**, 77, 598. 2006.

CLARKE, L.J. AND S.A. ROBINSON, Cell wall-bound ultraviolet-screening compounds explain the high ultraviolet tolerance of the Antarctic moss, *Ceratodon purpureus*. **New Phytol.**, 179: 776-783. 2008.

COSTA D. P.; ALMEIDA J. S. S.; DIAS N. S.; GRADSTEINS, R.; CHURCHILL, S. P. **Manual de Briologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 2010.

CONAB. Indicadores da agropecuária. Extraído de [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) em 05/12/13

CRANDALL-STOTLER, B.; STOTLER, R.E. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: A. J. Shaw; B. Goffinet (eds.). **Bryophyte Biology**. Cambridge University Press, Cambridge, p.21-70, 2000.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS. (Embrapa.CNPMS. Circular Técnica, 21), 45p. 1995.

CRUZ, I., FIGUEIREDO, M.L.C; MATOSO M.J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS, 40 p. 1999.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas, EMBRAPA-CNPMS, 40p. (Circular Técnica, 30), 1999.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. **Controle biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide *Trichogramma pretiosum*.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 98). 2004. 4p

CRUZ, I.; TURPIN, F.T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, DF, v. 17, n. 3, p.355-359, 1982.

DANIEL, O.; BITTENCOURT, D.; GELAIN, E. Avaliação de um sistema agroflorestal eucalipto-milho no Mato Grosso do Sul. **Agrossilvicultura** (Viçosa), v.1, n.1, p.15-28, 2004.

DAVIDSON, A.J.; LONGTON, R.E. Acceptability of mosses as food for a herbivore, the slug, *Arion hortensis*. **Symp. Biol. Hung.** V.35, p.707-719, 1987.

DELGADILLO M. C.; CÁRDENAS, S.M.A. **Manual de briófitas.** Cuadernos del Inst. de Biol. 9. 1990. 135p.

DEY ABHIJI; DE J.N. Antioxidative Potential of Bryophytes: Stress Tolerance and Commercial Perspectives: A Review. **Pharmacologia**, v.3, p.151-159, 2012.

DING, H. ZHONG GUO YAO YUN BAO ZI ZHI WU. **Kexue Jishu Chuban She, Shanghai**, p.1-409, 1982.

DULGER B, YAYINTAS OT, GONUZ A. Antimicrobial activity of some mosses from Turkey. **Fitoterapia**. 76: 730-732. 2005.

FARINELLI, R.; FORNASIERI FILHO, D. Evaluation of damage by *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) to maize cultivars. **Científica, Jaboticabal**, v.34, n.2, p.197-202, 2006.

FATOBA, P.O.; OMOJASOLA, P.F.; AWE, S.; AHMED F.G. Phytochemical screening of some selected tropical mosses. **NISEB Journal**, v.3, n. 2, 49-52, 2003.

FATOBA, P.O.; OGUNKUNLE C.O.; OKEWOLE G.A. Mosses as Biomonitors of Heavy Metal Deposition in the Atmosphere. **International Journal of Environmental Sciences** v.1 n.2. 56-62, 2012.

FERNANDÉZ, E.G.; SERRANO, A.M.V. **Atividades Biológicas das briófitas.** Âmbito Cultural Edições Ltda. 190p. 2009.



FOAN, L.; SIMON, V. Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach and comparison of solidphase extraction cleanup steps for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses. **Journal of Chromatography A**, Elsevier B.V. France. p.1-10, 2012.

FRAHM, J.P. Manual of tropical bryology. **Tropical Bryology** v. 23, p.1-196, 2003.

FRAHM, J.P. Recent developments of commercial products from bryophytes. **Bryologist**, 107: 277-283, 2004

FRAHM, J. P.; KIRCHHOFF, K. Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against the slug *Arion lusitanicus*. **Cryptogamie, Bryologie**, v. 23, n. 3, p.271-275, 2002.

FUDALI, E. Some open questions of the bryophytes of urban areas and their responses to urbanization's impact. **Perspectives in Environmental Sciences**, v.2, cap.1,p14-18, 2000.

GLIME, J.M. Utilidad económica y étnica de las briófitas. In: Flora of North America Editorial Committee. (eds.). **Flora of North America North of Mexico. Bryophyta, part 1**. Oxford University Press, New York. v. 27, p.14-41, 2007

GLIME, J.M. Meet the Bryophytes. Chapter 2-1. In: Glime, J. M. **Bryophyte Ecology. Physiological Ecology**. Ebook 2-1-1 sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. v.1, 2013. Disponível em: <<http://www.bryoecol.mtu.edu>>. Acesso em: 30 de junho de 2013.

GLIME, J.M.; SAXENA, D. **Uses of Bryophytes**. Today & Tomorrow's Printers & Publishers. New Delhi. 100p. 1991.

GOFFINET, B. AND W. R. BUCK. Systematics of Bryophyta: from molecules to a revised classification. In B. Goffinet, V. C. Hollowell & R. E. Magill (eds.),. **Molecular systematics of bryophytes. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden** 98:205–239. 2004.

GRADSTEIN, S.R.; CHURCHILL, S.P.; SALAZAR-ALLEN, N. Guide to the Bryophytes of Tropical America. Memoirs of the New York Botanical Garden. **New York**, v. 86, 577p. 2001.

GRUPOCULTIVAR: Lagarta-do-cartucho: enfrente o principal inimigo do milho. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=31>> Acesso em: 08/10/2011.



GUERRA, M. DE S. **Receituário caseiro**: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos. Brasília: Embrater, 166p. 1985.

HAINES, W.P.; RENWICK, J.A.A. Bryophytes as food: comparative consumption and utilization of mosses by a generalist insect herbivore. Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, USA. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.133, p.296-306, 2009

JOCKOVIC, N.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; SABOVLJEVIĆ, M. HPLC-DAD of phenolics in: Bryophytes *Lunularia cruciata*, *Brachytheciastrum velutinum* and *Kindbergia Praelonga*. **J Serb. Chem. Soc.**, 73:1161-1167, 2008.

JOSE, S. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview. **Agroforestry Systems**, v. 76, p. 1-10, 2009.

KÉITA, S.M. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, 37:339-349, 2001.

LABBE', C.; FAINI, F.; VILLAGRN, C.; COLL, J.; RYCROFT, D.S. Antifungal and Insect Antifeedant 2-Phenylethanol Esters from the Liverwort *Balanophora cancellata* from Chile. **J Agric Food Chem**, v. 53, p.247-249, 2005.

LANDAU, E.C.; GARAGORRY, L.F.; FILHO, H.C.; GARCIA, J.C.; DUARTE, CRUZ, J.C. Áreas de Concentração da Produção Nacional de Milho no Brasil. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo.

LEÃO, M.G. **Fitoterápicos na família**. Mirassol D' Oeste: Pref. Municipal de Mirassol D'Oeste. 1996. 36p.

LEI GUO, JIN-ZHONG WU, TING HAN, TONG CAO, KHALID RAHMAN, LU-PING QIN. Chemical Composition, Antifungal and Antitumor Properties of Ether Extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its Endophytic Fungus *Chaetomium fusiforme*. **Molecules** 2008, 13. 2114-2125.

LEMOS-MICHEL, E. **Hepáticas Epífitas sobre o pinheiro-brasileiro no Rio Grande do Sul**. Editora da Universidade, Porto Alegre, 191p. 2001.

LI L, ZHAO J. Determination of the Volatile Composition of *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. (Bryaceae) Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). **Molecules** 14: 2195-2201. 2009.

LISBOA, R. C. L. **Musgos Acrocárpicos do Estado de Rondônia**. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke. 272p. 1993.

LISBOA, R. C. L.; ILKIU-BORGES, A. L. Diversidade das Briófitas de Belém (PA) e seu Potencial como Indicadoras de Poluição Urbana. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica**. Belém, v. 11, n. 2, p.199-225, 1995.

LISBOA, R.C.L.; ILKIU-BORGES, F. Briófitas da Serra dos Carajás e sua possível utilização como indicadoras de metais. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica**. v. 12, n. 2, p.161-181, 1996.

MARKHAM, K.; CHALK, T.; STEWART JR., C.N. Evaluation of fern and moss protein-based defenses against phytophagous insects. **Int. J. Plant Sci.** v.167, n.1, p.111–117. 2006.

MILLAR KDL, CRANDALL-STOTLER BJ, FERREIRA JFS, WOOD KV. Antimicrobial properties of three liverworts in axenic culture: *Blasia pusilla*, *Pallavicinia lyellii* and *Radula obconica*. **Cryptogamie, Bryologie**, 28(3): 197-210. 2007.

MOLLOZI, J.; TACCA, F.; TRENTIN, A.; VECCHIA, J.D.; BIAZI, T.; COPPINI, V. **Botânica: algas, briófitas e pteridófitas**. RS: Ed. FAPES, p.37-49, 2003.

MORAES E. N. R. **Diversidade, Aspéctos florísticos e Ecológicos dos musgos (Bryophyta) da Estação Científica Ferreira Penna, Flona de Caxiuanã, Pará, Brasil**. 2006 Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi Belém, 149p. 2006.

MORAES, E. N. R & LISBOA, R. C. L. Musgos (Bryophyta) da Serra dos Carajás, estado do Pará, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 1(1): 39-68. 2006.

NAGASHIMA, F.; NONDO, M.; UEMATSU, T.; NISHIYAMA, A.; SATO, S.; SATO, M.; ASAKAWA, Y. Cytotoxic and apoptosis-inducing ent-kaurane-type diterpenoids from the Japanese liverwort *Jungermannia truncata* Nees. **Chem. Pharm. Bull.** v. 50, p.808-813, 2002.

NAGASHIMA, F.; SEKIGUCHI, T.; TAKAOKA, S.; ASAKAWA, Y. Terpenoids and Aromatic Compounds from the New Zealand Liverworts *Plagiochila*, *Schistochila*, and *Heteroscyphus* Species **Chem. Pharm. Bull.** 52(5) p.556-560, 2004.

NAIR, P. K. R. Agroforestry systems and environmental quality: introduction. **Journal Environmental Quality**, v. 40, p. 784-790, 2011.



PASSOS, C.A.M.; COUTO, L. Sistemas Agroflorestais potenciais para o Estado do Mato Grosso do Sul. In: **Seminário Sobre Sistemas Florestais Para o Mato Grosso do Sul, 1.**, Dourados, 1997. Resumos... Dourados: EMBRAPA/CPAO, 1997. p.16-22. (Documentos EMBRAPA/CPAO, 10).

PEJIN, B.; VUJISIĆ L.; SABOVLJEVIĆ, M.; TEŠEVIĆ, V.; VAJS, V. Fatty acid chemistry of *Atrichum undulatum* and *Hypnum andoi*. **Hem. Ind.** v. 66, n. 2, p.207–209, 2012.

PEREIRA, L.G.B. Táticas de Controle da Lagarta-do-Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda*. **Dossiê Técnico - Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC)**. 2007.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p.01-26, 2004.

PERRY N.B.; BURGESS E.J.; FOSTER L.M.; GERARD P.J.; TOYOTA M.; ASAKAWA Y. Insect Antifeedant Sesquiterpene Acetals from the Liverwort *Lepidoleana clavigera*. 2. Structures, Artifacts and Activity. **J Nat Prod.** 71: 258. 2008.

PHILIPPI JR., A. **Interdisciplinaridade em Ciências Ambientais** / A. Philippi Jr., C.E.M. Tucci, D. J. Hogan, R. Navegantes. - São Paulo : Signus Editora, 2000.

PINHEIRO DA SILVA, M.F., LISBOA, C.L., VASCONCELOS BRAZAO, R. DE. Contribuição ao estudo de briofitas como fontes de antibióticos. **Acta Amazonica**, v. 19, p.139-145, 1989.

RAO, D.N. Responses of bryophytes to air pollution. In: Smith, A.J.E. (ed.) **Bryophyte Ecology**. London, pp. 445-471. 1982.

RAUHA JP, REMES S, HEINONEN M, HOPIA A, KÄHKÖNEN M, KUJALA T, PIHLAJA K, VUORELA H, VUORELA P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int. J. Food Microbiol.** 56: 3–12. 2000.

RODIGHERI, H.R. **Rentabilidade Econômica Comparativa Entre Plantios Florestais e Sistemas agroflorestais com Erva-mate, Eucalipto e Pinus e as Culturas do Feijão, Milho, Soja e Trigo**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1997. 35p. (Circular Técnica EMBRAPA/CNPQ, 26). 1997.

ROELD, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, v.1, n.2, p.43-50, 2001.

ROSA, A.P.S.A. DA; NAVA, D.E.; MELO, M.; MARTINS, J.F. DA S.; SILVA, S.D. DOS A. (org.). A lagarta-do-cartucho do Milho. **Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Pelotas –RS. 2009.

SAITO, M.L.; LUCCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguro ao meio ambiente**. São Paulo: Embrapa-CNPMA, 1998, 46p.

SANTIAGO, G.P. Efeitos de Extratos de Planta na Biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) Mantida em Dieta Artificial. Lavras, **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 792-796, maio/jun., 2008.

SABOVLJEVIC A, SABOVLJEVIC M. Bryophytes, a source of bioactive and new compounds. In: Govil JN, Singh VK (eds.). *Phytopharmacology and Therapeutic Values IV, Series "Recent Progress in Medicinal Plants"*. - **Studium Press LLC**, U.S.A., pp. 9-25. 2008.

SABOVLJEVIC, M.; BIJELOVIC, A.; GRUBISIC, D. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. **Lekovite Sirovine**, 21: 17-29, 2001.

SABOVLJEVIC, A., SOKOVIC, M., SABOVLJEVIC, M., GRUBISIC, D. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. **Fitoterapia**, 77: 144-145. 2006.

SABOVLJEVIĆ A, SOKOVIC M, GLAMOCLIIJA J, CIRIC A, VUJICIC M, PEJIN B, SABOVLJEVIC M Comparison of extract bio-activities of *in situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. **Afr. J. Microbiol. Res.**, 4: 808-812. 2010.

SABOVLJEVIĆ A, SOKOVIC M, GLAMOCLIIJA J, CIRIC A, VUJICIC M, PEJIN B, SABOVLJEVIC M. Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. **Journal of Medicinal Plants Research** 5: 565-571. 2011.

SABOVLJEVIĆ A, SABOVLJEVIĆ M, VUJIČIĆ M, SKORIĆ J, SABOVLJEVIĆ M. Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckerales) in *in vitro* conditions. **Pak. J. Bot.**, 44: 339-344. 2012.



SAITO, M.L.; LUCCHINI, F. *Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguro ao meio ambiente*. São Paulo: Embrapa-CNPMA, 46p. 1998.

SAXENA, D. K; HARINDER. *Uses of Bryophytes*. *Resonance*. June 2004.

SCHOFIELD, W.B. *Introduction to Bryology*. New York: Macmillan Publishing Company, 431p. 1985.

SHEPHERD, G. J. *Plantas Terrestres*. Versão Preliminar. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas - Unicamp - Ministério do Meio Ambiente. 2003. 60p. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/doc/plantas1.pdf>>. Acesso em: 09 Nov de 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, L.A. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SINGH M, RAWAT AKS, GOVNDARAJAN R. Antimicrobial activity of some Indian mosses. *Fitoterapia.*, 78: 156-158. 2007.

SOUZA, A. P. de. *Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre Bemisia tabaci* (genn., 1889) biótipo b. Piracicaba, 116p. Tese (Doutorado – área de concentração em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2004.

STOTLER, R.E.; CRANDALL-STOTLER, B. A revised classification of the Anthocerotophyta and a checklist of the hornworts of North America, North of Mexico. *The Bryologist* v.108, n.1, p.16-26, 2005.

STURTEVANT, W. The Mikasuki Seminole: Medical Beliefs and Practices. Ph. D. Dissertation. *Yale University*, p. 203. 1954.

ULKA SJ, KARADGE B.A. Antimicrobial activity of some bryophytes (liverworts and a hornwort) from Kolhapur district. *J. Pharmacog.*, 2(16): 25-28. 2010. University of Michigan, Dearborn. 2003. Native American Ethnobotany, A database of plants used as drugs, foods, dyes, fibers, and more, by native Peoples of North America. Accessed 4 January 2013 at <http://herb.umd.umich.edu/>

VATS S.; ALAM, A. Antibacterial Activity of *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. Against Some Pathogenic Bacteria. *Journal of Biological Sciences*, 13: 427-431, 2013.

VELJIC M, DJURIC A, SOKOVIC M, CIRIC A, GLAMOCLIIA J, MARIN PD. Antimicrobial activity of methanol extracts of *Fontinalis antipyretica*, *Hypnum cupressiforme* and *Ctenidium molluscum*. **Arch. Biol. Sci.**, 61: 225-229. 2009.

VELJIC M, CIRIC A, SOKOVIC M, JANACKOVIC P, MARIN PD. Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. **Arch. Biol. Sci.**, 62: 381-395. 2010.

VENDRAMIM; GUZZO. **Resistência de Plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos**. In: cap. 25, p.1055-1105, 2009.

VIDAL, C.A.S.; SOUSA, E.O.; RODRIGUES, F.G.; CAMPOS A.R.; LACERDA, S.R.; COSTA, J.G.M. Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *octoblepharum albidum* hedw (Calymperaceae). **Arch. Biol. Sci., Belgrade**, v.64, n. 2, 465-470, 2012.

VIEGAS-JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, 26, 390-400, 2003.

XIE CF, LOU HX. Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. **Chemistry & Biodiversity** 6: 303-311. 2009.

WADA, K.; MUNAKATA, K. Insect Feeding Inhibitors in Plants. Part III. Feeding Inhibitory Activity of Terpenoids in Plants. **Agr. Biol. Chem.**, v. 35, n 1, p.115-118, 1971.

WATTS, G. A. **Dictionary of the Economic Products of India**. Part V. Delhi. 1891.

WREN, R W. **Potters New Encyclopedia of Botanical Drugs and Preparations**. 7th ed. Harper & Row, London. 1956.

WU, P.C. Some uses of mosses in China. **Bryol. Times** 13, 5, 1982.

WELCH, W.H. Mosses and their uses. **Procedings Indiana Academy of Science** v.58, p.31-46, 1984.

ZINSMEISTER, H.D., BECKER, H., EICHER, T. Bryophytes a source of biologically active naturally occurring material. **Angewandte Chemie** 30: 130-147. 1991.



## 2. Constituintes Químicos voláteis de duas espécies de briófitas (Bryophyta), ocorrentes na Amazônia brasileira, Pará, Brasil

### RESUMO

As briófitas são um grupo de plantas com uma grande diversidade de espécies distribuídas mundialmente. Nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos de briófitas, conseguindo elucidar os componentes químicos orgânicos do grupo, suas estruturas moleculares complexas, assim como avaliar a atividade dos seus extratos. A carência de informações sobre a fitoquímica das espécies ainda é uma grande lacuna, portanto visando contribuir com o conhecimento dos compostos químicos voláteis das briófitas, o objetivo deste trabalho foi determinar os constituintes químicos voláteis das espécies de musgo *Sematophyllum subsimplex* e *Leucobryum martianum* ocorrentes na Amazônia Brasileira. As amostras foram coletadas no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Bárbara, Pará, secas, identificadas, triadas com auxílio de pinça e lupa, conservadas em local refrigerado e submetidas à extração através de destilação-extração simultânea (DES) para a obtenção dos compostos voláteis, que foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-EM). Foram identificados 42 constituintes químicos nos extratos pentânicos das duas espécies estudadas, pertencentes principalmente ao grupo dos terpenos, hidrocarbonetos aromáticos, ácidos graxos e aldeídos. O hidrocarboneto aromático naftaleno foi predominante em ambas às espécies (*S. subsimplex*, 26,62% e *L. martianum*, 72,51%). *Leucobryum martianum* é a primeira espécie de musgo a apresentar o composto Safrol. Este estudo foi o primeiro relato da composição química para os dois táxons selecionados, onde os resultados apontam estes musgos com fontes naturais de compostos como terpenos, ácidos graxos e aldeídos.

**Palavras-chave:** Musgos, Compostos Químicos, Sematophyllaceae, Leucobryaceae

---

*Artigo a ser submetido na Revista Brasileira de Farmacognosia*

## **Volatile chemical constituents of two species of bryophytes (Bryophyta), occurring in the Brazilian Amazon, Pará State, Brazil**

### **ABSTRACT**

The bryophytes are a group of plants with a wide variety of species distributed worldwide. In recent years, due to the development of new analytical techniques, it has been verified a great scientific breakthrough involving the chemical studies of bryophytes, managing to elucidate the organic chemicals of this group, their complex molecular structures, and to evaluate the activity of their extracts. The lack of information on the phytochemical of the species is still a big gap, so to contribute to the knowledge of the volatile chemical compounds of bryophytes, the aim of this study was to determine the volatile chemical constituents of mosses species *Sematophyllum subsimplex* and *Leucobryum martianum* occurring in the Amazon Brazilian. The samples were collected in Parque Ecológico do Gunma, municipality of Santa Bárbara, Pará State, dried, identified, screened with the aid of tweezers and magnifying glass, kept refrigerated and submitted to extraction by simultaneous distillation-extraction (SDE) to obtain the volatile compounds, which were analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS). Were identified 42 chemical constituents in pentanics extracts of the two studied species, belonging mainly to the group of terpenes, aromatic hydrocarbons, fatty acids and aldehydes. The aromatic hydrocarbon naphthalene was predominant in both species (*S. subsimplex*, 26.62% and *L. martianum*, 72.51%). *Leucobryum martianum* is the first moss species to present the compound safrole. This study is the first report of the chemical composition for the two selected taxa, in which the results show these mosses as natural sources of compounds such as terpenes, fatty acids and aldehydes.

**Keywords:** mosses, chemical compounds, Sematophyllaceae, Leucobryaceae



## 2.1. INTRODUÇÃO

As briófitas são representadas por três linhagens distintas de plantas criptogâmicas terrestres: antóceros (Antocerotophyta), hepáticas (Marchantiophyta) e musgos (Bryophyta) (Crandall-Stotler & Stotler, 2000; Stotler & Crandall-Stotler, 2005; Goffinet & Buck, 2004). Estão amplamente distribuídas no mundo com 15.100 espécies (Gradstein et al., 2001), sendo 1.527 listadas para flora do Brasil, 571 para Amazônia brasileira e 331 para o estado do Pará (Costa, 2014).

As análises químicas deste grupo tiveram início no século XIX e apesar do porte discreto no ecossistema (maioria até 10 cm), nas últimas décadas, as pesquisas fitoquímicas dos constituintes briofíticos e de sua atividade biológica vem progredindo. Isto é possível graças ao maior entendimento sobre a biologia das suas espécies e ao refinamento progressivo em técnicas analíticas, de forma que uns poucos miligramas de uma substância são suficientes para a caracterização de sua estrutura, que em muitas ocasiões incluem novos tipos estruturais (Asakawa 2007, 2008; Fernandez & Serrano, 2009; Dey & Nath De, 2012; Mues, 2000).

Aproximadamente 1.000 espécies de briófitas já foram analisadas quanto aos seus compostos químicos orgânicos em diferentes regiões do mundo como China, Japão, Índia, Estados Unidos, Nova Zelândia e Nigéria. As informações sobre os resultados destas pesquisas demonstraram que estes componentes pertencem a diversas classes como terpenos (mono-di-tetra e sesquiterpenos), compostos aromáticos (naftaleno, flavonóides, bisbibenzil, etc.), além de alcalóides, aldeídos, ácidos carboxílicos, ácidos graxos, compostos fenólicos, glicosídeos, esteróides e taninos. (Adebiyi et al., 2012; Adio 2005a, b; Asakawa, 1982, 1990a, b, 1993, 1995, 1997, 1999, 2007, 2008; Bhattarai et al., 2008; Cansu et al., 2013; Chobot et al., 2006; Clarke & Robinson, 2008; Dey & Nath De 2012; Dulger et al., 2005; Fatoba et al., 2003, 2012; Fran & Kirchhoff 2002; Frahm 2004; Guo Lei et al., 2008; Jockovic, 2008;

Mues, 2000; Nagashima et al., 2002; Pejin et al., 2012; Rauha et al., 2000; Sabovljevic A. et al., 2006, 2010, 2011, 2012; Sabovljevic M. et al., 2001; Schmidt, 1996; Singh et al., 2007; Tonguc & Mercili, 2007; Veljic et al., 2009, 2010, Xie & Lou, 2009 e outros).

As briófitas apresentam diversas atividades biológicas reportadas em literatura, onde foram comprovadas propriedades medicinais, farmacêuticas, citotóxicas, antimicrobianas (antibacteriana, antivirais e antifúngicas), antioxidantes, antifágicas, inseticidas, aplicação em cosméticos e tolerância a metais pesados, como exemplo, as hepáticas *Plagiochasma japonica* que exibiu atividade antitumoral, antifúngica, antimicrobiana, inibição da liberação de superóxido e relaxamento muscular e *Ptilidium pulcherrimum* (Weber) que apresentou atividade antifúngica e antibacteriana (Banerjee, 1974; Bland, 1971; Basile et al., 1998a, b; Ding, 1982; Dey & Nath De, 2012; Frahm, 2004; Ivanova et al., 2007; Lahlou et al., 2000; Niu et al., 2006; Pinheiro et al., 1989; Schuster, 1966; Shi et al., 2008, 2009; Shen et al., 2010; Sturtevant, 1954; Turner et al., 1983; Veljic et al., 2010; Wu, 1982).

O grupo das hepáticas é o mais investigado, pois possuem oleocorpos (acetogininas) que são facilmente extraídos com solventes orgânicos e acumulam uma grande quantidade de terpenos lipofílicos (mono-, sesqui- e diterpenos) e compostos aromáticos (bibenzyls, bis-bibenzyls, benzoatos, cinamatos, fenóis, naftalenos, phthalides), alguns com odores únicos que caracterizam o potencial farmacêutico, como em *Plagiochila rutilans* Lindenb, com cheiro de hortelã-pimenta, devido a presença de vários monoterpenóides (Asakawa, 1980, 1981; Heinrichs et al., 2001; Schuster, 1966).

Em particular, algumas espécies de hepáticas produzem sesquiterpenos únicos, com esqueletos de carbono ainda não isolados em plantas vasculares e outros que podem corresponder aos enantiômeros encontrados em plantas superiores como limoneno, felandreno, ex-thujene, sabinene, ex-pineno. Atualmente, mais de 400 novos compostos



foram isolados e as suas estruturas elucidadas (Asakawa, 1982, 1990, 1993, 1995; 2007; Lu, 2005).

O grupo dos musgos apresentam interesse devido possuírem abundância de aldeídos e terpenos (principalmente mono-, sesqui- e diterpenos), além de compostos aromáticos, flavonóides, biflavonóides, hidrocarbonetos (saturado, mono-e di-insaturados), entre outros; são muito utilizados na medicina tradicional para tratamento de ossos quebrados, doenças oculares, curar feridas, hematomas, queimaduras, como diuréticos, incremento do trânsito de sangue na aorta em 30%, entre outras. (Ando, 1983, Ando & Matsuo, 1984; Basile et al., 1998; Cansu, 2010, 2013; Ding, 1982; Garnier et al., 1969; Harris, 2008; López-Sáez, 1996, Mues, 2000, Ri, 1590; Suire, 1972; Wu, 1982).

Estudos comprovaram várias atividades biológicas nos extratos de espécies de musgos, como ação antibacteriana, antifúngica, inseticida, anti-inflamatória e alelopática (Ande et al., 2010; Asakawa, 2007; Basile et al., 1999, 2003; Chobot, 2006; Dulger, 2009; Dulger et al., 2005, Fatoba et al, 2003; Labbe' et al., 2005; Madsen & Pates, 1952; Nakagawara et al., 1992; Pinheiro et al., 1989; Sabovljevic et al., 2011; Uçuncu, 2010; Vidal et al., 2012).

O grupo dos antóceros são menos estudados e o que se tem reportado são terpenos (sesqui e triterpenos), esteroides e compostos aromáticos, em torno de dez compostos para essas três classes (Mues, 2000). Ademais, revela o ácido rosmarínico com propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antioxidante e antiinflamatória (Fernandez & Serrano, 2009).

No Brasil e Amazônia, essas plantas estão bem estudadas quanto a sua florística, taxonomia e ecologia. Entretanto, as primeiras referências sobre a pesquisa química de briófitas são atribuídas a dois trabalhos: o primeiro realizado no estado do Pará, por Pinheiro et al. (1989), onde foi testado o potencial antibactericida de 25 espécies de briófitas, tendo os

efeitos dos extratos comprovados para algumas espécies e o segundo refere-se ao de Vidal et al. (2012), desenvolvido no estado do Ceará, onde foi feita uma análise química do extrato do musgo *Octoblepharum albidum* Hedw e testada sua atividade antibacteriana, isoladamente e em associação com aminoglicosídeos, contra seis linhagens bacterianas. Os testes mostraram atividade inibitória para todas as linhagens de bactérias, de interesse para área médica.

A importância de se focar cada vez mais a pesquisa na área química de briófitas é devido possuírem princípios ativos muito variados e interessantes do ponto de vista químico e medicinal. Deve-se enfatizar que novos compostos para a ciência já foram descritos a partir dessas plantas com destaque o grupo das hepáticas, seguido dos musgos (Mues, 2000).

As espécies de musgos *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Mull Hal., tratadas neste estudo, pertencem as famílias Sematophyllaceae e Leucobryaceae respectivamente, as quais são de ocorrência comum em toda a região amazônica, com seu conhecimento botânico bem explorado (Ilkiu-Borges et al., 2004; Lisboa & Maciel, 1994; Lisboa & Nazaré, 1997; Lisboa et al., 1998, 1999; Santos & Lisboa, 2003; Souza & Lisboa, 2005; Moraes, 2006; Tavares-Martins et al., 2014).

De acordo com a literatura consultada não foram encontrados estudos da composição química das espécies selecionadas nesta pesquisa. Portanto, o objetivo deste trabalho foi conhecer os constituintes voláteis dos musgos *Sematophyllum subsimplex* Hedw. Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll Hal., sendo de grande importância para ciência, como um passo fundamental, para contribuir com pesquisas futuras.



## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 ÁREA DE ESTUDO E ESCOLHA DAS ESPÉCIES DE MUSGOS

O Parque Ecológico do Gunma está localizado no município de Santa Bárbara, nordeste do estado do Pará, Amazônia Oriental Brasileira ( $01^{\circ}13'00.86''\text{S}$  e  $48^{\circ}17'41.18''\text{W}$ ), possui uma área de 400 ha de floresta nativa tropical úmida e 140 há de área aberta para uso múltiplo, a qual tem sofrido diversas alterações em decorrência do crescimento urbano, sendo o Parque drenado pelos igarapés Tracuateua e Tauariê.

A flora do Parque foi estudada através do Projeto “Inventário Florístico e Análise Fitossociológica dos Ambientes do Parque Ecológico do Gunma, Município de Santa Bárbara, PA”, cujos resultados estão publicados em Almeida et al. (2003). Estes autores implantaram 20 parcelas permanentes de 1 hectare cada, sendo 15 em ambientes de floresta primária de terra firme, duas em floresta secundária ou capoeira, duas em igapó e uma em várzea. O resultado dos inventários da Brióflora foi deste Parque encontra-se no trabalho de Fagundes et al. 2014 (no prelo), intitulado: Riqueza e Aspéctos Ecológicos das Comunidades de Briófitas (Bryophyta e Marchantiophyta) de um Fragmento de Floresta de Terra Firme no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Barbara, Pará Brasil.

De acordo com a classificação de Köppen, esta área possui tipo climático Af<sub>i</sub> – tropical úmido, com temperatura média anual de 26°C, mínima de 22°C e máxima de 31°C. A precipitação pluviométrica anual varia de 2500 a 3000 mm e a umidade relativa do ar atinge ca. 85% (SUDAM, 1984). Os solos variam incluindo latossolos e concrecionários lateríticos na terra firme e hidromórficos aluviais na várzea (Almeida et al., 2003).

As espécies *Sematophyllum subsimplex* Hedw. Mitt. e *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall. Foram selecionadas para esta pesquisa, pois, apresentam

ampla distribuição em florestas tropicais, especialmente na Amazônia (Moraes, 2006). São espécies conhecidas, bem descritas e ilustradas em literatura, de fácil identificação em campo e laboratório (Costa, 1988; Florschütz-De Waard, 1996; Buck, 1998; Visnadi, 2006; Yano, 1992). A seleção das espécies também baseou-se em estudos fitoquímicos relacionados com as mesmas espécies ou gêneros dos táxons selecionados (Pinheiro et al., 1989; Veljić et al., 2008; Haines & Renwick, 2009; Olofin, 2013).

### 2.2.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As amostras foram coletadas em ecossistema de floresta secundária de terra firme, próximo do igarapé e da entrada das parcelas dos igapós, a espécie *S. subsimplex* sobre tronco de árvore viva e *L. martianum* sobre o solo, com média intensidade de raios solares, seguindo as técnicas de coleta de Yano (1989). Este ambiente possui sua preservação ameaçada pela atividade antrópica existente nas proximidades desta área. As amostras foram identificadas no Laboratório de Briologia do Museu Paraense Emílio Goeldi. O material botânico foi lavado, seco ao sol por três dias, conservado em sala refrigerada, sendo a triagem das espécies realizada com auxílio de pinça (Flume 5) e estereomicroscópio (Leica, Wild M3Z), o que levou dois a três meses. Devido as briófitas ocorrerem em tapetes com várias espécies agregadas (Richards, 1984), procedeu-se a separação apenas dos espécimes de musgos selecionados para o estudo, incluindo-se apenas o gametófito (parte vegetativa), devido não apresentarem o esporófito no momento da coleta.

A identificação foi feita pela autora do presente estudo, que é especialista em briófitas, com auxílio de literatura especializada (Yano, 1992; Florschütz-De Waard, 1996), a classificação taxonômica foi feita de acordo com Goffinet et al. (2008). O material



testemunho foi incorporado ao Herbário João Murça Pires (MG) do Museu Paraense Emílio Goeldi MPEG), Belém, Pará, Brasil.

### 2.2.3 OBTENÇÃO DOS CONSTITUÍNTES VOLÁTEIS

Após o processo de identificação, separação, secagem das espécies à temperatura ambiente e pesagem em balança de precisão (2,6 g - suficiente para as espécies em estudo), as mesmas foram submetidas à micro destilação-extração simultânea (DES). Usou-se um extrator tipo Nickerson & Likens da Chrompack, e *n*-pentano (2 mL) como solvente, acoplado a um sistema de refrigeração para manutenção da temperatura da água de condensação entre 5-10° C, durante 2 horas. A extração foi realizada no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), da Universidade Federal do Pará (UFPA) e todas as extrações foram feitas em duplicatas.

### 2.2.4 ANÁLISE DO CONCENTRADO VOLÁTIL EM POR CG-EM

Os concentrados voláteis foram analisados por cromatografia de fase gasosa/espectrometria de massas (CG-EM) em sistema Thermo, modelo DSQII equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 µm de espessura do filme); gás de arraste hélio, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s, (medidos a 100°C); temperatura do injetor 240°C; tipo injeção: sem divisão de fluxo. Foi injetado 0,1 µL da solução pentânica; temperatura do forno programada para 60-240° C (3° C/min). EM: impacto eletrônico, 70 Ev; temperatura da fonte de íons e partes de conexão 200 °C; faixa de massas 39 a 450 daltons.

### 2.2.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Cada constituinte foi identificado através da comparação de seu espectro de massas e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas do sistema do equipamento (NIST, WILEY, ADAMS) e, com os dados da literatura (Adams, 2007). Os IR foram obtidos utilizando a série homóloga dos *n*-alcanos (C8-C26) nas mesmas condições cromatográficas, e calculados através da equação de Van den Dool e Kratz (1963). A quantificação dos constituintes foi obtida através de CG, em equipamento Thermo/Focus, equipado com detector de ionização de chamas (DIC), nas mesmas condições operacionais do CG-EM, exceto o gás de arraste que foi o hidrogênio.

### 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes identificados nos extratos pentânicos das duas espécies encontram-se relacionados nas Tabelas 1 e 2 em ordem crescente de seus índices de retenção (IR), bem como a porcentagem dos compostos identificados. Na análise cromatográfica foram detectados 39 constituintes químicos para *S. subsimplex*, com 28 identificados, correspondendo 63,88% do total e 20 compostos para *L. martianum*, com 14 identificados, representando 95,44% do total dos constituintes.

A composição química volátil de *S. subsimplex* (Tabela 1) foi constituída predominantemente de aldeídos (1,3,5,6,8,9,10,11,12,e,14) terpenos (sesquiterpenos) (2,15,19), ácidos carboxílicos (22,24,25,27), compostos fenólicos (17,19,20), hidrocarboneto aromático (7), ester (13, 26), éter (21,28), cetona (16) e álcool (4). Os componentes majoritários foram naftaleno (26,62%), derivado do ácido ftálico (13,98%), curcufenol (7,74%), ácido hexadecanóico (7,51%), *n*-nonanal (5,41%), (2E)- heptenal (4,61%).



Em se tratando de *L. martianum* (Tabela 2) a composição química volátil pertence ao grupo dos ácidos carboxílicos (11,13,14), compostos fenólicos (2,9), hidrocarbonetos aromáticos (1), sesquiterpeno (5), álcool (12), aldeído (2), cetona (1) e éter (9). Os componentes majoritários foram naftaleno (72,51%), derivado do ácido ftálico (7,09%), ácido hexadecanóico (5,08%), hexadecanol (4%) e/ salicilato de 2-etilhexila (1,2%).

### 2.3.1 CONSTITUÍNTES MAJORITÁRIOS

Foi identificado alto teor do hidrocarboneto aromático naftaleno nas duas espécies, sendo 26,62% em *S. subsimplex* e 72,51% em *L. martianum*. De acordo com Asakawa (1995) e Rycroft et al. (1998), foi constatado a presença do naftaleno e seus derivados em algumas espécies de hepáticas como *Plagiochila subdura* Inoue. L, *Adelanthus decipiens* (Hook.) Mitt., *Pellia epiphylla* (L.) Corda, *Scapania undulata* H. Buch, *Triandrophyllum subtrifidum* (Hook. & Taylor) Fulford & Hatcher. Entretanto, os autores não quantificam a porcentagem relativa encontrada nessas espécies.

Harmens et al. (2011) e Wilson (1989) também reportaram a presença de naftaleno em algumas espécies de musgos, onde foi observado quantidades expressivas. Os táxons *Abietinella abietina* (Hedw.) M. Fleisch., *Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr. e *Hypnum cupressiforme* Hedw. provenientes de áreas rurais na Austria e República Tcheca, apresentaram aproximadamente 2,6% a 7,3% deste hidrocarboneto em sua composição química (Krommer et al., 2007; Holoubek et al., 2000). Em *H. cupressiforme* e *Dicranum scoparium* Hedw. foi constatado um derivado do naftaleno – acenafteno - com 45,3 % e 4,1 %, respectivamente (Foan et al., 2010; Holoubek et al., 2000, 2007).

**Tabela 1.** Constituintes químicos (%) identificados extrato pentânico de *S. subsimplex*

Nº	Constituintes	IR	(%)
1	(2E)- heptenal	947	4,61
2	2 pentilfurano	984	1,52
3	(2E)- octenal	1049	1,33
4	(2E) - octenol	1060	2,13
5	<i>n</i> -nonanal	1100	5,41
6	(2E) - nonenal	1157	0,58
7	naftaleno	1178	26, 62
8	decanal	1201	1,15
9	(2E, 4E) - nonadienal	1210	1,39
10	(2E) - decenal	1260	2,08
11	(2E, 4Z) - decadienal	1292	1,16
12	(2E, 4E) - decadienal	1315	1,36
13	1- metoxi-4-metil-biciclo[2.2.2]octano	1341	1,13
14	(2E)- undecenal	1357	1,3
15	(E)- $\beta$ -ionona	1487	0,43
16	(E)-5,6-epoxi- $\beta$ - ionona	1467	0,3
17	benzofenona	1626	0,71
18	<i>cis</i> -diidrojasmonato de metila	1092	0,44
19	curcufenol	1717	7,74
20	salicilato de 2-etilhexila	1807	0,5
21	galaxolide	1913	0,66
22	derivado do ácido ftálico	2171	13,98
23	hexadecanoato de metila	1921	0,65
24	ácido hexadecanóico	1959	7,51
25	derivado do ácido ftálico	2470	0,65
26	linoleato de metila	2095	2,07
27	10-octadecenoato de metila	2085	1,92
28	<i>p</i> -metoxicinamato de 2-etilhexila	2088	1,17



**Tabela 2.** Constituintes químicos (%) identificados no extrato pentânico de *L. martianum*

	Constituintes	IR	(%)
1	Naftaleno	1178	72,51
2	safrol	917	0,43
3	(2E, 4E)-decadienal	1315	0,38
4	2-metilpropanoato de 2-metil-2,2-dimetil-1- (2-hidroxi-1 – metiletil)-propil	1347	0,34
5	maaliol	1566	0,61
6	ftalato de dietila	1590	0,49
7	<i>cis</i> -diidrojasmonato de metila	1654	0,73
8	salicilato de 2-etilhexila	1807	1,2
9	Galaxolido	1913	1,15
10	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1754	0,87
11	derivado do ácido ftálico	2008	7,09
12	Hexadecanol	29	4
13	derivado do ácido ftálico	2534	0,56
14	ácido hexadecanóico	1959	5,08

É sabido que espécies de briófitas sintetizam naturalmente o hidrocarboneto aromático naftaleno (Asakawa, 1995; Wilson, 1989). Porém, supõe-se que quando a presença deste composto se dá em uma porcentagem muito alta, parte desta pode ser advinda de poluentes orgânicos persistentes (POPs), uma vez que as briófitas têm grande facilidade de retenção e absorção de resíduos de impurezas ambientais (Harmens et al., 2011; Wilson, 1989).

O naftaleno é frequentemente encontrado no solo e ambientes aquáticos (Irwin et al., 1997), tendo biodisponibilidade usualmente alta no ambiente (Gesto et al., 2009). Na área de estudo as duas espécies foram coletadas sobre tronco de árvore viva próxima ao solo e sobre o solo, próximas a área de igarapé, onde há visitas de pessoas, que podem vez por outra deixar resíduos industriais e domésticos, além desta área estar próxima à estrada e com a vegetação suscetível ao contato com fumaça de escapamentos de motores.

O galaxolido encontrado em *S. subsimplex* e *L. martianum*, pertencente à classe dos almiscares sistéticos policíclicos. É utilizado na fabricação de perfumes como fragrâncias e fixadores (Carballa et al., 2004, 2005 e 2007). Esta substância pode ser encontrada em produtos de cuidados pessoais e de limpeza sendo detectadas no meio ambiente (águas naturais) (Kolpin, 2002, Daniele & Marcia, 2006), sendo também encontrada em vários sistemas aquáticos e biota, particularmente aqueles que recebem águas residuais (Rimkus, 1999, Yamagishi et al., 1981, 1983). Na literatura consultada não foi encontrado referência deste composto em briófitas.

Em se tratando dos terpenóides de acordo com literatura (Asakawa, 2001; Mues, 2000) os terpenos (mono- e sesqui) são mais abundantes em hepáticas e raros em musgos. Neste estudo houve ocorrência de sesquiterpenos, o que sugere que, apesar de serem morfologicamente diferentes das hepáticas, alguns musgos podem ser evolutivamente relacionados com as hepáticas, a exemplo a espécie *Plagiomnium acutum* (Lindb.) T. J. Kop., possui em sua composição química os sesquiterpenos *ent*- $\beta$ -cedreno,  $\alpha$ -cedreno,  $\alpha$ -acoradieno e o diterpeno (+)-dolabela-3,7-dien-18-ol (Asakawa, 2001; Toyota et al., 1998).

O sesquiterpeno curcufenol majoritário em *S. subsimplex* majoritário, já foi encontrado em hepáticas, como *ar*-curcumene segundo Asakawa (1995) e Bukvicki (2012). Este é um também isolado e identificado como derivado do sesquiterpeno aromático  $\alpha$ -curcumeno em animais marinhos (corais e esponja) (Gaspar et al., 2004; Salama et al., 2003). (E)- $\beta$ -ionona é um sesquiterpeno presente nesta espécie, e encontrado também em outros musgos como *Tortula muralis* Hedw (Ücuncü et al., 2010).

Em *L. martianum* foi encontrado o sesquiterpeno maaliol (0,61%). Foi relatada também a presença deste composto em briófitas especialmente em hepática do gênero *Plagiochila* (Adio, 2005a, b). Asakawa (1995) cita a presença deste composto nas espécies

*Plagiochila dura* De Not. e *P. lecheri* J. Maaliol também foi isolado da hepática *Lepidozia fauriana* (Sasakawa, 2013).

Monoterpenos como  $\alpha$ - ou  $\beta$ -felandreno,  $\delta^3$ -careno e  $\alpha$ -pineno já foram identificados em musgos de *Splachnum rubrum* Hedw, espécie referida como primeiro relato de monoterpeno em musgos por Asakawa (1995).

A maioria dos musgos contém quantidades consideráveis de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o ácido aradônico (ARA), ácido eicosapentaenóico (EPA) que não ocorrem nas plantas vasculares (Asakawa, 1995). Neste trabalho houve uma predominância de ácidos graxos nas espécies estudadas, o que pode ser confirmado por outros estudos químicos com briófitas, uma vez que há grande ocorrência destes compostos tanto em musgos quanto em hepáticas (Asakawa, 1995). Além disso, alguns desses constituintes químicos costumam ser semelhantes para os dois grupos de briófitas supracitados (Asakawa, 1982; Huneck, 1983).

O ácido hexadecanóico foi representativo tanto em *S. subsimplex* (7,51%) como em *L. martianum* (5,08%). Este composto está presente em hepáticas dos gêneros de *Asterella* P. Beauv., *Lophocolea* De Not. e *Marchantia* L. (Asakawa 1995; Chopra & Kumra, 1988; Sabovljevic et al., 2001) e no musgo *Tortula muralis* Hedw. (Ücuncü et al., 2010). Este ácido é conhecido como ácido palmítico (triacilglicerol) que é semelhante aos encontrados nas sementes oleosas.

O ácido ftálico foi representativo em ambas as espécies com 13,96% em *S. subsimplex* e 7,09% *L. martianum*. Este composto tem efeito de repelência e acaricida em insetos, porém pode ser um contaminante quando utilizado inadequadamente como plastificante, pois é um precursor típico para gerar ftalatos, e conferir flexibilidade para fabricação do plástico (Liang, et al., 2013; Mayer Jr, 1973).



O aldeído *n*-nonanal foi representativo em *S. Subsimplex* (5,41%), estando presente também em outros musgos como *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., *Pohlia. nutans* (Hedw.) Lindb. e *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. (Li & Zhao, 2009; Ücüncü et al., 2010), assim como nas hepáticas *Conocephalum japonicum* (Thunb) Grolle e *Porella cordaeana* (Huebener) Moore.

Os aldeídos (2*E*)-heptenal (4,61%), (2*E*)-decenal (2,08%), (2*E*,4*Z*)- decadienal (1,16%) e (2*E*,4*E*)-decadienal (1,36%) foram identificados em *S. Subsimplex*, sendo este último encontrado também em *L. Martianum* (0,38%). Estes compostos são comuns em espécies de musgos *Tortula muralis* Hedw. e *Pohlia. nutans* (Hedw.) Lindb e hepáticas como *H. Splendens* (Cansu et al., 2013; Ücüncü et al., 2010). Neste estudo esses aldeídos foram representados por baixa porcentagem. Segundo Filho (1997), muitas vezes, não importa a concentração do composto e sim a funcionalidade deste na planta.

As moléculas dos aldeídos são altamente tóxicas podendo causar modificações em proteínas e ácidos nucleicos (Sophos & Vasiliou, 2003; Sunkar et al., 2003), como também efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos (Vaughn & Gardner, 1993), insetos e protozoários (Croft et al., 1993).

Safrol, foi detectado no extrato pentânico de *L. martianum* (0,43%). De acordo com a literatura consultada este é o primeiro registro desse constituinte em musgos. Este composto é um alilbenzeno natural de distribuição ampla no reino vegetal (Costa, 2000).

O presente estudo representa o primeiro registro da composição química volátil de *S. subsimplex* e *L. martianum* pertencentes às famílias Sematophyllaceae Broth. e Leucobryaceae Schimp. respectivamente, cujos resultados indicaram que essas espécies são fontes naturais de terpenos, alilbenzeno, ácidos graxos, aldeídos e ésteres.

## REFERÊNCIAS

- Adams RP 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Pub. Corp., London, p.1-804.
- Adedeji OA, Ayodele AO, Elijah EC, Olubunmi AF 2012. Phytochemical Screening of Two Tropical Moss Plants: *Thidium gratum* P. Beauv and *Barbula indica* Brid Grown in Southwestern Ecological Zone of Nigeria. *American Journal of Analytical Chemistry* 3: 836-839
- Adio AM, König AW 2005a. Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenioides*. *Phytochemistry*. 66: 599-609.
- Adio AM, König AW 2005b. *Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (hepaticae)*. 266p. Dissertation Master's degree. Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
- Almeida, S.S.; Amaral, D.D.; Silva, A.S.L. 2003. Projeto: Inventário florístico e análise fitossociológica dos ambientes do Parque Ecológico do Gunma, município de Santa Bárbara, PA. *Relatório Técnico Final*. Belém: MPEG-CBO/CTBrasil-MCT/JICA. 177p.
- Ande AT, Wahedi JA, Fatoba PO 2010. "Biocidal Activities of Some Tropical Moss Extracts Against Maize Stem Borers," *Ethnobotanical Leaflets*: 14: 479-90.
- Ando, H. 1983. China Proc. *Bryol. Soc. Jpn.* 1983, 3, 124–125.
- Ando, H.; Matsuo, A. 1984. *Applied Bryology*. In: Schultze-Motel, W. (ed.), *Advances in Bryology*, J. Cramer, v. 2, p.133-230, 1984.
- Asakawa Y. 1982. Chemical Constituents of Hepaticae. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW (org.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 42, Wien-New York: Springer, p. 1–285.
- Asakawa, Y .1980. Comparative study of chemical constituents found in thalli and female receptacles of *Wisenerella demudate* and *Conocephalum conicum* *J. Hattori Bot. Lab.*, 48: 277-283
- Asakawa, Y .1981. Biologically active substances obtained from Bryophytes. *J. of Hattori Bot. Lab.*, 50: 123-142.
- Asakawa Y 1990a. Terpenoids and Aromatic Compounds with Pharmacological Activity from Bryophytes. In Zinsmeister DH, Mues R (Eds.). *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy.*, Oxford University Press, Oxford, p.369-410.

Asakawa Y 1990b. Biologically active substances from bryophytes. In Chopra R N, Bhatla SC (Eds.). *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, p.259–287.

Asakawa, Y. 1993. Biologically active terpenoid and aromatic compounds from liverworts and the inedible mushroom *Cryptoporus colvatus*. In: *Bioactive Natural Product-Detection, Isolation and Structural Determination*. Congatae, S. M. Molyneus, R. J. (Eds.), CRC Press, Boca Ration, p.1-618.

Asakawa Y 1995. Chemical Constituents of the Bryophytes. In E. Herz, G.W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglick, C. Tamm (org.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 42, New York: Springer- Verlag, p. 1-266.

Asakawa, Y. 1997. Heterocyclic compounds found in bryophytes. *Heterocycles*, 46: 795-848.

Asakawa Y 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes – acetogenins, terpenoids and bis(bibenzyl)s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinian and European liverworts. *Phytochemistry*, 56: 297-312.

Asakawa Y 2007. Biologically active compounds from Bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, 79: 57–580.

Asakawa, Y. 2008. Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds. *Curr Pharm Desing* 14: 3067-3088

Asakawa Y, Toyota M, Takemoto T, Kubo I, Nakanishi K 1980. Insect antifeedant secoaromadendrane-type sesquiterpenes from *Plagiochila* species. *Phytochemistry* 9: 2147-2154.

Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F 2012. Chemical Constituents of Bryophytes: Bio- and Chemical Diversity, Biological Activity and Chemosystematics. *Ibid* 93: 1-760.

Basile, A., Giordano, S., Sorbo, S., Voutto M.L., Ielpo M.T.L., CASTALDO COBIANCHI, R.: Antibiotic effects of *Lunularia cruciata* (Bryophyta) extract. *Phannaceutical Biology*, 36: 25-28. 1998a

Basile A, Vuotto ML, Ielpo MTL, Moscatiello V, Ricciardi L, Giordano S, Castaldo Cobiانchi R. 1998b. Antibacterial Activity in *Rhynchostegium riparioides* (Hedw.) Card. Extract (Bryophyta). **Phytother. Res.** 12: 146-148.

Basile A, Giordano S, López- Sáez JA, Cobiانchi RC 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479–1482.



Basile A, Sorbo S, López-Sáez JA, Cobianchi RC 2003. Effects of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* Hedw. (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliophyta). *Phytochemistry* 62: 1145–1151.

Bhattarai H. D., Paudel B., Lee H. S., Lee Y. K., Yim J. H. 2008. Antioxidant Activity of *Sanionia uncinata*, a Polar Moss Species from King George Island, Antarctica. *Phytother. Res.* 22, 1635–1639.

Buck, W. R. 1998. *Semathophyllaceae*. Pleurocarpous Mosses of the West Indies. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, v. 82, p. 367-377.

Bukvicki D., Gottardi D., Veljic M., Marin P. D., Vannini L., Guerzoni M.E. 2012. Identification of Volatile Components of Liverwort (*Porella cordaeana*) Extracts Using GC/MS-SPME and Their Antimicrobial Activity. *Molecules* 17.

Carballa, M., Omil, F., Ternes, Lema, J.M., Llompart, M., Garcia, C., Rodriguez, I. Gomez, M. Ternes, T 2004. Behaviour of Pharmaceuticals Cosmetics and Hormones in a Sewage Treatment Plant. *Water Research*, 38, 2918-2926.

Carballa, M., Omil, F., Ternes, Lema, J.M., Llompart, M., Garcia, C., Rodriguez, I. Gomez, M. Ternes, T. 2005. Behaviour of Pharmaceuticals and Personal Care Products in a Sewage Treatment Plant of Northwest Spain. *Water Science and Technology*, 52, 29-35.

Carballa, M., Manterola, G., Larrea, L., Ternes, T., Omil, F. And Lema, J.M. 2007a. Influence of Ozone Pre-Treatment on Sludge Anaerobic Digestion: Removal of Personal Care Products. *Chemosphere*, 67, 1444-1452.

Carballa, M., Omil, F., Ternes, T. And Lema, J.M. 2007b. Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) During Anaerobic Digestion of Sewage Sludge. *Water Research*, 41, 2139-2150.

Cansu, T. B., Ücuncü, O., Kariman, N., Özdemir, T., Yaylı, N. *Asian J. Chem.* 2010, 22, 7280–7284

Cansu, T.B, Yaylı, B., Ozdemir, T., Batan, N., Alpay Karaoglu S, Yaylı, N. 2013. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens*) (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciurioides* (Hedw.) Schwagr. growing in Turkey. *Turk J Chem.* 37: 213 – 219.

Chopra R N, Kumra PK 1988. *Biology of Bryophytes*. Wiley, New York, 350 pp.

Chobot, V, Kubicova, L., Nabbout, S., Jahodar, L., Vytlačilova, J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of five moss species. *Fitoterapia*. 77: 598-600.

Clarke, L.J., Robinson SA. 2008. Cell wall-bound ultraviolet-screening compounds explain the high ultraviolet tolerance of the Antarctic moss, *Ceratodon purpureus*. *New Phytol.*, 179: 776-783.

Costa, D. P. da Leucobryaceae do Parque Nacional da Tijuca, Estado do Rio de Janeiro (Brasil). *Rodriguesia* v. 66, n. 41, 1988.

Costa, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. *Química nova*, 23(3), 2000.

Costa, D.P. 2014. Briófitas. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128472>). Access in July 2014.

Crandall-Stotler, B., Stotler, R.E. 2000. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: A. J. Shaw; B. Goffinet (eds.). *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, p.21-70.

Croft, K.P.C., Jüntter, F., Slusarenko, A.J., 1993. Volatiles products of the lipoxygenase pathway involved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Physiol.*, 101:13-24.

Dey A, De J. N 2012. Antioxidative potential of bryophytes: Stress tolerance and commercial perspectives: A Rev. *Pharmacologia*, 3: 151-159.

Ding, H. 1982. Zhong guo Yao yun Bao zi Zhi wu., pp. 1-409, Kexue Jishu Chubanshe, Shanghai

Dulger B, Yayintas OT, Gonuz A 2005. Antimicrobial activity of some mosses from Turkey. *Fitoterapia*. 76: 730-732.

Dulger, B.; Hacıoglu, N.; Uyar, G. Asian J. Chem. 2009, 21, 4093.

Fatoba P.O., Omojasola P.F., Awe S, Ahmed F.G. 2003. Phytochemical Screening of Some Selected Tropical African Mosses. *NISEB Journal* 3: 49-52.

Fatoba P.O., Ogunkunle C.O., Okewole G.A. 2012. Mosses as Biomonitors of Heavy Metal Deposition in the Atmosphere. *Int. J. Environ. Sci.*, 1:56-62.

Fernández, E.G., Serrano, A.M.V. 2009. *Atividades Biológicas das briófitas*. Âmbito Cultural Edições Ltda. 190p.

Florschütz-De Waard, J. Sematophyllaceae. 1996. Musci III. In: GÖRTS-VANRIJN, A. R. A. (Ed.). *Flora of the Guianas. Series C: Bryophytes, Fascicle 1*, p.384-438.



Foan L, Sablayrolles C, Elustondo D, Laceras E, González L, Hederá A, Simon V, Santamaría JM 2010. Reconstructing historical trends of polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in a remote area of Spain using herbarium moss material. *Atmos. environ.* 44: 3207-3214.

Frahm, J.P. 2004. Recent developments of commercial products from bryophytes. *Bryologist*, 107: 277-283.

Frahm J.P., Kirchhoff K. 2002. Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against slug *Arion lusitanicus*. *Cryptogam. Bryol.* 23: 271-275.

Garnier; G. L. Bezaniger-Beauquesne and G. Debraux, 1969. Licochalcone A: An Inducer of Cell Differentiation and Cytotoxic Agent from *Pogostemon cablin* L., *Ressources Médicinales de La Flore Française*, Vol. 1, pp. 78–81, *Vigot Frères Éditeurs, Paris*.

Gaspar, H. Feio, S. Savluchinske; R., and Isabel; Soest, R.V. 2004 Antifungal Activity of (+)-Curcuphenol, a Metabolite from the Marine Sponge *Didiscus oxeata*. *Mar. Drugs* 2, 8-13.

Gesto, M. Tintos, A., Rodrigues-Illamola, A., Soengas, J. L., Miguez, M. 2009. Effects of naphthalene,  $\beta$ -naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, v.92, p.1-8.

Gradstein, S.R.; Churchill, S.P.; Salazar-Allen, N. 2001. Guide to the Bryophytes of Tropical America. *Memoirs of the New York Botanical Garden. New York*, v. 86, 577p.

Gradstein S.R., Costa D.P. 2003. The Hepaticae and Anthocerotae of Brazil. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 87. New York, p. 1-196.

Goffinet B, Shaw A. J 2008. *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press: Cambridge, p. 1-565.

Goffinet, B., Buck, W. R. 2004. Systematics of Bryophyta: from molecules to a revised classification. In B. Goffinet, V. C. Hollowell & R. E. Magill (eds.), *Molecular systematics of bryophytes. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 98:205–239.

Goffinet, B., Buck, W. R. and A. J. Shaw. 2008. Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In: *Bryophyte Biology*. 2. (Eds. Shaw, A.J. and Goffinet, B.). Cambridge: University Press Cambridge. cap.8, 71-126.

Guo, Wen-Jie, Cui, Feng-Jie, Tao, Wen-Yi. 2008. Bioassay-based screening of myxobacteria producing antitumor secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (7), pp. 842-847, 3



Haines, W.P.; Renwick, J.A.A. 2009. Bryophytes as food: comparative consumption and utilization of mosses by a generalist insect herbivore. Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, USA. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.133, p.296-306.

Harris ESJ, 2008. Ethnobryology: Traditional uses and folk classification of bryophytes. *Bryologist* 111: 169-217.

Harmens H, Foan L, Simon V, Mills G 2011. Mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. Report for Defra contract AQ08610. *NERC/NERC/Centre for Ecology & Hydrology*, 26p. (CEH Project Number: C04062).

Heinrichs J, Anton H, Gradstein SR, Mues R 2000. Systematics of *Plagiochila* sect. *Glaucoscentes* Carl (Hepaticae) from tropical America: a morphological and chemotaxonomical approach. *Plant Systematic and Evolution* 220: 115-138.

Holoubek I, Korinek P, Seda Z, Schneiderova E, Holoubkova I, Pacl A, Triska J, Cudlin P, Caslavsky J 2000. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environ. pollut* 109: 283-292.

Holoubek I, Klánová J, Jarkovský J, Kohoutek J 2007. Trends in background levels of persistent organic pollutants at Kosetice observatory, Czech Republic - Part II. Aquatic air and terrestrial environments 1996-2005. *J. environ. monit* 9: 564-571.

Huneck S 1983. Chemistry and Biochemistry of Bryophytes. In: Schuster RM (ed.) *New Manual of Bryology* 1, Nichinan, Miyzaki: The Hattori Botanical Laboratory, p. 1-116.

Ilkiu-Borges, A. L. & Lisboa, R. C. L. 2004. Os Gêneros *Cyclolejeunea*, *Haplolejeunea*, *Lepidolejeunea* e *Rectolejeunea* (Lejeuneaceae, Hepaticae) na Estação Científica Ferreira Penna, Pará, Brasil. *Acta Botanica Brasileira*. São Paulo, v. 18, n. 3, p.539-555.

Irwin, R. J., Vanmouwerik, M., Stevens, L., Seese, M. D.; Basham. 1997. W., *Environmental contaminants encyclopedia*. Colorado, Fort Collins: National Park Service, Water Resources Division, 114p.

Ivanova, V., M. Kolarova, K. Aleksieva, K.J. Dornberger and A. Haertl et al., 2007. Sanionins: Anti-inflammatory and antibacterial agents wit weak citotoxicity from the Antarctic moss *Sanionia georgico-uncinata* Prep. *Biochem. Biotechnol.*, 37: 343-352.

SabovljevićKovačević ácidos fenólicos, flavonóides, triterpenos e alcalóides *Natura Montenegrina, Podgorica*, 6:123-129

Jocković N, Andrade PB, Valentão P, Sabovljević M 2008. HPLC-DAD of phenolics in bryophytes *Lumularia cruciata*, *Brachytheciastrum velutimum* and *Kindbergia praelonga*. *J. Serb. Chem. Soc.*, 73:1161-1167.

- Kolpin, D. W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E. M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. and Buxton, H. T. 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in US Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36, 1202-1211.
- Krommer V, Zechmeister HG, Roder I, Scharf S, Hanus-Ilmar A 2007. Monitoring atmospheric pollutants in the biosphere reserve Wienerwald by a combined approach of biomonitoring methods and technical measurements. *Chemosphere* 67: 1956-1966.
- Labbe' C, Faini F, Villagr n C, Coll J, Rycroft DS. 2005. Antifungal and Insect Antifeedant 2-Phenylethanol Esters from the Liverwort *Plantiopsis cancellata* from Chile. *J Agric Food Chem* 53: 247-249.
- Lahlou, E. H., Hashimoto, T., and Asakawa, Y. 2000. Chemical constituents of the liverworts *Plantiopsis japonica* and *Marchantia tosaensis*. *J. Hattori Bot. Lab.* 88: 271-275.
- Li L, Zhao J 2009. Determination of the Volatile Composition of *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. (Bryaceae) Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). *Molecules* 14: 2195-2201.
- Lisboa, R. C. L., MACIEL, U. N. 1994. Musgos da Ilha de Maraj -I- Afu , Pará. *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, série Bot nica, Belém.* v. 10, n. 1, p. 43-56.
- Lisboa, R. C. L., Nazaré, J. M. M. 1997. *A Flora Briol gica*. Pp.223-235. In: Lisboa, P.L.B. (Org.). Caxiuanã. Belém, CNPq/MPEG.
- Lisboa, R.C.L.; Muniz, A. C. M.; Maciel, U. N. 1998. Musgos da Ilha de Maraj  - III - Chaves (Pará). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 14(2): 117-125.
- Lisboa, R.C.L.; Lima, M.J.L. & Maciel, U.N. 1999. Musgos da Ilha de Maraj  - II - Município de Anajás, Pará, Brasil. *Acta Amazônica* 29(2): 201-206.
- Liang S. S.; Liao, W.-T.; Kuo, C.-J.; Chou, C-H; Wu, C.-J.; Wang; H.M. Phthalic Acid Chemical Probes Synthesized for Protein-Protein Interaction Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14.
- Lopez-Saez, J. A. 1996. Biflavonoid differentiation in six *Bartramia* species (Bartramiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 203, 83-89.
- Madsen, G. C. and Pates, A. L. 1952. Occurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plants growing in Florida. *Bot. Gaz.* 113: 293-300.
- Mayer Jr, F.; Sanders, H.O. 1973. Toxicology of Phthalic Acid Esters in Aquatic Organisms. *Environ Health Perspect.* 3: 153-157



- Moraes E. N. R. 2006. *Diversidade, Aspéctos florísticos e Ecológicos dos musgos (Bryophyta) da Estação Científica Ferreira Penna, Flona de Caxiuanã, Pará, Brasil*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi Belém, 149p.
- Moraes, E.N.R. & Lisboa, R.C.L. 2006. Musgos (Bryophyta) da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais* 1(1): 39-68.
- Mues, R. 2000. In *Bryophyte Biology*; Shaw, A. J.; Goffinet, B., Eds.; Cambridge University Press, Cambridge.
- Nakagawara S, Katoh K, T Kusumi, Komura J, Nomoto K 1992. Two azulenes produced by the liverwort, *Calypogeia azurea*, during *In vitro* culture. *Phytochemistry*, 31: 1667-1670.
- Nagashima, F.; Nondo, M.; Uematsu, T.; Nishiyama, A.; Sato, S.; Sato, M.; Asakawa, Y. 2002. Cytotoxic and apoptosis-inducing ent-kaurane-type diterpenoids from the Japanese liverwort *Jungermannia truncata* Nees. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 808-813.
- Olofin, T. A.\*, Akande, A. O. and Oyetayo, V. O. 2013. Assessment of the antimicrobial properties of fractions obtained from bryophytes. *J. Microbiol. Antimicrob.* Vol. 5(5), pp. 50-54.
- Özdemir, T.; Yaylı, N.; Cansu, T. B.; Volga, C.; Yaylı, N. *Asian J. Chem.* 2009, 21, 5505–5509.
- Özdemir, T.; Ücuncü, O.; Cansu, T. B.; Kahriman, N.; Yaylı, N. *Asian J. Chem.* 2010, 22, 7285–7290.
- Niu, C., J.B. Qu and H.X. Lou, 2006. Antifungal bis[bibenzyls] from the Chinese liverwort *Marchantia polymorpha*. *Chem. Biodivers.*, 3:43-40.
- Pejin B, Vujisić L, Sabovljević M, Tešević V, Vajs V 2012. Fatty acid chemistry of *Atrichum undulatum* and *Hypnum andoi*. *Hem. Ind.* 66: 207–209.
- Pinheiro S.M.F, Lisboa, C.L, Vasconcelos B.R. 1989. Contribuição ao estudo de briofitas como fontes de antibióticos. *Acta Amazonica* 19:139-145.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 3–12.
- Ri, Z.: 1590. *Honzokoumoku* 21, 814.
- Richards PW 1984. The Ecology of tropical forest bryophytes. In: Schuster, R.M. (ed.) *New Manual of Bryology. Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 2: 1233-1270.



- Rycroft DS, Cole WJ, Rong S 1998. Highly oxygenated naphthalenes and acetophenones from the liverwort *Adelanthus decipiens* from the british-isles and south-america - part 2 NMR fingerprinting of liverworts. *Phytochemistry*, 48: 1351-1356.
- Rimkus, G. G. 1999. Polycyclic Musk Fragrances in the Aquatic Environmemt. *Toxicology Letters*, 111, 37-56.
- Sabovljevic M, Bijelovic A, Grubisic D 2001. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lekovite Sirovine* 21: 17-29.
- Sabovljevic A, Sokovic M, Sabovljevic M, Grubisic D. 2006. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. *Fitoterapia* 77: 144-145.
- Sabovljević A , Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Vujicic M, Pejin B, Sabovljevic M 2010. Comparison of extract bio-activities of *in situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4: 808-812.
- Sabovljević A, Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Vujicic M, Pejin B, Sabovljevic M 2011. Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 565-571
- Sabovljević A, Sabovljević M, Vujičić M, Skorić J, Sabovljević M 2012. Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraceae) in *in vitro* conditions. *Pak. J. Bot.*, 44: 339-344.
- Salama, A M.; Toscano, M.; Del Valle, M.; Vergas, E. 2003. Antinociceptive, anti-inflammatory and muscle relaxant activity of (+)-curcuphenol isolated from marine sponge *Didiscus oxeata*. *Rev. Col.Cienc. Quim. Farm.* 32 (2). 111-115.
- Santos, R.C. & Lisboa, R.C.L. 2003. Contribuição ao Estudo dos Musgos (Bryophyta) no Nordeste Paraense, Zona Bragantina, Microrregião do Salgado e Município de Viseu, Pará. *Acta Amazonica*. 33 (3): 415-422.
- Schuster, R. M. 1966. The Hepaticae and Anthocerotae of North America. Vol. 1. Columbia Univ. Press. N. Y. 1344 pp.
- Shen J, Li G, Liu Q, He Q, Gu J, Shi Y, Lou, H. 2010. Marchantin C: A potential anti-invasion agent in glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* 9: 33-39.
- Shi, Y. Q., Y.X. Liao, X.J. Qu, H.Q. Yuan, S. Li, J. B. Qu and H.X. Lou, 2008. Marchantin C, a macrocyclic bisbibenzyl, induces apoptosis of human glioma A 172 cells. *Cancer Lett*, 262: 173-182.

- Shi, Y. Q., C.J. Zhu, H. Q. Yuan, B. Q. Li and J. Gao. *et al.*, 2009. Marchantin C, a novel microtubule inhibitor from liverwort with anti-tumor activity both *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Lett.*, 276: 160-170.
- Singh M, Rawat AKS, Govindarajan R. 2007. Antimicrobial activity of some Indian mosses. *Fitoterapia.*, 78: 156-158.
- Sophos NA, Pappa A, Ziegler T, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chemical Biological interactions* 130-132: 323-337.
- Sophos N, Vasiliou V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chemical Biological Interactions* 130-132: 323-337.
- Souza, A.P.S. & R.C.L. Lisboa. 2005. Musgos (Bryophyta) na Ilha Trambioca, Barcarena, PA, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 19 (3): 487-492.
- Stotler, R.E.; Crandall-Stotler, B. A 2005. revised classification of the Anthocerotophyta and a checklist of the hornworts of North America, North of Mexico. *The Bryologist* v.108, n.1, p.16-26, 2005.
- Sturtevant, W. 1954. The Mikasuki Seminole: Medical Beliefs and Practices. Ph. D. Dissertation. Yale University, p. 203
- Suire, C., 1972. Chimie des Bryophytes. *Rev. Bryol. Lichenol.* 41, 105.
- Sunkar R, Bartels D, Kirch H 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene in *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal* 35:452-464.
- Sudam, 1984. Atlas de climatologia da Amazônia brasileira. *Publicação* 39. Belém. 125p.
- Tavares-Martins, A.C.C., Lisboa, R. C. L., Costa, D. P. 2014. Bryophyte flora in upland forests at different successional stages and in the various strata of host trees in northeastern Pará, Brazil. *Acta Bot. Bras.* Vol.28, n.1. 2014.
- Turner, N. J., Thomas, J., Carlson, B. F., and Ogilvie, R. T. 1983. Ethnobotany of the Nitinaht Indians of Vancouver Island. Victoria. *British Columbia Provincial Museum*, p. 59.
- Ücuncü O, Cansu TB, Özdemir T, Alpay Karaoglu S, Yaylin N. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (*Tortula muralis* Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., and *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb.) from Turkey. *Turk J Chem* 34: 825 – 834.



- Vaughn, S.F.; Gardner, H.W. 1993. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. *J. Chem. Ecol.* 19:2337-2345.
- Vidal CAS, Sousa EO, Rodrigues FG, Campos AR, Lacerda SR, Costa JGM 2012. Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *octoblepharum albidum* hedw (Calymperaceae). *Arch. Biol. Sci., Belgrade* 64: 465-470.
- Visnadi, S. R. 2006. Sematophyllaceae da Mata Atlântica do nordeste do Estado de São Paulo. *Hoehnea* 33(4): 455-484.
- Veljić, M., Tarbuk, M., Marin, P.D., Ćirić, A., Soković, M., and M. Marin 2008. Antimicrobial activity of Methanol Extracts of some genuine mosses from Serbia. *Pharmaceutical Biology* 46(12), 871-875.
- Veljic M, Djuric A, Sokovic M, Ciric A, Glamoclija J, Marin PD 2009. Antimicrobial activity of methanol extracts of *Fontinalis antipyretica*, *Hypnum cupressiforme* and *Ctenidium molluscum*. *Arch. Biol. Sci.*, 61: 225-229.
- Veljic M, Ciric A, Sokovic M, Janackovic P, Marin PD 2010. Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. *Arch. Biol. Sci.*, 62: 381-395.
- Wilson M A, Sawyer J, Hatcher PG, Lerch III HE 1989. 1,3,5-Hydroxybenzene structures in mosses. *Phytochemistry* 28: 1395-1400.
- Wu, P. C 1982, Some uses of mosses in China. *Bryol. Times* 13, 5
- Xie CF, Lou HX 2009. Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry & Biodiversity* 6: 303-311
- Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S. and Akiyama, K. 1983. Synthetic Musk Residues in Biota and Water from Tama River and Tokyo Bay (Japan). *Archives of Environmental Quality*, 34, 91-104.
- Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S. and Kaneco, S. 1981. Identification of Musk Xylene and Musk Ketone in Freshwater Fish CVollected from the Tama River, Tokyo. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 656-662.
- Yan C, Xing Yu J, Xing T, Xiao Qing C 2008. Comparison of volatile components from *Marchantia convoluta* obtained by microwave extraction and phytosol extraction. *J. Chil. Chem. Soc*, 53: 1518-1522.
- Yano O. 1992. Leucobryaceae (Bryopsida) do Brasil. 1992a. 318p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.



Yano O 1989. Briófitas. In Fidalgo O, Bononi VLR (eds.). *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Série Documentos. Instituto de Botânica. São Paulo, p. 27-30.

Xie CF, Lou HX 2009. Secondary Metabolites in Bryophytes: Na Ecological Aspect. *Chem. Biodivers.*, 9: 303-312.

### 3. EFEITO DO EXTRATO DE *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. (Bryophyta) SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO (*Zea mays* L.)

#### RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais importantes do mundo por constituir a base da alimentação humana e animal. Um fator importante que ocasiona perdas extremas de até 60% na produção é o ataque da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) praga chave desta cultura. O seu controle é realizado principalmente com aplicação de inseticidas sintéticos, que acarretam uma série de impactos negativos no meio ambiente. A seleção de novas espécies de plantas com potencial inseticida, associada ao Manejo Integrado de Pragas, tem sido considerada a tecnologia mais promissora no controle de pragas. Dessa forma, as briófitas constituem um grupo em potencial, para a descoberta de substâncias biologicamente ativas, que podem ser utilizadas no controle de pragas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito fagodeterrente e/ou inseticida do extrato etanólico, do musgo *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. (Bryophyta) em diferentes concentrações, em larvas de 2º instar da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, em folhas de milho (*Zea mays* L.) em condições controladas. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Bioecologia de Insetos da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) / ICA. A criação das lagartas foram feitas em laboratório, sob condições de temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ , a partir de posturas oriundas da UFRA. Após a preparação do extrato etanólico de *S. subsimplex*, adicionou-se 50 µl nos discos foliares de milho nas concentrações de 2,0%; 1,0%; 0,5% e 0,25% µg/µl e o controle com DMSO, com cinco repetições, em testes sem chance de escolha. Foram selecionadas 25 lagartas de 2º instar, para serem alimentadas com as folhas de milho tratadas, sendo inoculadas uma larva em cada placa de petri. Foram medidas as taxas de herbivoria e mortalidade após 24, 48 e 72 horas da aplicação do extrato vegetal. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância, para fagodeterência, e suas médias comparadas pelo teste U de Mann-Whitney (Siegel. 1956). Para mortalidade foi aplicado o teste de Fischer (Siegel. 1956). Todos os testes são unilaterais, utilizam um nível de confiança de  $\alpha = 0,05$ . Para verificar a significância de diferenças não tão extremas foi utilizado a Modificação de Tocher. Todas as análises foram realizadas através do pacote BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007). Observou-se que a concentração de 0,25µg/µl foi positiva para fagodeterência logo após 24 horas, enquanto que para mortalidade em todas as concentrações, verificou-se morte, sugerindo efeito tóxico. Este é o primeiro trabalho científico reportando a atividade inseticida e/ou fagodeterrente do extrato do musgo *Sematophyllum subsimplex* sobre larvas de 2º instar de *Spodoptera frugiperda*.

**Palavras-chave:** Briófitas, Sematophyllaceae, Controle de insetos, Fagodeterrente, Inseticida

---

*Artigo a ser submetido na Archives of Biological Science Belgrade*



***Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. (Bryophyta) extract effect on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on corn (*Zea mays* L.)**

**ABSTRACT**

The corn (*Zea mays* L.) is one of the most important cereals in the world as it is the basis of human and animal nutrition. An important factor that causes extreme losses of up to 60% in production is the attack of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), the key pest of this crop. Your control is mainly done with the application of synthetic insecticides, which cause a number of negative impacts in the environment. The selection of new plant species with insecticidal potential, associated with the integrated pest management, has been considered the most promising technology to control pests. Thus, the bryophytes are a potential group in the discovery of biologically active substances, which can be used to control pests. The aim of this study was to evaluate the antifeedant and/or insecticide effect of the ethanol extract of the moss *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. (Bryophyta) in different concentrations, on larvae in 2nd instar of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on maize leaves (*Zea mays* L.) under controlled conditions. The work was conducted in Laboratório de Bioecologia de Insetos of the Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) / ICA. The creation of the caterpillars were made in the laboratory, under conditions of temperature of  $24 \pm 2$  °C, relative humidity of  $70 \pm 10\%$ , of postures from UFRA. After preparation of the ethanol extract of *S. subsimplex*, was added 50 µL on corn leaf discs in concentrations of 2.0, 1.0, 0.5 and 0.25 µg/µL and the control with DMSO, with five replications, in no-choice tests. 25 larvae in 2nd instar were selected to be fed with the treated maize leaves, and one larva was inoculated into each Petri dish. Herbivory and mortality rates were measured after 24, 48 and 72 hours of application of the plant extract. The experimental data were submitted to analysis of variance, for antifeedant, and their means compared by Mann-Whitney U test (Siegel, 1956). For mortality was applied Fischer's test (Siegel, 1956). All tests are one-sided, and use  $\alpha = 0.05$  confidence level. To test the significance of not as extreme differences, was used the Tocher's modification. All analyzes were performed using the BioEstat 5.0 software (Ayres et al., 2007). It was observed that the concentration of 0.25 µg/µL were positive for antifeedant after 24 hours, while mortality in all concentrations, it was found death, suggesting toxic effect. This is the first scientific work reporting the insecticide and/or antifeedant activity of extract of the moss *Sematophyllum subsimplex* on larvae of 2nd instar of *Spodoptera frugiperda*.

**Keywords:** Bryophytes, Sematophyllaceae, insect control, antifeedant activity, insecticide

### 3.1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho está entre as culturas produtoras de grãos que mais contribui para a sustentabilidade da humanidade seja pela produção direta de alimento ou através de sua conversão em proteína animal o que justifica o seu amplo cultivo no país e no mundo (Barros, 2009). O Brasil é o terceiro produtor mundial em grãos, onde no levantamento de 2012/13, a produção ficou estimada em 79.077,9 mil toneladas nas safras normal e safrinha. Esse desempenho proporcionou um recorde de produção de milho no país, onde representou um incremento de 8,4% ao se comparar com o desempenho da safra anterior (Agrianual, 2013; Conab, 2013; Landau, 2010).

O agroecossistema do milho inclui uma ampla variedade de artrópodes, porém poucos apresentam características de uma praga-chave, com regularidade de ocorrência, abrangência geográfica e potencialidade para causar danos economicamente significativos no Brasil e nas Américas como a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, (Lepidoptera: Noctuidae) (Barros, 2012; Sá et al. 2009).

A fêmea adulta deposita seus ovos nas folhas do milho, as lagartas de primeiro instar iniciam sua alimentação nos tecidos verdes, causando o sintoma conhecido como “folhas raspadas”. Lagartas maiores furam a folha e, sem controle, destroem as plantas, podendo se alimentar do colmo, atacar o pedúnculo, impedindo a formação dos grãos. (Cruz, 1995; Valicente e Tuelher, 2009).

A média percentual de prejuízos depende do estágio em que a planta se encontra, onde, até os 30 dias de desenvolvimento da cultura podem alcançar de 15%, chegando entre 37% a 60% no florescimento (Barros, 2012; Carvalho, 1970; Cruz, 1995, 1997; Cruz e Turpin, 1982; Cruz et al. 1999; Sarmiento et al. 2002; Silva-Filho e Falco, 2003).

Comumente, o controle da lagarta-do-cartucho no Brasil é realizado através de inseticidas sintéticos, aplicados, via de regra sem muito critério, principalmente sem levar em conta os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Diéz-Rodríguez e Omoto, 2001). Como resultado deste uso intensivo, uma série de impactos negativos pode ocorrer no meio ambiente, tais como: contaminar os agroecossistemas, afetar os organismos não-alvo, selecionar populações resistentes, além de aumentar os custos de produção e contaminar os grãos com resíduos tóxicos (Diéz-Rodríguez e Omoto, 2001; Roel, 2001).

É importante mencionar que as substâncias oriundas do metabolismo secundário de plantas vêm como alternativa de controle, pois interfere severamente no metabolismo de



outros organismos, causando repelência, deterrência alimentar e de oviposição, esterilização, bloqueio do metabolismo e interferência no desenvolvimento, sem necessariamente causar a morte nem contaminar o meio ambiente (Medeiros, 1990; Lancher, 2000).

As briófitas constituem um grupo potencialmente valioso para a descoberta de substâncias biologicamente ativas, que sejam eficientes no controle de pragas, conferindo proteção contra insetos, bactérias e fungos, com os quais, elas vivem juntas no chão da floresta, além de servir como atrativos para polinizadores (aroma, cor, sabor), agentes de competição e simbiose entre plantas e microrganismos (Asakawa, 2007; Frahm, 2004).

O avanço das pesquisas sobre o grupo, relacionado ao potencial dos seus constituintes químicos reportam mais de 1.000 espécies de briófitas já estudadas por pesquisadores fora do Brasil (Adebiyi et al. 2012; Adio 2005a, b; Asakawa, 1982, 1993, 1995, 1997, 1999, 2007, 2008; Bhattarai et al. 2008; Cansu et al. 2013; Clarke e Robinson, 2008; Dey e Nath De, 2012; Fatoba et al. 2003, 2012; Frahm, 2004; Guo et al. 2008; Nagashima et al. 2003; Pejin et al. 2012; Sabovljevic A. et al. 2010, 2011, 2012; Sabovljevic M. et al. 2001; Xie e Lou, 2009).

Os resultados demonstraram a elevada diversidade de substâncias, que conferem propriedades e aromas característicos, como pungência e amargura, além de exibir um extraordinário conjunto de atividades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica, antifágica (fagodeterrente) em insetos, mortalidade, nematocidal, onde inclusive já foram testadas e comprovadas com larvas do gênero *Spodoptera* Guenée, usando extratos de musgos e hepáticas (Asakawa et al. 1980; Labbe' et al. 2005; Markham et al. 2006; McCleary et al. 1960, Pinheiro et al. 1989; Vidal et al. 2012; Wada e Munakata, 1971).

Como exemplo de atividade antifágica, pode-se citar os compostos, pinguison, isolado da hepática *Aneura pinguis* (L.) Dumort, e os ésteres, 2-phenylethyl benzoate, 2-phenylethyl ciscinnamate, 2-phenylethyl *trans*-cinnamate e isotachin B, isolados da hepática *Balantiopsis cancellata* (Nees) Steph., ambos testados sobre a espécie *Spodoptera litoralis* Boisd. (Labbe' et al., 2005; Wada e Munakata, 1971).

Como atividade fagodeterrente, foram avaliadas quatro espécies do gênero *Plagiochila* (Dumort.) Dumort, no controle de *Spodoptera exempta* (Walker) e os gêneros de musgos *Bryum* Hedw., *Ceratodon* Brid., *Fissidens* Hedw. e *Sphagnum* L. como alimento para *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, todos com respostas favoráveis. (Asakawa et al. 1980; Markham et al. 2006).

Devido não haver nenhuma informação sobre a composição química e a avaliação do extrato da espécie *Sematophyllum subsimplex* Hedw. Mitt. (Sematophyllaceae) no controle de



pragas agrícolas, esse estudo se faz importante, no sentido de direcionar esforços para a área da fitoquímica, a qual já é realizada rotineiramente fora do Brasil.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito fagodeterrente e/ou inseticida do extrato etanólico do musgo *Sematophyllum subsimplex* (Hedw). Mitt. (Bryophyta) em diferentes concentrações, em larvas de 2º instar da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho (*Zea mays* L.) em condições controladas.

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.1. SELEÇÃO, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Para este estudo foi selecionada a espécie de musgo *Sematophyllum subsimplex* (Hedw) Mitt. O critério adotado baseou-se em Pinheiro et al. (1989) e Olofin (2013) onde foram observadas atividades antimicrobianas de táxons pertencentes à mesma espécie ou gênero da espécie supracitada. Outro critério importante é a fácil adaptação da espécie em diferentes ambientes, sendo, portanto, considerada uma espécie generalista, ocorrente em toda a região amazônica (Gradstein et al. 2001; Moraes, 2006; Santos e Lisboa, 2003).

A coleta foi realizada no Parque Ecológico de Gunma, um fragmento de Floresta Amazônica no município de Santa Bárbara, Pará, Brasil, (01°13'00.86''S e 48°17'41.18''W), com uma área de 400 ha de floresta nativa tropical úmida e 140 há de área aberta para uso múltiplo, a qual tem sofrido diversas alterações em decorrência do crescimento urbano, sendo o Parque drenado pelos igarapés Tracuateua e Tauariê (Almeida et al. 2003).

As amostras foram coletadas em saco de papel, de acordo com as técnicas de Yano (1989), em floresta secundária de terra firme, próximo do igarapé e da entrada das parcelas dos igarapós, sobre tronco de árvore viva, após secas à temperatura ambiente. O material testemunho foi depositado no Herbário João Murça Pires, do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil (nº registro).

A identificação e separação da espécie foi feita pela autora do trabalho, especialista em briófitas, de acordo com Florschütz-De-Waard (1996) e a classificação taxonômica seguida foi a de Goffinet et al. (2008). Todo o processo de triagem foi realizado no Laboratório de Briologia do Museu Emílio Goeldi, onde após, o material botânico foi lavado, seco ao sol e conservado em ambiente refrigerado. Como briófitas de diferentes gêneros e espécies podem ocorrer juntas em tufo, tapetes ou moitas (Richards, 1984), foi feita a separação minuciosa

apenas dos espécimes do musgo pertencente ao estudo, com auxílio de pinça (Flume 5) e lupa (Leica, Wild M3Z), usando-se a planta inteira (gametófito).

### 3.2.2. PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO

O procedimento foi realizado no Laboratório da Central de Extração Química da Universidade Federal do Pará (UFPA). A amostra seca de *S. subsimplex* foi pesada (4g/ suficiente para espécie) em balança de precisão (marca SHIMADZU, modelo AY220), triturada em liquidificador e acondicionada em Erlenmeyer, o qual foi adicionado Etanol PA (200 ml) até a completa submersão do material, sendo o recipiente vedado com folha de alumínio.

O processo consistiu em três extrações por maceração a frio, com etanol PA, onde a cada dois dias, o material era filtrado a vácuo e remacerado, renovando-se apenas o líquido extrator, para assegurar que o maior número de substâncias fosse extraída desta matriz vegetal, completando um período de 6 dias.

O extrato bruto (volume obtido) de cada etapa foi reunido em um balão volumétrico, concentrado em rotavapor (marca Büchi, modelo R-3), sob pressão reduzida ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), para minimizar possíveis degradações dos constituintes químicos devido à ação da temperatura elevada (Barbosa, 2004; Simões et al. 2000).

À massa contida no balão foi adicionado metanol somente para facilitar a dissolução do conteúdo da parede do balão, e então ser feita a transferência para um frasco de vidro tarado e levado a capela de fluxo laminar até a evaporação total do líquido extrator. O teor extrativo foi determinado pela massa seca de 71,6 mg (rendimento obtido) de extrato etanólico de *S. subsimplex*.

### 3.2.3. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES

O extrato etanólico da planta foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e foi preparada uma solução estoque, utilizando-se a concentração de 20mg/10ml, relação massa do extrato/volume solvente. A partir desta solução foram preparadas as diluições (tratamentos) utilizadas no experimento nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de acordo Markham et al. (2006), adaptado. Para o grupo controle foi usado DMSO diluído em água destilada.



### 3.2.4. BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO

#### 3.2.4.1. Criação de *spodoptera frugiperda*

As lagartas foram coletadas inicialmente em uma área de cultivo de milho próxima ao Departamento de Solos da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), como também em plantas cultivadas em vasos com adubação padrão e mantidas em casa de vegetação, sendo posteriormente colocadas individualmente em caixas gerbox plásticas transparentes de 12 x 12 x 3cm, contendo dieta natural (folhas de milho) para obtenção da colônia inicial das larvas.

A criação das lagartas foi realizada no Laboratório de Bioecologia de Insetos (LABIN/ICA/UFRA), em ambiente climatizado regulado a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ . Após transformarem-se em pupas, as larvas foram transferidas para novas caixas gerbox com papel filtro umedecido no fundo para manter a umidade. As mariposas emergidas foram acondicionadas em gaiolas de tubo de PVC (cloreto de polivinila) de 30 cm de diâmetro por 40 cm de altura, revestido internamente com papel de filtro para postura, sendo a parte inferior apoiada em prato plástico revestido com papel filtro e a parte superior tampada com filme plástico perfurado para entrada de ar.

A alimentação das mariposas foi realizada com solução de mel a 10%, embebidas em pedaços de algodão, dentro de uma placa de petri, sendo renovado a cada dois dias. As posturas foram retiradas recortando a massa de ovos juntamente com o papel e acondicionadas em caixas gerbox esterilizadas. As larvas recém-eclodidas (1º instar) foram transferidas com pincel para gaiolas de garrafas Petis (Maia et al. 2004), adaptadas para lagartas.

No interior das garrafas foram colocadas folhas de milho novas, cultivadas na UFRA, apoiadas em disco de isopôr (com abertura no centro), contendo água no fundo das garrafas, para manter a turgidez das folhas. Após o primeiro instar, as larvas foram colocadas em copos descartáveis contendo a dieta artificial proposta por Bowling (1967): inicialmente 100 gramas de feijão foi cozido e triturado com 275 mL de água destilada; adicionou-se a levedura de cerveja (15 g), ácido ascórbico (3g), nipagin (1g) e benzoato de sódio (0,5g), dissolvidos em 100ml de água destilada; posteriormente 1,0ml de formaldeído e Agar (9g) previamente dissolvido em 250ml de água, sob aquecimento.



### 3.2.4.2. Experimento: Teste por ingestão sem chance de escolha

O bioensaio foi realizado com lagartas individualizadas, observando a eficácia do extrato etanólico de *S. subsimplex* por ingestão de dieta natural.

As seções de milho, foram cortadas de plantas entre 30 a 40 dias de idade, com um perfurador tipo scrapbook, dando preferência para as folhas do meio da planta e perto do cartucho do milho, obtendo-se discos de 2,3 cm de diâmetro, posteriormente lavados em água destilada para evitar contaminação.

Foram selecionadas 25 lagartas de 2º instar. Este instar foi escolhido para que o controle pudesse ser testado no início da fase larval, quando a preferência alimentar e as infestações frequentemente se concentram nas folhas jovens (Harrison, 1984; Hoy e Shelton, 1987). Ademais, é importante considerar que a sensibilidade das lagartas aos compostos secundários diminui conforme o seu desenvolvimento larval avança (Bellanda e Zucoloto, 2009). Desta forma impedindo o seu crescimento até os ínstaes posteriores, fases em que se instalam nas folhas do cartucho, perfuraram a base da planta, infestam e danificam a espiga, causando danos a plantação (Parra et al. 1995; Gassen, 1996).

O método utilizado para avaliar a viabilidade larval de *S. frugiperda* submetida a diferentes concentrações dos extratos etanólicos de *S. subsimplex* foi de acordo com o descrito por Borgoni e Vendramim (2005); Labbe' et al. (2005); Castro et al. (2006); Markham et al. (2006); Haines e Renwick (2009), com adaptações.

Para os testes, foram aplicados os tratamentos 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/ml e o controle (DMSO com água destilada), que foram preparados no momento da utilização, diluindo-se o extrato (solução estoque) em DMSO de acordo com as concentrações supracitadas, baseadas em literatura (Markham et al, 2006; Labbe' et al. 2005; Wada e Munakata, 1971). A cada disco foliar foi adicionada uma alíquota de 50µl com pipeta automática de acordo com os respectivos tratamentos.

Após a evaporação do solvente, as folhas foram transferidas para placas de Petri de 10 cm de diâmetro, onde foi inoculada uma larva de 2º instar. As placas de Petri foram forradas com discos de papel de filtro, mantidos úmidos durante todo o experimento para preservar a turgescência dos discos foliares.

### 3.2.4.3. Procedimentos estatísticos

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma larva de 2º instar (Borgoni e Vendramim, 2005) (Figura 1).

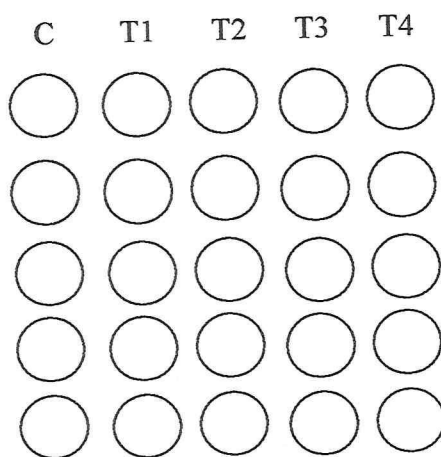


Figura 1. Croqui do teste por ingestão sem chance de escolha com *Spodoptera frugiperda* tratado com extrato de *Semotophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. C. Grupo controle; T1. Tratamento com 2,0 µg/ml; T2. Tratamento com 1,0 µg/ml; T3. Tratamento com 0,5 µg/ml; T4. Tratamento com 0,25 µg/ml.

### 3.2.4.4. Análise dos dados

Os parâmetros biológicos avaliados foram o consumo alimentar/herbivoria e a mortalidade das lagartas em 24, 48 e 72 horas após a realização do experimento. A taxa de mortalidade foi medida contabilizando o número de morte das lagartas por dia, sendo as mesmas removidas das placas de Petri após constatação de morte. Foi elaborado uma escala de dano foliar relativa (0 a 5), adaptada de Markham et al. (2006), como uma ferramenta de comparação quantitativa para determinar a porcentagem de consumo de alimento/herbivoria nos discos foliares de milho. Os escores 0, 1, 2, 3, 4 e 5 representaram respectivamente, 0%, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-99% e 100% de dano foliar.

Os dados experimentais contabilizados às 24, 48 e 72 horas foram submetidos a análise de variância, para fagodeterrência, e suas médias comparadas pelo teste U de Mann-Whitney (Siegel, 1956). O teste foi aplicado para avaliar a significância das diferenças entre o



grupo de controle e cada grupo de tratamento, além de verificar possíveis diferenças entre os tratamentos. Todos os testes são unilaterais, utilizam um nível de confiança de  $\alpha = 0,05$ .

Para mortalidade foi aplicado o teste de Fischer (Siegel, 1956), com nível de confiança  $\alpha = 0,05$ , para verificar a significância das diferenças entre as frequências de duas amostras independentes (controle x cada um dos tratamentos), ou seja, este teste pressupõe que o número de lagartas mortas nos tratamentos é maior que no grupo controle. Para verificar a significância de diferenças não tão extremas (como no caso deste desenho que apresenta amostras pequenas) foi utilizado a Modificação de Tocher. Ambos cálculos representam a prova estatística mais poderosa para dados dispostos em tabelas 2 x 2 (Siegel, 1956).

Todas as análises foram realizadas através do pacote BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. FAGODETERRÊNCIA

##### 3.3.1.1. Após 24 horas

O consumo foliar das lagartas em 24 horas, de acordo com a soma dos escores dos tratamentos em relação ao grupo controle revelou diferenças no consumo das folhas de milho, onde apenas no tratamento 1 foi observado de 26 a 50% de herbivoria (Tabela 1).

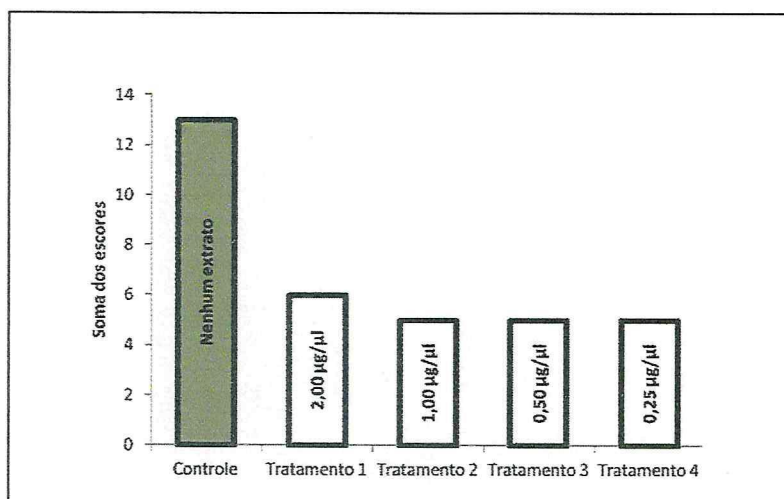


Figura 2. Soma dos escores de herbivoria de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar submetidas a tratamentos com diferentes concentrações do extrato de *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. realizado após 24 horas.

Observou-se após a aplicação do teste U de Mann-Whitney (Tabela 1) diferenças significativas entre o grupo controle e os tratamentos (p-valor=0,0379 para T1, p-valor=0,0184 para T2, T3 e T4). Os dados aqui apresentados demonstram haver ação fagodeterrente das concentrações de extratos de *Sematophyllum subsimplex* em lagartas do milho no 2º instar quando o consumo ocorre ao longo de 24 horas.

Tabela 1. Resultado do Teste U de Mann-Whitney para diferentes concentrações de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, aplicados na alimentação de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar. Avaliações realizadas após 24 horas da montagem do experimento comparando o grupo controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 1 (2,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 2 (1,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 3 (0,50 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	1,7756	2,0889	2,0889	2,0889
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0379	0,0184	0,0184	0,0184

Na constatação de diferenças na porcentagem de herbivoria, a Tabela 2 demonstra que não existem diferenças entre os tratamentos, ou seja, aplicando-se uma concentração de 0,25 µg/µl nas lagartas em 2º instar obtém-se um resultado satisfatório quanto à fagodeterência já após 24 horas de aplicação.

Tabela 2. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney para diferentes concentrações de extratos de espécie *Sematophyllum subsimplex*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 24 horas, comparando-se os tratamentos entre si, adotados de dois a dois.

	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 2 (1,00 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 3 (0,50 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	0,5222	0,5222	0,5222	0,0000	0,0000	0,0000
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,3008	0,3008	0,3008	0,5000	0,5000	0,5000

### 3.3.1.2. Após 48 horas

Ao longo dos demais dias de observação (48 e 72 horas), não foram verificadas modificações significativas na alimentação das lagartas, onde pode se observar que os resultados dos tratamentos 2, 3 e 4 se sobrepõem (P-valor - 0,0184) (Figura 3). Entretanto, o



grupo de lagartas que recebeu o tratamento 1 apresentou escores ligeiramente maiores que os outros tratamentos (P-valor - 0,0236). Esses valores demonstram ir de encontro à ideia de que concentrações maiores de extratos promovem uma ação fagodeterrente mais forte (Tabela 3).

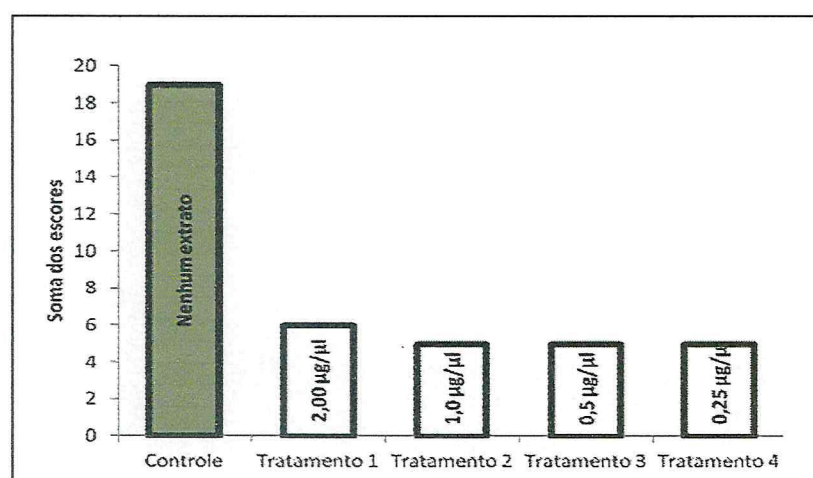


Figura 3. Soma dos escores de herbivoria de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar submetidas a tratamentos com diferentes concentrações do extrato de *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. realizado após 48 horas.

Tabela 3. Resultado do Teste U de Mann-Whitney para diferentes concentrações de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, aplicados na alimentação de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar. Avaliações realizadas após 48 horas, da montagem do experimento comparando-se o grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo de controle vs. Tratamento 1 (2,00 µg/µl)	Grupo de controle vs. Tratamento 2 (1,00 µg/µl)	Grupo de controle vs. Tratamento 3 (0,50 µg/µl)	Grupo de controle vs. Tratamento 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	1,9845	2,0889	2,0889	2,0889
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0236	0,0184	0,0184	0,0184

De acordo com a Tabela 3 observa-se novamente, que todos os tratamentos apresentam escores significativamente menores que os do grupo de controle. Todavia na análise do Teste U, onde os tratamentos foram tomados de dois a dois também não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicados para diferentes concentrações de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas, comparando-se os tratamentos entre si, adotados de dois a dois

	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 2 (1,00 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 3 (0,50 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	0,5222	0,5222	0,5222	0,0000	0,0000	0,0000
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,3008	0,3008	0,3008	0,5000	0,5000	0,5000

Os testes de hipóteses indicaram que a superioridade dos escores do tratamento 1 com relação aos outros tratamentos não são significativas (p-valor= 0,3008).

### 3.3.1.3. Após 72 horas

Os resultados dos Teste U de Mann-Whitney indicam novamente que todos os tratamentos possuem escores significativamente menores que os do grupo de controle (Figura 4). Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5).

Da mesma forma na análise dos tratamentos adotados de dois a dois verificou-se que não existem diferenças significativas (Tabela 6).

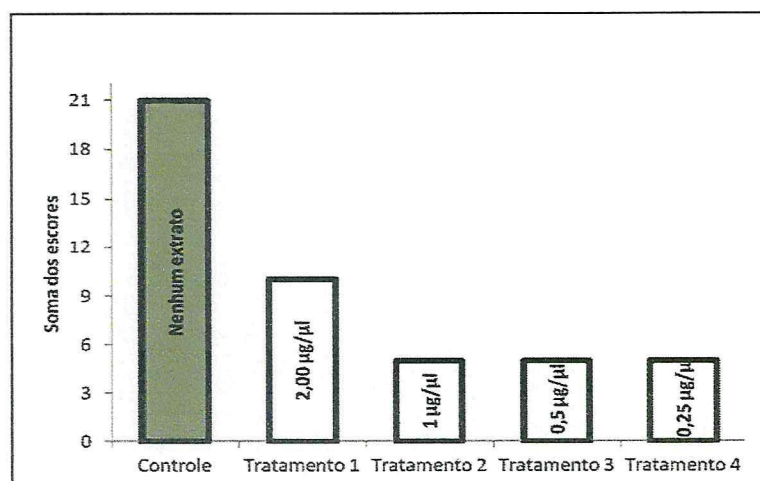


Figura 4. Soma dos escores de herbivoria de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar submetidas a tratamentos com diferentes concentrações do extrato de *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. realizado após 72 horas.



Tabela 5. Teste U de Mann-Whitney aplicados para diferentes concentrações de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, (Hedw.) Mitt. aplicados na alimentação de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar. Avaliações realizadas após 72 horas da montagem do experimento comparando o grupo controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 1 (2,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 2 (1,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 3 (0,50 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	1,8800	2,0889	2,0889	2,0889
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0301	0,0184	0,0184	0,0184

Tabela 6. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicados para diferentes concentrações de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, (Hedw.) Mitt. com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas, comparando-se os tratamentos entre si.

	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 2 (1,00 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 3 (0,50 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	1,0445	1,0445	1,0445	0,0000	0,0000	0,0000
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,1481	0,1481	0,1481	0,5000	0,5000	0,5000

Observou-se na evolução da soma dos escores de consumo ao longo de 24, 48 e 72 horas, que a taxa de herbivoria aumentou significativamente somente no grupo controle. Os extratos de *Sematophyllum subsimplex* são eficientes em promover ação fagodeterrente, porém, nenhuma das concentrações utilizadas é mais eficiente que outra (Figura 5).

Os resultados dos tratamentos 2, 3 e 4 se sobrepõem. O grupo de lagartas que recebeu o tratamento 1 apresentou escores ligeiramente maiores que os outros tratamentos, o que vai de encontro à ideia de que concentrações maiores de extratos promovem uma ação fagodeterrente mais forte. Entretanto os testes de hipóteses indicaram que a superioridade dos escores do tratamento 1 com relação aos outros tratamentos não são significativas.

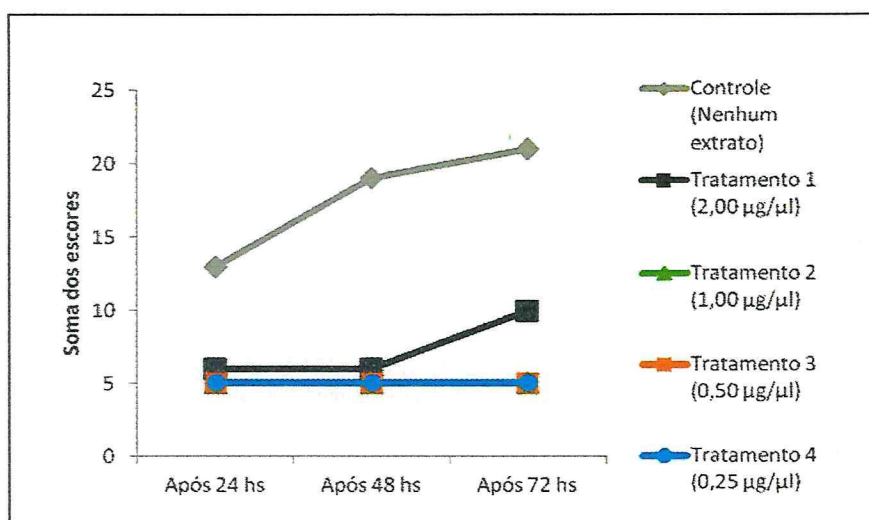


Figura 5: Evolução da soma dos escores de herbivoria de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar entre as diferentes concentrações de *Sematophyllum subsimplex* ao longo de 24, 48 e 72 horas de consumo.

De acordo com o observado nesta avaliação, desconsiderando fatores externos, a aplicação de 0,25 µg/µl de extrato de *S. subsimplex* é suficiente para controlar as lagartas de *Spodoptera* em 2º instar. Esse fato demonstra que concentrações menores de extratos também podem ter efeito positivo. Sidhu et al. (2004) também encontrou resultados positivos com pequenas concentrações no estudo com extratos etanólicos de espécies de Asteraceae.

A composição química volátil do musgo em estudo foi identificada (Moraes et al., in prep.) e com base nos resultados obtidos, observou-se quantidades significativas de sesquiterpenos, ácidos graxos e aldeídos. Segundo autores (Ande et al, 2010; Haines e Renwich, 2009; Labbé et al. 2005, Parker et al. 2007; Davidson et al. 1989), já foi comprovado para estas classes de compostos secundários atividade fagodeterrente quando testado com espécies de lagartas, incluindo a *Spodoptera frugiperda*.

Markham et al. (2006) avaliaram a defesa de seis espécies de musgos sobre a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera) e *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith nas concentrações do extrato semelhantes às trabalhadas neste estudo (0,1, 0,3, 0,6, 0,9 1,4 e 2,1 µg/µl) onde foi comprovada a fagodeterência.

Frahn & Kirchoof (2002), testaram a atividade do extrato etanólico do musgo *Neckera crispa*, contra lesma *Arion lusitanicus* em concentrações de 2,5% 1,0% e 0,5% semelhantes as utilizadas neste estudo, confirmando atividade fagodeterrente para as concentrações de 1% ou 0,5%. Nesta pesquisa as concentrações de 1% e 0,5% também mostraram atividade fagodeterrente.



Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os resultados dos trabalhos dos autores supracitados o que demonstra que os musgos tem grande potencial para apresentar atividade fagodeterrente.

Os valores gerados pelos escores de consumo foliar (maioria 1), para *S. frugiperda* nesta pesquisa, revelou um valor baixo para herbivoria, demonstrando a pouca ingestão do alimento tratado com o extrato de *Sematophyllum subsimplex* em lagartas de 2º instar.

### 3.3.2. MORTALIDADE

#### 3.3.2.1. Após 24 horas

Nesta primeira observação constatou-se uma lagarta morta tanto no tratamento 1, como também no Grupo de Controle, sendo então por este motivo que o Teste de Fisher não foi realizado. Este teste possui um nível de confiança de  $\alpha = 0,05$  sendo unilateral, pois se pressupõe que o número de lagartas mortas nos respectivos tratamentos é maior que no grupo de controle, ou, de outra forma, o número de lagartas vivas é menor nos respectivos tratamentos que no grupo de controle.

O Teste de Fisher foi realizado para verificar as diferenças entre os Tratamentos 2, 3 e 4 com o Tratamento 1, visto que neste último existe uma lagarta morta e nos demais nenhuma (Tabela 7).

Tabela 7. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Tratamentos 1 e os Tratamentos 2 ou 3 ou 4 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 24 horas.

	Tratamento 1 2,00 µg/µl	Tratamento 2 ou 3 ou 4 2,00 ou 0,25 µg/µl	Total
Viva	4	5	9
Morta	1	0	1
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,5000		
p-valor (Tocher)	0,5000		

O resultado do teste demonstra que não há diferenças significativas para mortalidade entre os tratamentos aplicados ( p-valor (Fisher) = 0,5000), ou seja, após 24 horas de contato das lagartas com o alimento tratado com o extrato de *S. subsimplex* não se observou variações significativas com relação a mortalidade que indiquem algum efeito inseticida.

### 3.3.2.2. Após 48 horas

Neste momento, o Teste de Fisher comparou o Grupo de Controle ao Tratamento 1, ao Tratamento 2 e aos Tratamentos 3 e 4 já que estes dois últimos apresentaram o mesmo número de lagartas mortas. Observou-se que o número de mortes (Tabela 8) no Grupo Controle e no grupo que recebeu os Tratamentos 1 são estatisticamente iguais (p-valor (Fischer) = 0,5000).

Tabela 8. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 1 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 1 2,00 µg/µl	Total
Viva	4	3	7
Morta	1	2	3
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,5000		
p-valor(Tocher)	0,0833		

Tabela 9. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 2 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt., com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 2 1,00 µg/µl	Total
Viva	4	0	4
Morta	1	5	6
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,0238		

O número de mortes no grupo que recebeu o Tratamento 2 (Tabela 9) é significativamente maior que no Grupo de Controle ( p-valor (Fisher) = 0,0238), sendo observado a existência de uma ação inseticida do extrato de *S. subsimplex* numa concentração de 1,00 µg/µl sobre lagartas do milho no 2º instar.

Verificou-se que o número de mortes nos grupos que receberam os Tratamentos 3 e 4 (Tabela 10), é significativamente maior que no Grupo de Controle (p-valor (Tocher)=0,0238),



sendo também observado a existência de uma ação inseticida do extrato de *S. subsimplex* em concentrações de 0,5 ou 0,25 µg/µl sobre lagartas do milho no 2º instar.

Tabela 10. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 3 ou 4 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 3 ou 4 0,50 ou 0,25 µg/µl	Total
Viva	4	2	6
Morta	1	3	4
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,2619		
p-valor (Tocher)	0,0238		

### 3.3.2.3. Análise após 72 horas

Todos os tratamentos diferem do Grupo de Controle em relação ao número de lagartas mortas e os Tratamentos 2 e 4 possuem o mesmo número de lagartas mortas (100%).

O número de mortes no grupo que recebeu o Tratamento 1 (Tabela 11), é significativamente maior que no Grupo de Controle (p-valor (Tocher)= 0,0238), sendo observada a existência de uma ação inseticida do extrato de *S. subsimplex* numa concentração de 2,00 µg/µl sobre lagartas do milho no 2º instar.

Tabela 11. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 1 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt., com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 1 2,00 µg/µl	Total
Viva	4	2	6
Morta	1	3	4
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fischer)	0,2619		
p-valor (Tocher)	0,0238		

A Tabela 12 demonstra que o número de mortes no grupo que recebeu o Tratamento 3 é significativamente maior que no Grupo de Controle (p-valor (Tocher)= 0,0040), sendo observada a existência de uma ação inseticida do extrato de *S. subsimplex* numa concentração de 0,50 µg/µl sobre lagartas do milho no 2º instar.

Tabela 12. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 3 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt., com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 3 0,50 µg/µl	Total
Viva	4	1	5
Morta	1	4	5
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,1032		
p-valor (Tocher)	0,0040		

A Tabela 13 demonstra que o número de mortes nos grupos que receberam os Tratamentos 2 ou 4 é significativamente maior que no Grupo de Controle (p-valor (Fisher) = 0,0238), sendo constatada a existência de uma ação inseticida do extrato de *S. subsimplex* em concentrações de 1,00 ou 0,25 µg/µl sobre lagartas do milho no 2º instar.

Tabela 13. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamentos 2 ou 4 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 2 ou 4 1,00 ou 0,25 µg/µl	Total
Viva	4	0	4
Morta	1	5	6
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,0238		

Fazendo a comparação entre os tratamentos, observou-se que quanto à mortalidade (Tabela 14), todos foram estatisticamente iguais, ou seja, comparando-se os Tratamentos 1, 2 (ou 4) e 3 não se produz diferenças no número de lagartas mortas. Qualquer um dos tratamentos produz efeito inseticida. Pode-se dizer que o que o número de mortes nos grupos que receberam os Tratamentos 2 ou 4 é estatisticamente igual ao Tratamento 1, assim como ao Tratamento 3.



Tabela 14. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Tratamento 1 e Tratamentos 2 ou 4 de extratos da espécie *Sematophyllum subsimplex*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas.

	Tratamento 1 2,00 µg/µl	Tratamento 2 ou 4 1,00 ou 0,25 µg/µl	Total
Viva	2	0	2
Morta	3	5	8
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,2222		
p-valor (Tocher)	0,2222		

Verificou-se que o número de lagartas vivas às 24, 48 e 72 horas diferiu significativamente ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) para todos os períodos de avaliação, uma vez que os discos foliares de milho submetidos a aplicação do extrato de *S. subsimplex* apresentaram as menores taxas de sobrevivência do inseto em comparação com o grupo controle.

Em todas as concentrações de extratos de *Sematophyllum subsimplex* (Figura 6), ocorre uma mortalidade acentuada, pois as linhas que representam estes tratamentos apresentam um declínio rápido. Ademais, no Grupo de Controle não existe progressão nenhuma no número de lagartas mortas durante o tempo em que estes indivíduos foram observados. Apesar dos Testes de Fisher indicarem a inexistência de diferenças significativas entre os tratamentos, os resultados observados mostram diferenças nos valores.

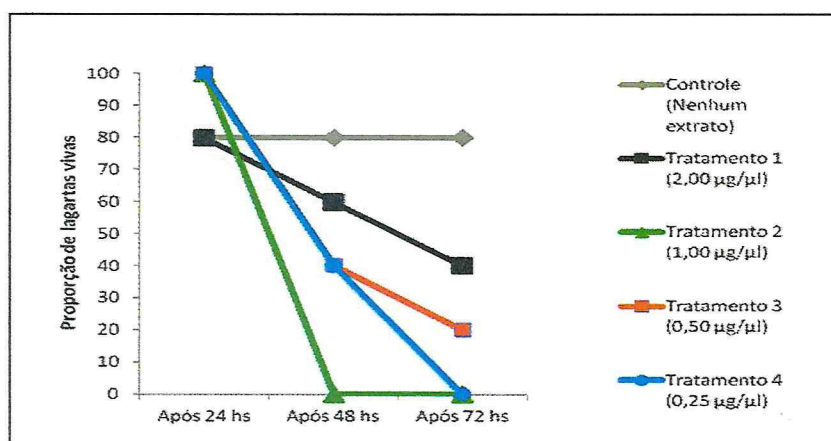


Figura 6. Evolução da proporção de *Spodoptera frugiperda* vivas entre diferentes concentrações de extratos de *Sematophyllum subsimplex*. Avaliação ao longo de três dias (24, 48 e 72) de contato do inseto com o alimento tratado.

Os resultados estão de acordo com outras pesquisas realizadas também com aplicação de extratos de plantas em folhas de milho ou em dieta artificial. Castro et al. (2008) realizaram um bioensaio utilizando diferentes concentrações dos extratos aquosos de *Piper. tuberculatum* Jack. que foram oferecidas as lagartas na forma de folhas previamente tratadas e apresentaram mortalidade em todas as concentrações.

Roel et al. (2000) em seu trabalho sobre o efeito do extrato de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagartado-cartucho, concluíram que os extratos impregnados em folhas de milho, causaram 100 % de mortalidade larval. Nesta pesquisa, com extrato de *S. subsimplex* somente ocorreu 100% de mortalidade nos tratamentos 2 (1µg/µl) e 4 (0,25µg/µl).

Tagliare (2010) testou o efeito de 20 extratos de plantas, em dieta artificial sobre larvas de 2 instar de *S. frugiperda*, considerando a mortalidade larval, todos os extratos obtidos por maceração e infusão apresentaram toxicidade às lagartas quando comparados à testemunha. Da mesma forma neste estudo, todas as concentrações do extrato apresentaram diferença significativa quanto a testemunha indicando efeito tóxico.

Em linha de pesquisa semelhante, Rodriguez e Vendramim (1997), testaram diferentes extratos de meliáceas e observaram que apenas os extratos de *Trichilia pallida* Swartz, *Melia azedarach* L. e *Cabralea canjerana* (Vell) Mart. causaram 100% de mortalidade sobre *S. frugiperda*. Da mesma forma, Martinez (2001) relatou que *Cymbopogon winterianus* Jowitt causa repelência e mortalidade de *S. frugiperda*. A maior mortalidade larval foi observada com o extrato de *P. alliacea*, cujo valor foi de 98%.

Sendo assim, os dados desse estudo estão de acordo com as afirmações de Rodriguez; Vendramim (1996), destacando que o efeito das plantas inseticidas na sobrevivência dos insetos é mais eficiente na fase larval, pois estes são mais sensíveis ao composto, ingerindo as substâncias químicas presentes no alimento tratado com o extrato.

Segundo Roel (2001) a extensão dos efeitos dos extratos e o tempo de ação das substâncias inseticidas são dependentes da dosagem utilizada, entretanto os efeitos menos intensos, porém mais duradouros se apresentam nas dosagens menores.

No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis, buscando modelos experimentais de fácil obtenção e aplicação, que se enquadrem na melhor opção para o agricultor de baixa renda, que normalmente não dispõe de recursos econômicos e técnicos para aquisição e aplicação de produtos.

A vantagem de se testar os extratos de briófitas como alternativa de controle de insetos é, segundo Ande (2010), a facilidade de aplicação, disponibilidade, segurança e baixo custo o que pode proporcionar ao produtor um controle dentro dos padrões de sustentabilidade e rentabilidade. Os trabalhos relacionados ao combate de diferentes espécies de lagartas, incluindo *S. frugiperda*, através do controle alternativo com o uso do extrato de briófitas, são poucos e fora do país, porém com resultados positivos (Markham et al. 2006; Haines e Renwick, 2009; Ande, 2010, Asakawa, 1981, 1982)

Moraes et al., (in prep.), estudaram a composição química volátil de *S. subsimplex* e identificaram compostos das classes dos aldeídos, terpenos (sesquiterpenos), ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, hidrocarboneto aromático, ester, éter, cetona e álcool. Existe a necessidade de um estudo maior sobre este grupo de plantas, ampliando o conhecimento da atividade dos seus componentes químicos de interesse, a fim de tornar o uso dessas plantas uma realidade dentro do contexto agronômico.

Diante dos resultados, pode-se concluir que baixas concentrações do extrato de *Sematophyllum subsimplex* como 0,25 µg/µl são suficientes para o controle de *S. frugiperda*, pois apresentou efeito fagodeterrente e inseticida, sendo indicado para controle das lagartas do milho no 2º instar.

Embora os extratos tenham revelado efeito fagodeterrente e inseticida, sendo este um estudo preliminar, sugere-se a continuidade dos estudos no sentido de isolar, quantificar e produzir derivados responsáveis pelos efeitos encontrados, na perspectiva de apresentar um produto compatível com as necessidades da população e o nível de exigências do consumidor atual.

Assim, o avanço nessa linha de conhecimento torna-se de fundamental importância para auxiliar no controle das pragas para àqueles produtores que são adeptos à agricultura orgânica.



A vantagem de se testar os extratos de briófitas como alternativa de controle de insetos é, segundo Ande (2010), a facilidade de aplicação, disponibilidade, segurança e baixo custo o que pode proporcionar ao produtor um controle dentro dos padrões de sustentabilidade e rentabilidade. Os trabalhos relacionados ao combate de diferentes espécies de lagartas, incluindo *S. frugiperda*, através do controle alternativo com o uso do extrato de briófitas, são poucos e fora do país, porém com resultados positivos (Markham et al. 2006; Haines e Renwick, 2009; Ande, 2010, Asakawa, 1981, 1982)

Moraes et al., (in prep.), estudaram a composição química volátil de *S. subsimplex* e identificaram compostos das classes dos aldeídos, terpenos (sesquiterpenos), ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, hidrocarboneto aromático, ester, éter, cetona e álcool. Existe a necessidade de um estudo maior sobre este grupo de plantas, ampliando o conhecimento da atividade dos seus componentes químicos de interesse, a fim de tornar o uso dessas plantas uma realidade dentro do contexto agronômico.

Diante dos resultados, pode-se concluir que baixas concentrações do extrato de *Sematophyllum subsimplex* como 0,25 µg/µl são suficientes para o controle de *S. frugiperda*, pois apresentou efeito fagodeterrente e inseticida, sendo indicado para controle das lagartas do milho no 2º instar.

Embora os extratos tenham revelado efeito fagodeterrente e inseticida, sendo este um estudo preliminar, sugere-se a continuidade dos estudos no sentido de isolar, quantificar e produzir derivados responsáveis pelos efeitos encontrados, na perspectiva de apresentar um produto compatível com as necessidades da população e o nível de exigências do consumidor atual.

Assim, o avanço nessa linha de conhecimento torna-se de fundamental importância para auxiliar no controle das pragas para àqueles produtores que são adeptos à agricultura orgânica.

## REFERÊNCIAS

- Adedeji, O. A., Ayodele, A. O., Elijah, E. C. and A. F. Olubunmi (2012). Phytochemical Screening of Two Tropical Moss Plants: *Thidium gratum* P. Beauv and *Barbula indica* Brid Grown in Southwestern Ecological Zone of Nigeria. *American Journal of Analytical Chemistry* 3: 836-839
- Adio AM, König AW (2005a). Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenioides*. *Phytochemistry*. 66: 599-609.
- Adio AM, König AW (2005b). *Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (hepaticae)*. 266p. Dissertation Master's degree. Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg. Hamburg.
- Agriamual. (2013). Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p.295-332, 2013.
- Almeida, S.S.; Amaral, D.D.; Silva, A.S.L. (2003). Projeto: Inventário florístico e análise fitossociológica dos ambientes do Parque Ecológico do Gunma, município de Santa Bárbara, PA. *Relatório Técnico Final*. Belém: MPEG-CBO/CTBrasil-MCT/JICA. 177p.
- Ande, A. T.; Wahedi, J. A.; and Fatoba, P. O. (2010). "Biocidal Activities of Some Tropical Moss Extracts Against Maize Stem Borers," *Ethnobotanical Leaflets*: Vol. 14: 479-90.
- Asakawa Y. (1981). Biological active substances obtained from bryophytes. *Journal of Hattori Botanical Laboratory* 50: 123 - 142.
- Asakawa Y (1982). Chemical Constituents of Hepaticae. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW (org.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 42, Wien-New York: Springer, p. 1-285.
- Asakawa, Y. (1993). Biologically Active Terpenoids and Aromatic Compounds from Liverworts and the Inedible Mushroom *Cryptoporus volvatus*. In: S.M. COLEGATE, R.J. MOLYNEUX (Eds.). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*, CRC Press, Boca Raton, p.319-347.
- Asakawa Y. (1995). Chemical Constituents of the Bryophytes. In E. Herz, G.W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglick, C. Tamm (org.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 42, New York: Springer- Verlag, p. 1-266.
- Asakawa, Y. (1997). Heterocyclic compounds found in bryophytes. *Heterocycles*, 46: 795-848.

Asakawa, Y. (1999). Phytochemistry of Bryophytes. Biologically Active Terpenoids and Aromatic Compounds from Liverworts. In: *Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Defense*; Romeo, J.T., Ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, p.319-342.

Asakawa Y. (2007). Biologically active compounds from Bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, 79: 57–580.

Asakawa, Y. (2008). Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds. *Curr Pharm Desing* 14: 3067-3088

Asakawa Y, Toyota M, Takemoto T, Kubo I., and K. Nakanishi (1980). Insect antifeedant secoaromadendrane-type sesquiterpenes from *Plagiochila* species. *Phytochemistry* 9: 2147-2154.

Ayres, M., Ayres-Júnior, M., Ayres, D.L. and A.A. Santos (2007). BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.

Barbosa, W. L. R. (2004). *Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais*. Edição revisada. Revista Científica da UFPA, 4. [http://www2.ufpa.br/rcientifica/didaticos\\_cientificos/pdf\\_textos/abord\\_fitoquimica.pdf](http://www2.ufpa.br/rcientifica/didaticos_cientificos/pdf_textos/abord_fitoquimica.pdf). Access in January 2013.

Barros, R. (2012). Pragas do milho. Tecnologia de Produção: Soja e Milho 2011/2012

Bellonda. H. C. H. B. and, F. Zucoloto (2009). In: Panizzi, A. R.; Parra, J. R. Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica. 11, p.425-464.

Bhattarai H.D., Paudel B., Seok Lee H., Lee Y. K. and Yim, J.H. (2008). Antioxidant Activity of *Sanionia uncinata*, a Polar Moss Species from King George Island, Antarctica *Phytother. Res.* 22, 1635–1639.

Bogorni, P. C. and J. D. Vendramim (2005). Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, 34, 311-317.

Bowling, C.C. (1967). Rearing of two lepidopterous pests of rice on common artificial diet. *Ann. Entomol. Soc. America*, 60, 1215-1216.

Castro, D.P., Cardoso, M.G., Moraes, J.C., Santos, N.M. and, D.P. Baliza (2006). Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 8 (1), 27-32.



Castro, M. J. P., Silva, P. S. H. and L.E. de M., Padua (2008). Atividade de extrato de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) sobre *Spodoptera Frugiperda* (J. E. Smith). *Revista Ciencia Agronomica* 39 (3).

Cansu TB, Yayli B, Ozdemir T, Batan N, Alpay Karaoglu S and Yayli N (2013). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwagr.) growing in Turkey. *Turk J Chem.* 37: 213 – 219.

Carvalho, R.L.P. (1970). Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes cultivares de milho, em condições de campo. 1970. 170f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Clarke LJ and Robinson SA (2008). Cell wall-bound ultraviolet-screening compounds explain the high ultraviolet tolerance of the Antarctic moss, *Ceratodon purpureus*. *New Phytol.*, 179: 776-783.

CONAB (2013). Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab.

Cruz, I. (1995). A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. *Embrapa-CNPMS Circular Técnica*, 21, 1- 45, Sete Lagoas.

Cruz, I. (1997). A identificação de pragas da cultura do milho. Sete Lagoas. Embrapa, CNPMS, 67p.

Cruz, I.; M. L. C., Figueiredo and Matoso M. J. (1999). Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. *Embrapa-CNPMS, Circular Técnica*, 30, 1- 40, Sete Lagoas.

Cruz, I.; Turpin, F.T. (1982). Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, DF, v. 17, n. 3, p.355-359.

Davidson, A. J., Harborne, J. B. and Longton, R. E. (1989). Identification of Hydroxycinnamic Acid and Phenolic Acids in *Mnium hornum* and *Brachythecium rutabulum* and Their Possible Role in Protection Against Herbivory. *J. Hattori Bot. Lab.* 67, 415.

Dey A, and De J. N. (2012). Antioxidative potential of bryophytes: Stress tolerance and commercial perspectives: A Rev. *Pharmacologia*, 3: 151-159.

Diéz-Rodríguez, G.I. and C. Omoto (2001). Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. *Neotrop. Entomol.* 30: 311-316

Fatoba PO, Omojasola PF, Awe S and Ahmed FG (2003). Phytochemical Screening of Some Selected Tropical African Mosses. *NISEB Journal* 3: 49-52.

Fatoba, P.O.; Ogunkunle C.O. and Okewole G.A. (2012). Mosses as Biomonitors of Heavy Metal Deposition in the Atmosphere. *International Journal of Environmental Sciences* v.1 n.2. 56-62.

Florschütz-De Waard, J. (1996). Sematophyllaceae in Musci III. *Flora of the Guianas*. Ser. C(1): 384-438p.

Frahm J-P. (2004): A guide to bryological hotspots in Europe. 1. The Azores. – *Archive for Bryology* 3: 1-14.

Gassen, D. (1996). Manejo de pragas associadas à cultura do milho. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 127p.

Gradstein, S.R.; Churchill, S.P. and Salazar-Allen, N. (2001). Guide to the Bryophytes of Tropical America. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. New York, v. 86, 577p..

Goffinet, B., Buck, W. R. and A. J. Shaw (2008). Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In: *Bryophyte Biology*. 2. (Eds. Shaw, A.J. and Goffinet, B.). Cambridge: University Press Cambridge. cap.8, 71-126.

Guo, Wen-Jie, Cui, Feng-Jie, Tao and Wen-Yi (2008). Bioassay-based screening of myxobacteria producing antitumor secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (7), pp. 842-847, 3

Haines, W.P. and Renwick, J.A.A., (2009). Bryophytes as food: comparative consumption and utilization of mosses by a generalist insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 133:296-306.

Hoy, C. W. and Shelton, A. M. (1987). Feeding response of *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to cabbage leaf age. *Environmental Entomology*, v. 16, p. 680-682, 1987.

Harrison, F. P. (1984). Observations on the infestation of corn by fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) with reference to plant maturity. *Florida Entomologist*, v.67, n.3, p. 333-335.



Labbe', C., Faini, F., Villagr n, C., Coll, J. and D. S. Rycroft. (2005). Antifungal and Insect Antifeedant 2-Phenylethanol Esters from the Liverwort *Balantiopsis cancellata* from Chile. *J Agric Food Chem*, 53, 247-249.

Lancher, W. (2000). *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima. p.519.

Landau, E.C.; Garagorry, L.F.; Filho, H.C.; Garcia, J.C.; Duarte, and Cruz, J.C. (2010).  reas de Concentração da Produção Nacional de Milho no Brasil. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: *Associação Brasileira de Milho e Sorgo*.

Maia, W. J. M. S., Carvalho, C. F., Cruz, I., Souza, B. and T. J. A. F. Maia (2004). Influência da temperatura no desenvolvimento de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 28, 520-529.

Markham, K., Chalk, T. and C. N. Stewart Jr. (2006). Evaluation of fern and moss protein-based defenses against phytophagous insects. *Int. J. Plant Sci.*, 167, 111-117.

Martinez, S.S. (2001). The use of plants with insecticidal and repellent properties in pest control. Londrina: *Instituto Agronômico do Paraná*, 4p.

Medeiros, A.R.M. (1990). Alelopatia: importância e suas aplicações. *Hortisul*, v.1, n.3, p.27-32.

Moraes E. N. R. (2006). *Diversidade, Aspectos florísticos e Ecológicos dos musgos (Bryophyta) da Estação Científica Ferreira Penna, Flona de Caxiuanã, Pará, Brasil*. 2006 Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi Belém, 149p. 2006.

Moraes E. N. R. and Lisboa, R. C. L. (2006). Musgos (Bryophyta) da Serra dos Carajás, estado do Pará, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais* 1(1): 39-68.

McCleary, J. A., Sypherd, P. S., and Walkington, D. L. (1960). Mosses as possible sources of antibiotics. *Science* 131: 108.

Olofin, T. A., Akande, A. O. and Oyetayo, V. O. (2013). Assessment of the antimicrobial properties of fractions obtained from bryophytes. *J. Microbiol. Antimicrob.* Vol. 5(5), pp. 50-54.

Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A. and Lopes, J. R. S. (1995). Pragas do milho e seu controle. In: Osuna, J. A., Moro, J. R. (Ed). *Produção e melhoramento do milho Jaboticabal*: FUNEP, p. 81-87.



Parker, J. D, Burkepale, D. E., Collins, D. O. Kubanek, J. and Hay, M. E. (2007) Stream mosses as chemically-defended refugia for freshwater macroinvertebrates. *Oikos* 116: 302-312.

Pejin B, Vujisić L, Sabovljević M, Tešević V and Vajs V (2012). Fatty acid chemistry of *Atrichum undulatum* and *Hypnum andoi*. *Hem. Ind.* 66: 207–209.

Pinheiro da Silva, M. F., Lisboa, C. L., and R. Vasconcelos Brazao (1989). Contribuição ao estudo de briófitas como fontes de antibióticos. *Acta Amaz.* 19, 139-145.

Richards, P. W. (1984). The Ecology of tropical forest bryophytes. In: New Manual of Bryology (Ed. R.M. Schuster). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 2, 1233-1270.

Rodriguez, C.H. and Vendramim, J.D. (1996). Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Manejo Integrado de Plagas*, v.42, p.14-22,

Rodriguez, C.H. and Vendramim, J.D. (1997). Avaliação da bioatividade de extrato aquoso de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.72, p.305-318..

Roel, A. R., Vendramim, J. D., Frighetto, T. S. and Frighetto, N. (2000). Efeito do extrato de acetato de etila de *Trichila pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. *Rev. Bragantia*. Campinas/SP. p. 53-58.

Roel, A. R. (2001). Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, 1, 43-50.

Sá, V.G.M., B.V.C. Fonseca, K.G.B. Boregas and J.M. Waquil. (2009). Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotrop. Entomol.* 38: 108-115.

Sabovljević A, Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Vujicic M, Pejin B and Sabovljevic M. (2010). Comparison of extract bio-activities of *in situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4: 808-812.

Sabovljević A, Sabovljević M, Vujičić M, Skorić J, and Sabovljević M (2012). Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraaceae) in *in vitro* conditions. *Pak. J. Bot.*, 44: 339-344.

Sabovljević A, Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Vujicic M, Pejin B. and Sabovljevic M (2011). Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 565-571.

*Sabovljevic M, Bijelovic A, Grubisic D* (2001). Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lekovite Sirovine* 21: 17-29.

*Santos, R.C. and Lisboa, R.C.L.* (2003). Contribuição ao Estudo dos Musgos (Bryophyta) no Nordeste Paraense, Zona Bragantina, Microrregião do Salgado e Município de Viseu, Pará. *Acta Amazonica*. 33 (3): 415-422.

*Sarmiento, R. de A, Aguiar, R. W. de S. Aguiar, R. de A. S. de S.; Vieira, S. M. J.; oliveira, H. G. de and Holtz, A. M.* (2002). Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 18, n. 2, p. 41-48, dez..

*Sidhu, O.P.; Kumar, V. and Behl, H.M.* (2004). Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. *Industrial Crops and Products* 19 (1), 69-75.

*Siegel, S.* (1956). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 11, 13-19.

*Silva-Filho, M.C. and Falco, M.C.* (2003) Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidos pelas plantas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*.

*Silva, M. P. P. and Pôrto, K. C.* (2007). Composição e riqueza de briófitas epíxilas em fragmentos florestais da Estação Ecológica de Murici, Alagoas. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 243-245.

*Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A.A., and P.R. Petrovick* (2000). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC.

*Tagliari, M. S., Knaak, N. Fiuza, L.M.* (2010). Efeito de extratos de plantas na mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Mith) (Lepidoptera: Noctuidae) *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.2, p.259-264.

*Vidal, C. A. S., Sousa, E. O., Rodrigues, F. G., Campos A. R., Lacerda, S. R. and J. G. M. Costa* (2012). Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *octoblepharum albidum* hedw (Calymperaceae). *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64, 465-470.

*Valicente, F.H. and E. S. Tuelher.* (2009) *Controle biológico da lagarta do cartucho Spodoptera frugiperda, com baculovirus*. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 14p.

Wada, K. and K. Munakata (1971). Insect Feeding Inhibitors in Plants. Part III. Feeding Inhibitory Activity of Terpenoids in Plants. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 115-118.

Xie CF and Lou HX (2009). Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry & Biodiversity* 6: 303-311.

Yano O. (1989). Briófitas. In Fidalgo O, Bononi VLR (eds.). Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. *Série Documentos. Instituto de Botânica*. São Paulo, p. 27-30.



#### 4. EFEITO DE EXTRATO DE *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. (Bryophyta) NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) EM MILHO (*Zea mays* L.)

##### RESUMO

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith é considerada praga-chave da cultura do milho, por danificar os seus diferentes estádios fisiológicos, causando danos economicamente significativos na produção. O controle deste inseto é realizado com produtos químicos sintéticos que acarretam diversos problemas ambientais. O uso de extratos vegetais vem sendo uma prática cada vez mais constante, onde possibilita a aplicação de uma substância de baixa toxicidade ao ambiente, preservando o agro-ecossistema. As briófitas podem ser utilizadas para este fim pelas positivas evidências dos estudos da atividade inseticida e/ou fagodeterrente, no controle deste inseto. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico do musgo *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. (Bryophyta) em diferentes concentrações em larvas de 2º instar da lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* em folhas de milho. O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioecologia de Insetos da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), no ICA, sob temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ . O bioensaio foi realizado com 25 lagartas, o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (2,0%; 1,0%; 0,5% e 0,25%  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e o controle com DMSO) e cinco repetições. Cada repetição foi composta por uma larva de 2º instar, contendo discos foliares de milho tratados com extrato de *L. martianum*. As avaliações de herbivoria e mortalidade foram realizadas após 24, 48 e 72 horas da aplicação do extrato. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste U de ManWitney, para fagodeterência e para mortalidade foi aplicado teste de Fischer com modificação de Tocher. Todos os testes com nível de confiança  $\alpha = 0,05$  e as análises feitas pelo BioEstat 5.0. Os resultados demonstraram fagodeterência independente da concentração. Para mortalidade o tratamento na concentração de  $0,25\mu\text{g}/\mu\text{L}$  apresentou efeito tóxico após 48 horas. Este trabalho é o primeiro no Brasil a testar os efeitos inseticida e/ou fagodeterrente de *L. martianum* servindo como subsídio para pesquisas futuras

Palavras-chave: Briófitas, Extratos vegetais, Fagodeterrencia, Inseticida

---

*Artigo a ser submetido na Archives of Biological Science Belgrade*

***Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. (Bryophyta) extract effect on the control of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn (*Zea mays* L.)**

**ABSTRACT**

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith is considered key pest of corn, by damaging their different physiological stages, causing economically significant damage to production. The control of this insect is made using synthetic chemicals that lead to many environmental problems. The use of plant extracts has been a more and more constant practice, which permits the use of a substance of low toxicity to the environment, while preserving the agroecosystems. The bryophytes can be used for this purpose by the positive evidence of the studies on insecticidal and/or antifeedant activity, in the control of this insect. The aim of this work was to evaluate the effect of the ethanol extract of the moss *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. (Bryophyta) in different concentrations on 2nd instar larvae of fall armyworm, *S. frugiperda* on corn leaves. The experiment was conducted in Laboratório de Bioecologia de Insetos of the Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), in ICA, under temperature of  $24 \pm 2$  °C and relative humidity of  $70 \pm 10\%$ . The bioassay was conducted with 25 caterpillars, a completely randomized design, with five treatments (2.0, 1.0, 0.5 and 0.25 µg/µL and the control with DMSO) and five replications. Each repetition was made up of one 2nd instar larva, containing corn leaf discs treated with *L. martianum* extract. The evaluations of herbivory and mortality were performed after 24, 48 and 72 hours of the extract application. The results were submitted to analysis of variance and the means compared by the Mann-Whitney U test, to antifeedant effect and mortality was applied the Fischer's test with Tocher's modification. All tests with  $\alpha = 0.05$  confidence level and analyzes made by BioEstat 5.0 software. The results showed antifeedant effect independent of concentration. For mortality the treatment at concentration of 0.25 µg/µL showed toxic effect after 48 hours. This work is the first in Brazil to test the insecticide and/or antifeedant activity of *L. martianum*, serving as a resource for future researches.

**Keywords:** Bryophytes, plant extracts, antifeedant effect, insecticide



#### 4.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância para a economia no mundo com destaque pelo papel que cumpre na cadeia alimentar (alimentação humana e animal), por seu valor agrônomo no sistema plantio direto, como também na indústria química e alimentícia, de onde se obtém mais de quinhentos derivados (Alves e Amaral, 2011; Casa et al. 2006).

O Brasil ocupa o terceiro lugar em produção de grãos, sendo o milho cultivado em 95,6% dos municípios brasileiros (Agrianual, 2007). O levantamento nacional, referente a 2012, registra um acréscimo de 9,0% na área plantada e 1,3% no rendimento médio, apresentando variação positiva na estimativa de produção de 1,6% na 1ª safra (34.827,7) e 30,2% na 2ª safra (46.179,5), quando comparados com o ano anterior (IBGE, 2012; CONAB, 2013). Entretanto, existem alguns fatores que contribuem para a perda de produtividade desta cultura, destacando-se os insetos-praga.

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada praga-chave da cultura do milho. Está presente em todos os anos de cultivo, ocorrendo em todo o ciclo da planta, causando danos economicamente significativos na produção, onde as perdas podem alcançar 34% a 60%, variando em função da cultivar utilizada, da fase fenológica, do sistema de produção empregado e do local de plantio. Apesar dos grandes avanços em pesquisa, ainda é a praga de maior preocupação deste vegetal, não somente no Brasil como em outros países da América (Carvalho, 1970; Cruz e Turpin, 1982; Barros, 2012; Cruz, 1995, 1997; Cruz et al. 1999; Sarmiento et al. 2002; Valicente e Cruz, 1991).

O controle de *Spodoptera frugiperda* é realizado principalmente por meio inseticidas químicos sintéticos (Borba et al. 2003; Henandez e Vendramim, 1996; Valicente e Fonseca, 2004). O uso intensivo tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de contaminação ambiental (alimentos, solo e água); desequilíbrio biológico; resistência de patógenos e insetos-praga a certos princípios ativos; redução da biodiversidade, bem como, intoxicação animal e humana (Bettiol; Morandi, 2009; Borba et al. 2006).

Uma alternativa de controle para este inseto-praga, visando evitar prejuízos na produção e riscos à saúde, é a utilização de produtos provenientes de plantas em substituição aos inseticidas altamente tóxicos. O uso de extratos vegetais vem sendo uma prática cada vez mais constante para os agricultores, principalmente da linha de produção orgânica



(INNECCO, 2006) e agricultura familiar. É uma opção viável, barata e bastante promissora, além do que são compatíveis com programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Leão, 1996; Santiago et al. 2008; Smith, 2005; Souza, 2004; Viegas-Junior, 2003).

Neste sentido, as briófitas (musgos, hepáticas e antóceros) tem sido alvo de pesquisas quanto às análises dos seus compostos biologicamente ativos que possam ser utilizados para proteção de culturas (Adebiyi et al. 2012; Adio 2005a, b; Asakawa, 1982, 1990a, b, 1993, 1995, 1997, 1999, 2007, 2008; Bhattarai et al., 2008; Cansu et al. 2013; Clarke e Robinson, 2008; Dey e Nath De 2012; Fatoba et al. 2003, 2012; Fran e Kirchhoff, 2002; Frahm, 2004; Guo Lei. et al. 2008; Jockovic, 2008; Nagashima et al. 2002; Pejin et al. 2012; Rauha et al. 2000; Sabovljevic A. et al. 2010, 2011, 2012; Sabovljevic M. et al. 2001; Xie e Lou, 2009).

Roel (2001) e Cruz et al. (2006) reportam que a maioria dos compostos destas plantas conferem estratégia de sobrevivência e proteção como mecanismos de defesa a patógenos e resistência a insetos, caramujos, lesmas, provocando vários efeitos sobre pragas como toxicidade, repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases. Também são reportadas propriedades e aromas característicos como pungência e amargor.

Os extratos de briófitas principalmente musgos e hepáticas tem comprovado a atividade dos seus compostos em várias pesquisas no controle de distintas espécies de *Spodoptera* demonstrando ação antifágica (fagodeterrente), como em Frahm e Kirchhoff (2002) que estudaram o efeito de extratos alcoólicos em diferentes concentrações de *Neckera crispa* Hedw (musgo) e *Porella obtusata* (Taylor) Trevis. (hepática) sobre lesmas que atacam a alface (*Lactuca sativa* L.) e perceberam que ambas as espécies produziram efeitos antifágicos sobre o molusco.

Benesova et al. (1969) isolaram um sesquiterpeno – pungsona- da hepática *Aneura pingues*, onde este composto apresentou forte efeito antifágico; Wada & Munakata (1971) testaram a atividade deste composto sobre a lagarta *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera) e observaram uma inibição da alimentação na concentração de 0.5%; Labbe' et al. (2005) analisaram os compostos químicos de *Balantiopsis cancellata* (Nees) Steph. com o mesmo inseto e comprovaram resultado positivo para fagodeterrencia; Haines e Renwick (2009) compararam a aceitabilidade e qualidade de quatro espécies de musgos pela lagarta *Trichoplusia ni* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) e os resultados também evidenciaram fagodeterrencia.

Para atividade inseticida, Frahm (2004) relatou que espécies do gênero *Sphagnum* (musgo) foram descobertas como eficiente repelente de carrapatos em uma fazenda nos Estados Unidos gerando patentes; Markham et al. (2006) avaliaram esta atividade em espécies de musgos contra os insetos *S. frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera) com resultado positivo; Ande et al. (2010) também avaliaram espécies de musgos contra a lagarta da broca do caule do milho comprovando atividade tóxica.

Entre outras atividades de importância pode-se citar a antibacteriana: (Basile et al. 1999, McCleary et al. 1960, Pinheiro et al. 1989; Vidal et al. 2012) e antifúngica: (Asakawa et al. 1976). Shuster et al. (2004) mostraram atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos como *Phytophthora infestans* (Mont.). No Brasil Pinheiro et al. (1989) e Vidal et al. (2012) testaram e comprovaram atividades antibacterianas para espécies de musgo e hepática.

Este trabalho é o primeiro estudo com briófitas na Amazônia e no Brasil, que vem testar de uma maneira aplicada as atividades inseticida e/ou fagodeterrente de extrato de musgos, com a proposta de que as briófitas podem ser utilizadas de várias formas para proteger e manter os processos de produção agrícola com maior sustentabilidade.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do extrato etanólico do musgo *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. (Bryophyta) em diferentes concentrações em larvas de 2º instar da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho em condições controladas.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 SELEÇÃO, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.

A espécie escolhida para esta pesquisa foi o musgo *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hal. A seleção foi baseada em literatura, onde foram observadas atividades antimicrobianas e fagodeterrentes de táxons pertencentes ao mesmo gênero ou espécie da selecionada para este trabalho, como de Haines e Renwick (2009) e Pinheiro et al. (1989). Outro critério levado em consideração foi à ocorrência da espécie em toda a região Amazônica e a fácil adaptação em diferentes ambientes (Moraes, 2006; Tavares et al. 2013).

As amostras foram coletadas em um fragmento de Floresta Amazônica no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Bárbara, Pará, Brasil, (01°13'00.86''S e 48°17'41.18''W), com uma área de 400 ha de floresta nativa tropical úmida e 140 há de área



aberta para uso múltiplo, a qual tem sofrido diversas alterações em decorrência do crescimento urbano, sendo o Parque drenado pelos igarapés Tracuateua e Tauariê (Almeida et al. 2003).

O material foi coletado em sacos de papel, em floresta secundária de terra firme, próxima do igarapé e da entrada das parcelas dos igapós, sobre solo, seguindo a metodologia de Yano (1989), sendo submetido a secagem à temperatura ambiente.

Os procedimentos de identificação e separação foram realizados no Laboratório de Briologia do Museu Emílio Goeldi, pela autora do trabalho que é especialista em briófitas, através de literatura especializada (Yano, 1992). A classificação taxonômica adotada foi a de Goffinet et al. (2008) e o material testemunho encontra-se depositado no Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Pará, Brasil.

Após a triagem, o material botânico foi lavado, seco ao sol e conservado em local refrigerado. As briófitas de diferentes gêneros e espécies, ocorrem juntas em tufo, tapetes ou moitas em seu habitat natural (Richards, 1984), por esse motivo, foi feita a separação minuciosa apenas dos espécimes do musgo pertencente ao estudo, com auxílio de pinça (Flume 5) e estereomicroscópio (Leica, Wild M3Z), usando-se a planta inteira (gametófito).

#### 4.2.2. PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO

A preparação foi realizada no Laboratório da Central de Extração Química da Universidade Federal do Pará (UFPA). A amostra seca de *L. martianum* (gametófito) foi pesada (16,13g, peso mínimo) em balança de precisão, (marca SHIMADZU, modelo AY220), após foi triturada em liquidificador e acondicionada em Erlenmeyer. Foi adicionado Etanol PA (600 ml) até a completa submersão do material, sendo o recipiente vedado com folha de alumínio.

O procedimento consistiu em três extrações por maceração a frio, utilizando etanol PA, sendo o material a cada dois dias, filtrado a vácuo e remacerado, renovando somente o líquido extrator, para assegurar que o maior número de substâncias fosse extraída desta matriz vegetal, por um período de 6 dias.

O volume obtido (extrato bruto) de cada etapa foi reunido em um balão volumétrico, após, concentrado em rotavapor (marca Büchi, modelo R-3), sob pressão reduzida ( $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), para tornar mínima, possíveis degradações dos constituintes químicos devido à ação da temperatura elevada (Barbosa, 2004; Simões et al. 2000).

À massa contida no balão foi adicionado metanol apenas para facilitar a dissolução do conteúdo da parede do balão, e então ser feita a transferência para um frasco de vidro tarado e levado a capela de fluxo laminar até a evaporação total do líquido extrator. O teor extrativo foi determinado pela massa seca de 167,3 mg (rendimento) de extrato etanólico de *L. martianum*.

#### 4.2.3. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES

O extrato etanólico de *L. martianum* foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Foi preparada uma solução estoque, na concentração de 20mg/10ml, relação massa do extrato/volume solvente. A partir desta solução foram preparados os tratamentos utilizados no experimento nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/µl de acordo Markham et al. (2006), adaptado. Para o grupo controle foi usado DMSO diluído em água destilada.

#### 4.2.4. BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO

##### 4.2.4.1. Criação de *Spodoptera frugiperda*

A criação das lagartas foi realizada no Laboratório de Bioecologia de Insetos (LABIN/ICA/UFRA), em ambiente climatizado regulado a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ . A coleta inicial das lagartas foi feita em uma área de cultivo de milho próxima ao Departamento de Solos da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), assim como, em plantas cultivadas em vasos com adubação padrão e mantidas em casa de vegetação. Os insetos foram posteriormente colocados individualmente em caixa gerbox plásticas transparentes de 12 x 12 x 3cm, contendo dieta natural (folhas de milho) para obtenção da colônia inicial das larvas.

Ao transformarem-se em pupas, as larvas foram transferidas para novas caixas gerbox limpas, com papel filtro umedecido para manter a umidade. Após a emergência, as mariposas foram mantidas em tubos de PVC (cloreto de polivinila) de 30cm de diâmetro por 40cm de altura, revestidas internamente com papel de filtro para facilitar a postura, com a parte inferior apoiada em prato plástico revestido com papel filtro e a parte superior tampada com filme plástico perfurado para entrada de ar.

A alimentação das mariposas foi realizada com solução de mel a 10%, a qual colocada dentro de uma placa de petri, embebida em pedaços de algodão, renovados a cada dois dias.



As posturas foram retiradas recortando a massa de ovos juntamente com o papel e acondicionadas em caixas gerbox esterilizadas. As larvas recém-eclodidas eram transferidas com pincel para gaiolas feitas de garrafas Petis (Maia et al. 2004), adaptadas para lagartas.

Foram colocadas folhas de milho novas dentro das garrafas, apoiadas em disco de isopô (com abertura no centro), contendo água no fundo para manter a turgidez das folhas. Após o primeiro instar, as larvas foram colocadas em copos descartáveis contendo a dieta artificial de Bowling (1967): inicialmente 100 gramas de feijão foi cozido e triturado com 275 mL de água destilada; adicionou-se a levedura de cerveja (15 g), ácido ascórbico (3g), nipagin (1g) e benzoato de sódio (0,5g), dissolvidos em 100ml de água destilada; posteriormente 1,0ml de formaldeído e Agar (9g) previamente dissolvido em 250ml de água, sob aquecimento.

#### 4.2.4.2. Experimento: teste por ingestão sem chance de escolha

O bioensaio foi realizado com 25 lagartas de 2º instar, individualizadas em placa de petri de 10cm, contendo um disco foliar de milho, para observação da eficácia do extrato etanólico de *L. martianum* por ingestão de dieta natural.

A viabilidade larval de *S. frugiperda* foi avaliada usando-se diferentes concentrações dos extratos etanólicos brutos de *L. martianum*. Para os testes foram aplicados cinco tratamentos (2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/µL) e o controle (DMSO diluído em água destilada). As concentrações foram baseadas em trabalhos realizados com extratos de briófitas no controle de insetos, incluindo a ordem Lepidoptera e a espécie *S. frugiperda* (Borgoni e Vendramim, 2005; Markham et al. 2006; Labbe' et al. 2005; Haines e Renwick, 2009, com adaptações).

É importante considerar que a sensibilidade das lagartas aos compostos secundários diminui conforme o seu desenvolvimento larval avança (Bellanda e Zucoloto, 2009). Este instar foi escolhido em decorrência deste fato, mas também para que o controle pudesse ser testado no início da fase larval, quando a preferência alimentar e as infestações frequentemente se concentram nas folhas jovens (Harrison, 1984; Hoy e Shelton, 1987). Desta forma, impedindo o seu crescimento até os ínstaes posteriores, fases em que se instalam nas folhas do cartucho, perfuraram a base da planta, infestam e danificam a espiga, causando danos a plantação (Parra et al. 1995; Gassen, 1996).

As seções foliares de milho foram cortadas com um perfurador tipo scrapbook, obtendo-se discos de 2,3 cm de diâmetro e lavadas em água destilada para evitar contaminação. Nestas foram pipetados 50 µL dos respectivos tratamentos. Os discos foram

mantidos em placas de Petri, em temperatura ambiente, até a evaporação do solvente. Após as placas de petri foram previamente forradas com discos de papel de filtro umedecidos (para preservar a turgescência dos discos foliares) as quais receberam uma lagarta, cada.

#### 4.2.4.3. Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Cada repetição foi composta por uma larva de 2º ínstar (Figura 1).

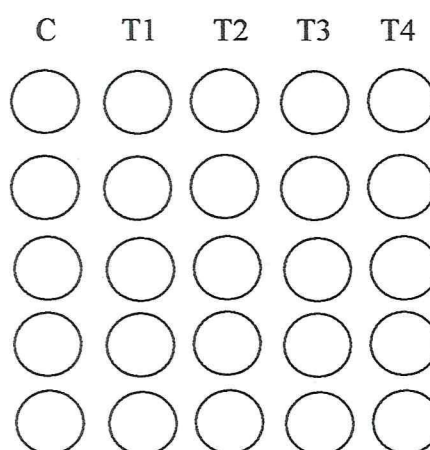


Figura 1. Croqui do teste por ingestão sem chance de escolha com *Spodoptera frugiperda* tratado com extrato de *Leucobryum martianum* (Hornsch.) hampe ex Müll. Hall. C. Grupo controle; T1. Tratamento com 2,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; T2. Tratamento com 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; T3. Tratamento com 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; T4. Tratamento com 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

#### 4.2.4.4. Análise dos dados

Foram analisados o consumo alimentar/herbivoria e a mortalidade das lagartas em 24, 48 e 72 horas após a realização do experimento. Para a primeira análise foi elaborada uma escala de dano foliar relativa (0 a 5), adaptada de Markham et al. (2006), como uma ferramenta de comparação quantitativa para determinar a porcentagem de consumo de alimento/herbivoria nos discos foliares de milho. Os escores 0, 1, 2, 3, 4 e 5 representam respectivamente, 0%, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-99% e 100% de dano foliar. A taxa de mortalidade foi medida contabilizando o número de morte das lagartas ao dia, sendo as mesmas retiradas das placas após constatação de morte.

Os dados experimentais contabilizados às 24, 48 e 72 horas foram submetidos à análise de variância, para fagodeterrência, e suas médias comparadas pelo teste U de Mann-



Whitney (Siegel, 1956). O teste foi aplicado para avaliar a significância das diferenças entre o grupo de controle e cada grupo de tratamento, além de verificar possíveis diferenças entre os tratamentos. Todos os testes são unilaterais, utilizam um nível de confiança de  $\alpha = 0,05$ .

Pressupondo que o número de lagartas mortas nos tratamentos é maior que no grupo controle foi aplicado o teste de Fischer (Siegel, 1956), com nível de confiança  $\alpha = 0,05$ . Neste caso, foi verificada a significância das diferenças entre as frequências de duas amostras independentes (controle x cada um dos tratamentos). Neste desenho, as amostras foram pequenas, para tanto foi utilizada a Modificação de Tocher, o qual verifica a significância de diferenças não tão extremas. Ambos os cálculos representam a prova estatística mais poderosa para dados dispostos em tabelas 2 x 2 (Siegel, 1956).

Todas as análises foram realizadas através do software BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007).

### **4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1. FAGODETERRÊNCIA**

##### **4.3.1.1. Após 24 horas**

De acordo com a soma dos escores dos tratamentos (figura 2) houve um menor consumo foliar nos tratamentos em relação ao grupo controle. Entretanto, após a aplicação do Teste U de Mann-Whitney não foi encontrada diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos (P-valor=0,0586) (Tabela 1).

Após 24 horas as diferenças observadas entre os escores de consumo foliar não foram estatisticamente suficientes para se confirmar uma ação fagodeterrente do extrato de *L.martianum* já que seus escores são idênticos.

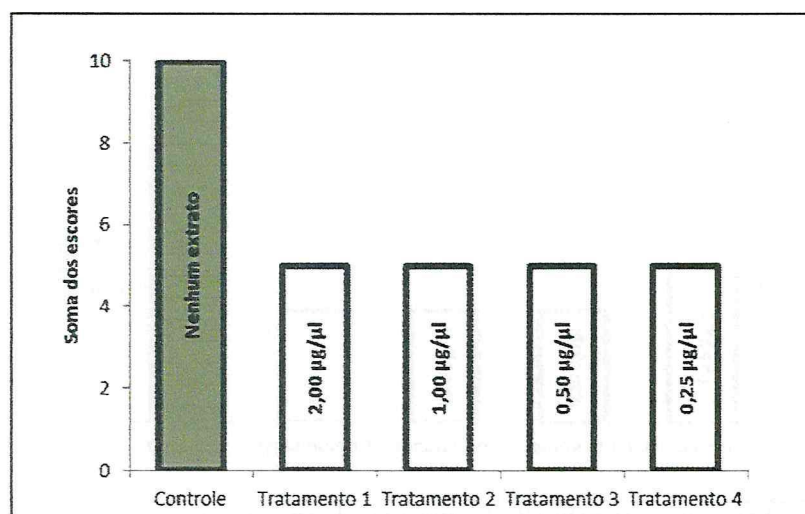


Figura 2. Soma dos escores de consumo de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar entre diferentes concentrações de extratos de *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall. Resultado após 24 horas.

Tabela 1. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicado as diferentes concentrações de extratos da espécie *Leucobryum martianum* contra fagodeterrância de *Spodoptera frugiperda* no 2º instar, realizado após 24 horas. Comparação do grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 1 (2,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 2 (1,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 3 (0,50 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 4 (0,25 µg/µl)
Estatística “z”	1,5667	1,5667	1,5667	1,5667
Valor crítico	16449	16449	16449	16449
P-valor	0,0586	0,0586	0,0586	0,0586

#### 4.3.1.2. Após 48 horas

Observou-se em 48 horas, um menor consumo foliar em relação à avaliação de 24 horas (Figura 3). Após a aplicação do Teste U, houve uma diferença significativa entre o grupo controle e todos os tratamentos (p-valor=0,00045 e p-valor=0,0184) (Tabela 2).

A diferença estatística indica uma ação fagodeterrente dos extratos de *L. martianum* sobre as lagartas do milho no 2º instar. Porém, não foi observada evidência de diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Portanto, nesta análise não houve nenhum tratamento mais eficiente que outro.



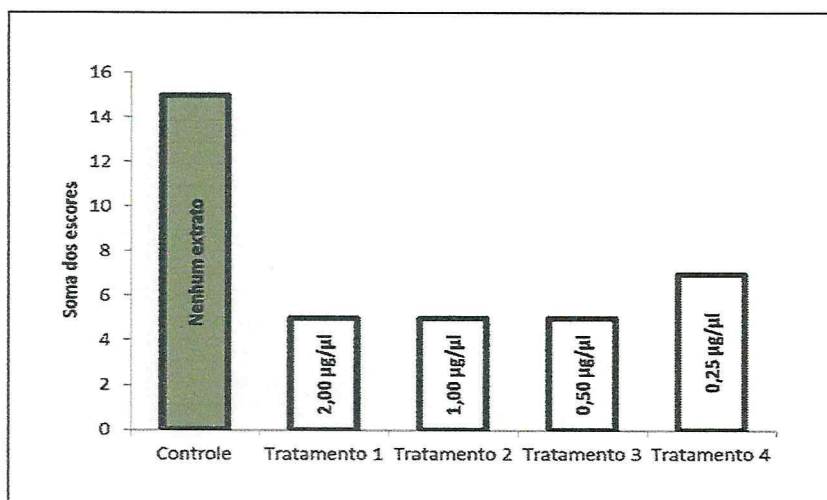


Figura 3. Soma dos escores de consumo de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar entre diferentes concentrações de extratos de *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall. Resultado após 48 horas.

Tabela 2. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicados as diferentes concentrações de extratos da espécie *Leucobryum martianum* contra fagodeterrância de *Spodoptera frugiperda* no 2º instar, realizado após 48 horas. Comparação do grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 1 (2,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 2 (1,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 3 (0,50 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	2,6112	2,6112	2,6112	2,0889
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0045	0,0045	0,0045	0,0184

Tabela 3. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicados aos dados para diferentes concentrações de extratos da espécie *Leucobryum martianum* contra fagodeterrância de *Spodoptera frugiperda* no 2º instar, realizado após 48 horas. Comparação dos tratamentos entre si, adotados dois a dois.

	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 2 (1,00 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 3 (0,50 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	0,0000	0,0000	0,5222	0,0000	0,5222	0,5222
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,5000	0,5000	0,3008	0,5000	0,3008	0,3008

#### 4.3.1.3. Após 72 horas

Com a observação em 72 horas percebe-se que os consumos foliares continuam sendo menores nos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle (Figura 4). Entretanto encontram-se diferenças estatísticas significativas que continuam demonstrando uma ação fagodeterrente do extrato de *L. martinum*, porém não havendo diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (Tabela 4).

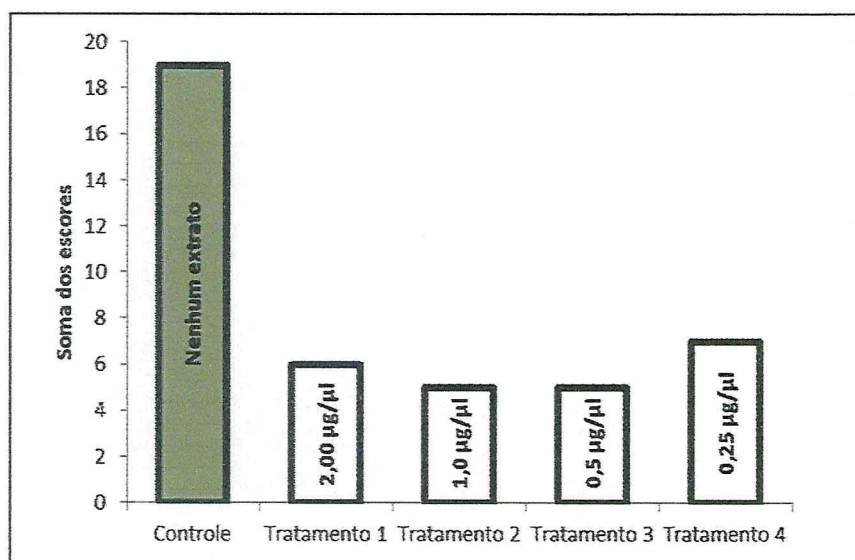


Figura 4. Soma dos escores de consumo de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar entre diferentes concentrações de extratos de *Leucobryum martinum* (Hornsch.) Hampe ex Müll. Hall. Resultado após 72 horas.

Tabela 4. . Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicados as diferentes concentrações de extratos da espécie *Leucobryum martinum* contra fagodeterrância de *Spodoptera frugiperda* no 2º instar, realizado após 72 horas. Comparação do grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 1 (2,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 2 (1,00 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 3 (0,50 µg/µl)	Grupo de controle (nenhum extrato) vs. Tratamento 4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	2,6112	2,6112	2,6112	2,4023
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0045	0,0045	0,0045	0,0081



Tabela 5. Resultados dos Testes U de Mann-Whitney aplicados aos dados para diferentes concentrações de extratos da espécie *Leucobryum martianum* contra fagodeterrância de *Spodoptera frugiperda* no 2º instar, realizado após 72 horas. Comparação dos tratamentos entre si, adotados dois a dois.

	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 2 (1,00 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 1 (2,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 3 (0,50 µg/µl)	Tratam. 2 (1,00 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)	Tratam. 3 (0,50 µg/µl) vs. Tratam. 4 (0,25 µg/µl)
Estatística “z”	0,5222	0,5222	0,1044	0,0000	0,5222	0,5222
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,3008	0,3008	0,4584	0,5000	0,3008	0,3008

Também não foram encontradas diferenças entre os diferentes tratamentos, como mostram os resultados do Teste U, aplicado aos tratamentos adotados dois a dois (Tabela 5).

A figura 5 demonstra a comparação da evolução do consumo alimentar de *S. frugiperda* simultaneamente às 24, 48 e 72 horas de aplicação dos tratamentos.

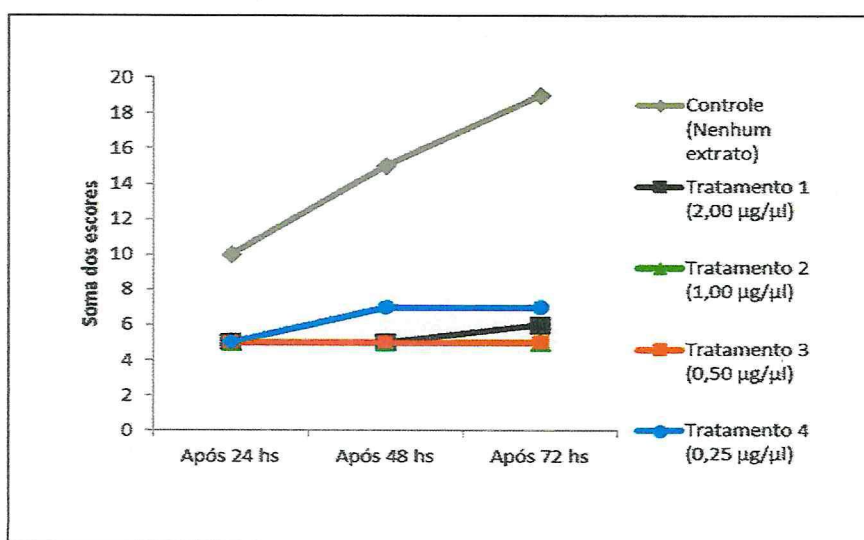


Figura 5. Evolução da soma dos escores de consumo de *Spodoptera frugiperda* em 2º instar entre diferentes concentrações de *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Mull. Hall., realizado após 24, 48 e 72 de instalação do experimento.

Os resultados dos tratamentos 2 e 3 se sobrepõem ao longo dos três dias de observação. Constata-se no experimento realizado com extrato de *L. martianum* que as diferenças de consumo são maiores no controle do que entre os grupos de lagartas que receberam as diferentes concentrações do extrato. Ademais os grupos de lagarta que se

alimentaram de folha de milho com concentrações de extrato de 2,00; 1,00 e 0,50 µg/µl praticamente não apresentaram diferenças entre os escores, indicando que estas três concentrações têm aproximadamente a mesma eficiência em promover uma ação fagodeterrente em lagartas do milho no 2º instar.

#### 4.3.2. MORTALIDADE

##### 4.3.2.1. Após 24 horas

O Teste de Fisher foi aplicado para a comparação entre o Grupo de Controle e o Tratamento 4, pois foi o único tratamento que apresentou diferenças quanto a mortalidade das lagartas, com uma morte, em relação ao grupo controle e aos demais tratamentos (sem mortes). Portanto, os resultados da Tabela 6 são válidos para comparar o Tratamento 4 com qualquer outro grupo.

Apesar do Tratamento 4 ter registrado uma morte, não houve diferença significativa com relação ao grupo controle ( $p$ -valor=0,500 (Tocher), ou seja, o número de mortes no grupo que recebeu o Tratamento 4 é estatisticamente igual ao do grupo de controle.

No entanto para análise após 24 horas nenhuma concentração do extrato de *L. martianum* mostrou ação tóxica (inseticida) sobre as lagartas de 2º instar. Obviamente, não existem diferenças entre os tratamentos, pois seus escores são idênticos.

Tabela 6. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 4 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 24 horas.

	Controle	Tratamento 4	Total
Viva	5	4	9
Morta	0	1	1
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fischer)	0,5000		
p-valor (Tocher)	0,5000		



#### 4.3.2.2. Após 48 horas

O Teste de Fisher fez a comparação dos resultados do grupo controle com todos os tratamentos. Os tratamentos 1 e 2 (Tabela 7), o Tratamento 3 (Tabela 8) e o Tratamento 4 (Tabela 9).

Constatou-se que após 48 horas, para todos os tratamentos foram registradas mortes. Nos tratamentos 1 e 2 não foram observadas diferenças significativas entre os números de lagartas vivas ou mortas e o grupo de controle e entre os respectivos tratamentos (p-valor Fisher e Tocher= 0,222).

Tabela 7. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamentos 1 ou 2 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 1 ou 2 2,00 ou 1,00 µg/µl	Total
Viva	5	4	9
Morta	0	1	1
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fischer)	0,500		
p-valor (Tocher)	0,500		

Observa-se na Tabela 8 que o número de mortes no grupo que recebeu o Tratamento 3 é estatisticamente igual ao do grupo de controle.

Embora a soma dos grupos que receberam as concentrações de 2,00, 1,00 µg/µl ou 0,50 µg/µl de extrato tenham apresentado três lagartas mortas, não houve nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle. Observa-se que após 48 horas, não há evidência de qualquer ação inseticida das concentrações utilizadas, já que as diferenças estatísticas não foram significativas.

Tabela 8. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 3 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 3 0,50 µg/µl	Total
Viva	5	3	8
Morta	0	2	2
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fischer)	0,222		
p-valor (Tocher)	0,222		

Com relação ao Tratamento 4, o número de mortes foi estatisticamente maior que ao do Grupo de Controle. Nesse momento foi observada uma ação inseticida de *Leucobryum martianum* à concentração de 0,25 µg/µl após 48 horas sobre *S. frugiperda* em 2º instar.

Tabela 9. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 4 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 4 0,25 µg/µl	Total
Viva	5	1	6
Morta	0	4	4
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fischer)	0,0238		
p-valor (Tocher)	0,0238		

Comparando-se os Tratamentos 3 e 4 entre si, foi possível observar diferenças significativas, onde o Tratamento 4 promove um número maior de mortes, em torno de 50% (Tabela 10). Verifica-se que o número de mortes no grupo que recebeu o Tratamentos 3 é estatisticamente menor ao grupo do Tratamento 4. Portanto, é provável que a concentração de 0,25 µg/µl de *L. martianum* tenha a mesma ação inseticida quanto uma concentração de 0,50 µg/µl sobre lagartas do milho no 2º instar após 48 horas.

Tabela 10. Número de lagartas vivas e mortas observadas para os Tratamentos 3 e Tratamento 4 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 48 horas.

	Tratamento 3 0,50 µg/µl	Tratamento 4 0,25 µg/µl	Total
Viva	3	1	4
Morta	2	4	6
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,2619		
p-valor (Tocher)	0,0238		

#### 4.3.2.3. Após 72 horas

Na avaliação de 72 horas, observou-se que o número de mortes no grupo que recebeu os Tratamentos 2, 3 e 4 é estatisticamente maior ao do Grupo de Controle (Tabela 11). Também observou-se que o número de mortes nos grupos que receberam os tratamento 3 ou 4 é estatisticamente maior ao do tratamento 1 (Tabela 12)

Tabela 11. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 2 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas

	Controle Nenhum extrato	Tratamento 2 1,00 µg/µl	Total
Viva	5	0	5
Morta	0	5	5
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher)	0,0040		

Tabela 12. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Tratamento 1 e Tratamentos 3 ou 4 de extratos da espécie *Leucobrium martianum*, com lagartas do milho no 2º instar, realizado após 72 horas

	Tratamento 1 2,00 µg/µl	Tratamentos 3 ou 4 0,50 ou 0,25 µg/µl	Total
Viva	3	1	4
Morta	2	4	6
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
p-valor (Fisher) =	0,2619		
p-valor (Tocher) =	0,0238		



A Figura 6 mostra que todos os tratamentos apresentam ocorrência de mortalidade progressiva no decorrer do tempo. Após 48 horas, percebeu-se que nos tratamentos 3 e 4 já haviam mais de 50% de lagartas mortas.

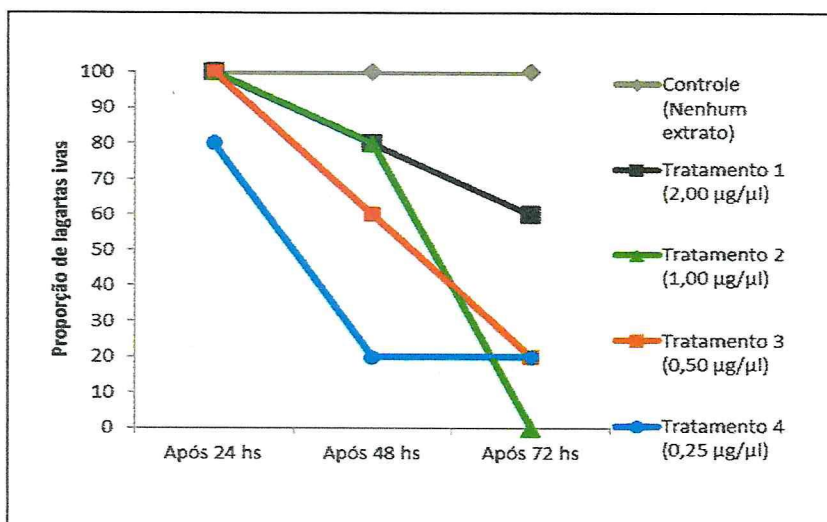


Figura 6. Evolução da proporção de *Spodoptera frugiperda* vivas entre diferentes concentrações de *Leucobryum martianum* (Hornsch.) Hampe ex Mull. Hall., Realizado após 24, 48 e 72 de instalação do experimento.

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com pesquisas de outros autores (Ande, 2010, Haines e Renwich, 2009, Parker et al. 2007, Davidson et al. 1990). Estes também fizeram estudos experimentais com espécies de musgos, e comprovaram ação fagodeterrente sobre diferentes táxons de lagartas, incluindo a *S. frugiperda*, inseto utilizado neste trabalho.

Fran e Kirchoof (2002), avaliaram o efeito do extrato etanólico do musgo *Neckera crispa*, no controle da lesma *Arion lusitanicus* (Mabille) em concentrações de 2,5%, 1,0% e 0,5% semelhantes as utilizadas neste estudo, e obtiveram atividade fagodeterrente para as concentrações de 1% ou 0,5%. Neste estudo que testou o extrato de *L. martianum*, as concentrações de 1% e 0,5% também mostraram atividade fagodeterrente.

Markham et al. (2006) avaliaram a defesa de seis espécies de musgos sobre a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera) e lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, aplicando concentrações de extrato próximas às utilizadas neste estudo (0,1, 0,3, 0,6, 0,9 1,4 e 2,1 µg/µl). Foi comprovada a fagodeterência, estando de acordo com esta pesquisa.

Santiago et al. (2008) verificaram que a duração da fase larval e viabilidade das lagartas alimentadas com dieta artificial contendo extrato de *Ruta graveolens* não diferiu significativamente da testemunha. No estudo com *L. martianum* não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle durante as primeiras 24 horas, tanto para herbivoria como mortalidade. Para mortalidade houve diferença significativa após 72 horas com exceção do Tratamento 4 (0,25 µg/µl) que diferiu do controle e do tratamento 3, após 48 horas, demonstrando uma ação tóxica.

Diante dos resultados pode-se concluir que baixas concentrações do extrato de *Leucobryum martianum* como 0,25 µg/µl e 0,5 µg/µl possivelmente sejam eficientes para o controle das larvas de *S. frugiperda*, pois apresentaram efeito fagodeterrente e inseticida, podendo ser indicada para estudo do controle sobre lagartas do milho no 2º instar.

É importante ressaltar que concentrações menores também podem ocasionar efeito positivo, provavelmente devido ao sinergismo dos compostos químicos. Segundo Gallo et al. (2002) a presença de mais de um produto ativo nos inseticidas vegetais é considerada como uma vantagem, já que reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelos insetos.

Moraes et al. (in prep.) estudaram a composição química volátil de *L. martianum* e identificaram compostos aromáticos, sesquiterpenos, ácidos graxos, aldeídos e hidrocarbonetos aromáticos, entre outros.

Os trabalhos relacionados ao combate da lagarta do cartucho em milho através do controle alternativo com o uso do extrato de briófitas são poucos e fora do país, porém com resultados positivos. Dentro dessa ótica, há a necessidade de um estudo maior deste grupo ampliando o conhecimento dos seus componentes químicos ativos, a fim de tornar o uso dessas plantas uma realidade dentro do contexto agronômico.

Embora os extratos tenham revelado um efeito fagodeterrente e inseticida, sendo este um estudo preliminar, sugere-se a continuidade dos estudos no sentido de isolar, quantificar, produzir derivados responsáveis pelos efeitos encontrados na perspectiva de apresentar um produto compatível com as necessidades da população e o nível de exigências do consumidor atual. Assim, o avanço nessa linha de conhecimento torna-se de fundamental importância para auxiliar no controle das pragas para aqueles produtores que são adeptos à agricultura orgânica.



## REFERÊNCIAS

- Adedeji OA, Ayodele AO, Elijah EC, Olubunmi AF (2012). Phytochemical Screening of Two Tropical Moss Plants: *Thuidium gratum* P. Beauv and *Barbula indica* Brid Grown in Southwestern Ecological Zone of Nigeria. *American Journal of Analytical Chemistry* 3: 836-839.
- Adio AM and König AW. (2005a). Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenoides*. *Phytochemistry*. 66: 599-609.
- Adio AM, and König AW. (2005b). Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (hepaticae). 266p. *Dissertation Master's degree. Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg. Hamburg.*
- Agriamual. (2013). Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p.295-332, 2013.
- Almeida, S.S.; Amaral, D.D. and Silva, A.S.L. (2003). Projeto: Inventário florístico e análise fitossociológica dos ambientes do Parque Ecológico do Gunma, município de Santa Bárbara, PA. *Relatório Técnico Final*. Belém: MPEG-CBO/CTBrasil-MCT/JICA. 177p.
- Alves, H.C.R. and Amaral, R.F. (2011). *Informe Rural Etene*. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste/ETENE; Ambiente de Estudos, Pesquisas e Avaliação - AEPA Ano V-Setembro de 2011. Nº 16. Disponível em <http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/does/ireano5n16.pdf>. em: 30 de junho de 2013.
- Ande, A. T., Wahedi, J. A., and P. O. Fatoba, (2010). Biocidal Activities of Some Tropical Moss Extracts Against Maize Stem Borers. *Ethnobotanical Leaflets*, 14, 479-90.
- Asakawa Y. (1982). Chemical Constituents of Hepaticae. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW (org.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 42, Wien-New York: Springer, p. 1-285.
- Asakawa, Y. (1990a). Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy* (Eds H. D. Zinsmeister, and R. Mues), 369-410. Clarendon Press: Oxford, U.K.
- Asakawa Y. (1990b). Biologically active substances from bryophytes. In Chopra R N, Bhatla SC (Eds.). *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, p.259-287.
- Asakawa, Y. (1993). Biologically active terpenoid and aromatic compounds from liverworts and the inedible mushroom *Cryptoporus colvatus*. In: *Bioactive Natural Product-Detection*,



*Isolation and Structural Determination*. Congatae, S. M. Molyneus, R. J. (Eds.), CRC Press, Boca Ration, p.1-618.

Asakawa Y (1995). Chemical Constituents of the Bryophytes. In E. Herz, G.W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglick, C. Tamm (org.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 42, New York: Springer- Verlag, p. 1-266.

Asakawa, Y. (1997). Heterocyclic compounds found in bryophytes. *Heterocycles*, 46: 795-848.

Asakawa, Y. (2007). Biologically active compounds from Bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, v.79, n. 4: p.557-580, 2007.

Asakawa, Y. (2008). Liverworts-Potential Source of Medicinal Compounds. *Curr Pharm Desing* 14: 3067-3088

Bhattarai H. D., Paudel B., Lee H. S., Lee Y. K. and Yim J. H. (2008). Antioxidant Activity of *Sanionia uncinata*, a Polar Moss Species from King George Island, Antarctica. *Phytother. Res.* 22, 1635–1639.

Barbosa, W. L. R. (2004). Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Edição revisada. *Revista Científica da UFPA*, 4. [http://www2.ufpa.br/rcientifica/didaticos\\_cientificos/pdf\\_textos/abord\\_fitoquimica.pdf](http://www2.ufpa.br/rcientifica/didaticos_cientificos/pdf_textos/abord_fitoquimica.pdf). Access in January 2013.

Barros, R. (2012). Pragas do milho. *Tecnologia de Produção: Soja e Milho* 2011/2012.

Basile A, Giordano S, López- Sáez JÁ and Cobiánchi RC (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479–1482.

Benesova, V., Z. Samek, V. Herout and F. Sorm. (1969). On terpenes. CXCVIII. Isolation and structure of pinguisone from *Aneurapinguis* (L.) Dum. Coll. Czech. *Chem. Commun.* 34: 582-592.

Bellonda. H. C. H. B. and Zucoloto, F. (2009). In: Panizzi, A. R.; Parra, J. R. Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: *Embrapa Informação tecnológica*. 11, p.425-464.

Bettiol, W. and Morandi, M. A. B. (2009). Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Ed. Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. Jaguariuna. Embrapa. 341p.

Borba R. da S., Busato, G., Foresti, J., Giolo, P. P., Garcia, M. S. and Grutzmacher, A. D. (2003). Avaliação de espécies ou linhagens de *Trichogramma* para o parasitismo de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, SORGO E FEIJÃO, 47.,m 2002, Porto Alegre, Anais...Porto Alegre: EMATER/RS, 2003.

Bogorni, P. C. and J. D. Vendramim (2005). Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, 34, 311-317.

Cansu TB, Yayli B, Ozdemir T, Batan N, Alpay Karaoglu S and Yayli N. (2013). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwagr.) growing in Turkey. *Turk J Chem.* 37: 213 – 219.

Carvalho, R.L.P. (1970). Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes cultivares de milho, em condições de campo. 170f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultur “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.

Casa, R.T., Reis, E.M. and Zambolim, L. (2006). Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. *Fitopatologia Brasileira*. 31:427-439.

Clarke L.J. and Robinson SA (2008). Cell wall-bound ultraviolet-screening compounds explain the high ultraviolet tolerance of the Antarctic moss, *Ceratodon purpureus*. *New Phytol.*, 179: 776-783.

CONAB. (2013). Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto 2013 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab.

Cruz, I. (1995). A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. *Embrapa-CNPMS Circular Técnica*, 21, 1- 45, Sete Lagoas.

Cruz, I. (1997). A identificação de pragas da cultura do milho. Sete Lagoas. Embrapa, CNPMS, 67p.

Cruz, I.; Turpin, F.T. (1982). Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, DF, v. 17, n. 3, p.355-359.

Cruz, I., M. L. C., Figueiredo and Matoso M. J. (1999). Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. *Embrapa-CNPMS, Circular Técnica*, 30, 1- 40, Sete Lagoas.



- Cruz, J. L., Pelacani, C. R. Coelho, E. F., Caldas, R. A. C., Almeida, A. Q. and Queiroz, J. R. (2006). Influencia da salinidade sobre o crescimento, absorção e distribuição de sódio, cloro e macronutrientes em plântulas de maracujazeiro-amarelo. *Bragantina, Campinas*. 65: 275-284.
- Dey A and De JN (2012). Antioxidative potential of bryophytes: Stress tolerance and commercial perspectives: A Rev. *Pharmacologia*, 3: 151-159
- Fatoba PO, Omojasola PF, Awe S and Ahmed FG (2003). Phytochemical Screening of Some Selected Tropical African Mosses. *NISEB Journal* 3: 49-52.
- Fatoba, P.O.; Ogunkunle C.O.; Okewole G.A. (2012). Mosses as Biomonitors of Heavy Metal Deposition in the Atmosphere. *International Journal of Environmental Sciences* v.1 n.2. 56-62
- Frahm, J. P. and Kirchhoff, K. (2002). Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against the slug *Arion lusitanicus*. *Cryptogamie, Bryologie*, v. 23, n. 3, p.271-275.
- Frahm J-P. (2004): A guide to bryological hotspots in Europe. 1. The Azores. – *Archive for Bryology* 3: 1–14.
- Goffinet, B., Buck, W. R. and A. J. Shaw (2008). Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In: *Bryophyte Biology*. 2. (Eds. Shaw, A.J. and Goffinet, B.). Cambridge: University Press Cambridge. cap.8, 71-126.
- Guo, Wen-Jie, Cui, Feng-Jie, Tao and Wen-Yi (2008). Bioassay-based screening of myxobacteria producing antitumor secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (7), pp. 842-847, 3
- Haines, W. P. and J. A. A. Renwick (2009). Bryophytes as food: comparative consumption and utilization of mosses by a generalist insect herbivore. Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, USA. *Entomol. exp. appl.*, 133, 296–306.
- Harrison, F. P. (1984). Observations on the infestation of corn by fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) with reference to plant maturity. *Florida Entomologist*, v.67, n.3, p. 333-335.
- Henández, C. R. and Vendramim, J. D. (1996) Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Manejo Integr. Plagas*: 14-22.



Hoy, C. W. and Shelton, A. M. (1987). Feeding response of *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to cabbage leaf age. *Environmental Entomology*, v. 16, p. 680-682.

INNECCO, R. (2006). de óleos essenciais como defensivo agrícola. In: *Congresso Brasileiro De Defensivos Agrícolas Naturais*, 3., 2006, Belém. Anais... Belém: Embrapa Amazônia Oriental: SEBRAE, 2006. p. 98-99.

Jocković N, Andrade PB, Valentão P. and Sabovljević M. (2008). HPLC–DAD of phenolics in bryophytes *Lumularia cruciata*, *Brachytheciastrum velutimum* and *Kindbergia praelonga*. *J. Serb. Chem. Soc.*, 73:1161–1167.

Labbe', C., Faini, F., Villagrñ, C., Coll, J. and D. S. Rycroft. (2005). Antifungal and Insect Antifeedant 2-Phenylethanol Esters from the Liverwort *Balantiopsis cancellata* from Chile. *J Agric Food Chem*, 53, 247-249.

Leão, M.G. (1996). *Fitoterápicos na família*. Mirassol D' Oeste: Pref. Municipal de Mirassol D'Oeste. 1996. 36p.

McCleary, J. A., Sypherd, P. S., and Walkington, D. L. (1960). Mosses as possible sources of antibiotics. *Science* 131: 108.

Markham, K., Chalk, T. and C. N. Stewart Jr. (2006). Evaluation of fern and moss protein-based defenses against phytophagous insects. *Int. J. Plant Sci.*, 167, 111–117.

Maia, W. J. M. S., Carvalho, C. F., Cruz, I., Souza, B. and T. J. A. F. Maia (2004). Influência da temperatura no desenvolvimento de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 28, 520-529.

Moraes E. N. R. (2006). Diversidade, Aspéctos florísticos e Ecológicos dos musgos (Bryophyta) da Estação Científica Ferreira Penna, Flona de Caxiuanã, Pará, Brasil. 2006 *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi Belém, 149p. 2006.

Moraes E. N. R. and Lisboa, R. C. L. (2006) .Musgos (Bryophyta) da Serra dos Carajás, estado do Pará, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais* 1(1): 39-68.

Nagashima, F.; Nondo, M.; Uematsu, T.; Nishiyama, A.; Sato, S.; Sato, M. and Asakawa, Y. (2002). Cytotoxic and apoptosis-inducing ent-kaurane-type diterpenoids from the Japanese liverwort *Jungermannia truncata* Nees. *Chem. Pharm. Bull.* v. 50, p.808-813.

Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A. and Lopes, J. R. S., (1995). Pragas do milho e seu controle. In: Osuna, J. A., Moro, J. R. (Ed). *Produção e melhoramento do milho Jaboticabal*: FUNEP, p. 81-87.

Pejin B, Vujisić L, Sabovljević M, Tešević V. and Vajs V (2012). Fatty acid chemistry of *Atrichum undulatum* and *Hypnum andoi*. *Hem. Ind.* 66: 207–209.

Pinheiro da Silva, M. F., Lisboa, C. L., and R. Vasconcelos Brazao (1989). Contribuição ao estudo de briófitas como fontes de antibióticos. *Acta Amaz*, 19, 139-145.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, and Vuorela P (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 3–12.

Richards, P. W. (1984). The Ecology of tropical forest bryophytes. In: *New Manual of Bryology* (Ed. R.M. Schuster). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 2, 1233-1270.

Roel, A.R. (2001). Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, v.1, n.2, p.43-50.

Sabovljević A., Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Vujicic M, Pejin B. and Sabovljevic M (2010). Comparison of extract bio-activities of *in situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4: 808-812.

Sabovljević A, Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Vujicic M, Pejin B. and Sabovljevic M (2011). Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 565-571.

Sabovljević A, Sabovljević M, Vujičić M, Skorić J. and Sabovljević M (2012). Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the pleurocarpous moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraaceae) in *in vitro* conditions. *Pak. J. Bot.*, 44: 339-344.

Sabovljevic M, Bijelovic A. and Grubisic D. (2001). Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lekovite Sirovine* 21: 17-29.

Sarmiento, R. de A, Aguiar, R. W. de S. Aguiar, R. de A. S. de S.; Vieira, S. M. J.; oliveira, H. G. de, and Holtz, A. M. (2002). Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. *Bioscience Journal, Uberlândia*, v. 18, n. 2, p. 41-48, dez..

Santos, R.C. and Lisboa, R.C.L.(2003). Contribuição ao Estudo dos Musgos (Bryophyta) no Nordeste Paraense, Zona Bragantina, Microrregião do Salgado e Município de Viseu, Pará. *Acta Amazonica*. 33 (3): 415-422.



Siegel, S. (1956). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 11, 13-19.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A.A., and P.R. Petrovick (2000). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC.

Souza, A. P (2004). *Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre Bemisia tabaci (genn., 1889) biótipo b*. Piracicaba. 116p. Tese (Doutorado – área de concentração em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Tavares-Martins, A.C.C., Lisboa, R. C. L. and Costa, D. P. (2014). Bryophyte flora in upland forests at different successional stages and in the various strata of host trees in northeastern Pará, Brazil. *Acta Bot. Bras.* Vol.28, n.1. 2014.

Valicente, F.H. and Cruz, I. (1991). Controle biológico da lagarta-docartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. *EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica*, n. 15). 23pp.

Valicente, F. H. and Fonseca, M. M. (2004). Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 21-29.

Vidal, C. A. S., Sousa, E. O., Rodrigues, F. G., Campos A. R., Lacerda, S. R. and J. G. M. Costa (2012). Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *octoblepharum albidum* hedw (Calymperaceae). *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64, 465-470.

Viegas-Junior, C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26, 390-400.

Wada, K. and K. Munakata (1971). Insect Feeding Inhibitors in Plants. Part III. Feeding Inhibitory Activity of Terpenoids in Plants. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 115-118.

Xie C. F and Lou HX (2009). Secondary Metabolites in Bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry & Biodiversity* 6: 303-311

Yano, O. (1989). Briófitas. In Fidalgo O, Bononi VLR (eds.). *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Série Documentos. Instituto de Botânica. São Paulo, p. 27-30.

Yano, O. (1992). Leucobryaceae (Bryopsida) do Brasil. 1992a. 318p. *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, São Paulo.



## CONCLUSÕES GERAIS

O estudo das espécies de musgos deste trabalho possibilitou um apanhado geral e preliminar sobre a fitoquímica de briófitas para Amazônia Brasileira, sendo o primeiro trabalho a relatar os constituintes químicos voláteis para *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. e *Leucobryum martianum*, e testar de forma aplicada as atividades fagodeterrente e inseticida destas espécies de briófitas no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, como também o segundo a reportar os constituintes químicos deste grupo para o Brasil.

A composição química volátil de *S. subsimplex* foi constituída predominantemente de aldeídos, terpenos, ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, hidrocarboneto aromático, ester, éter, cetona e álcool, totalizando 28 constituintes identificados.

A composição química volátil de *L. martianum* pertence ao grupo dos ácidos carboxílicos, compostos fenólicos, hidrocarbonetos aromáticos, terpenos, álcool, aldeído, cetona e eter, com 14 constituintes identificados.

As concentrações dos extratos etanólicos de *Sematophyllum subsimplex* e *Leucobryum martianum* na dieta natural de *Spodoptera frugiperda* impediram a alimentação e consequentemente o desenvolvimento e a ecdise das lagartas, o que levou à mortalidade, demonstrando a presença de compostos de defesa na constituição destas plantas, confirmando atividade inseticida e fagodeterrente sobre a lagarta *Spodoptera frugiperda* no 2º instar. Desta forma, novos estudos com novas concentrações devem ser feitos no sentido de viabilizar economicamente, bem como testar o extrato em plantas em vasos em casa de vegetação. Além disso, outros parâmetros podem ser analisados, como duração da fase larval e pupal, fecundidade e longevidade.

O uso de extratos vegetais é uma opção para o manejo integrado de pragas e que, associado a outras práticas, pode contribuir para a redução de doses e aplicações de inseticidas químicos sintéticos, que apresentam problemas aos organismos benéficos e ao meio ambiente. A perspectiva é apresentar um possível produto compatível com as necessidades da população e o nível de exigências do consumidor atual. Assim, o avanço nessa linha de conhecimento torna-se de fundamental importância para auxiliar no controle das pragas para os produtores agrícolas.

A falta de literatura que envolve a investigação fitoquímica com briófitas é uma grande lacuna na pesquisa para este grupo vegetal. Portanto, esta pesquisa dá subsídios para outras nesta mesma linha, pois não foi encontrado em literatura trabalhos que tenham avaliado a composição química volátil de *Sematophyllum subsimplex* (Hedw.) Mitt. e *Leucobryum martianum*.



**Guidelines for the publication of manuscripts in  
Revista Brasileira de Farmacognosia  
[www.sbfgnosia.org.br/revista](http://www.sbfgnosia.org.br/revista)**

The *Revista Brasileira de Farmacognosia* (*Brazilian Journal of Pharmacognosy*) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

**1. General rules**

**1.1** All submitted manuscripts must not have been published. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not recommended. The journal will accept contributions on the understanding that the author has obtained the necessary authority for publication. In the case of multiple authors, each author must inform the corresponding author that he/she consents to submission of the article to The *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

**1.2** The *Revista Brasileira de Farmacognosia* accepts for publication original scientific work, reviews and communication articles written only in English. The content of the text is entirely the responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor, Editorial Board or members of the Advisory Board.

**1.3** Manuscripts written by authors whose native language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Assistance of independent editing services can be found at <http://www.sbfgnosia.org.br/revista>. All services are paid for and arranged by the author, and the use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**1.4** The *Revista Brasileira de Farmacognosia* reserves the right to submit all received manuscripts to *ad hoc* referees, whose names will be kept confidential, and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may return manuscripts to the Editor-in-Chief or Section Editors for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations which are to be made to conform to the standards and editorial rules of the journal.

**1.5** All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong.

**1.6** All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material and the location of the voucher specimen.

**1.7** Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.

**1.8** Manuscripts dealing with essential oils that contain seasonal harvest and biological activity and which explore mechanisms of action or synergism are welcome.

**1.9** The journal will not accept responsibility for research works that do not comply with the legislation of the country of residence of the author.

**1.10** We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, *in-vitro* or *in-vivo* tests using animals.

**1.11** The following **immediate rejection criteria** apply:

- i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the journal;
- ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal (see Section 3);
- iii. the manuscript results are preliminary;
- iv. manuscripts reporting activity data without comparison with a reference, without a positive control/appropriate control or not based on adequate statistics;
- v. the biological source (*e.g.* plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated and documented;



- vi. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds;
- vii. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ ) for antimicrobial activity ( $\geq 250 \mu\text{g/mL}$  for plant extracts and  $\geq 50 \mu\text{g/mL}$  for pure compounds) and without appropriate identification of culture collections/strain designation codes;
- viii. experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without appropriate statistical analyses; without oil yield (%) and characterization and component quantification not undertaken using GC-MS-FID and analyses of the retention indices of the components not calculated using *n*-alkane homologous series together with analyses of some of the isolated natural components. Biological activity results without chemical characterization of the compounds.
- ix. too preliminary data using *in-vitro* assays will not be acceptable if (i) no information on the type of activity is given; (ii) single dose or very high concentrations (must show dose-response studies); (iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); (iv) lack of appropriate controls (solvents; positive or negative substances according to the study); (v) no  $\text{IC}_{50}$  values (if applicable).
- x. manuscripts with repetition of a single bioassay for yet another extract or plant;
- xi. use of only the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to access the toxicity of extracts;
- xii. isolation and bioassay of well-known compounds with small or no relationship to the activity, or to the medicinal use of the plant without clear justification;
- xiii. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Standardization of the plant extracts is considered to be the complete description of manufacturing parameters such as granulometry, solvent-plant ratio, time of extraction, solvent composition etc., together with marker quantification or chromatographic fingerprint analyses.

## 2. Rules for the elaboration of contributions

**2.1** The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript in the event of loss or damage to the original sent to the journal.

**2.2** Figures (photographs, charts, drawings, etc.) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numerals. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations and located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript.

*If figures are from another font, formal authorization is required.*

**2.3** Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Tables (numerical data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables should be placed (preferentially just after their citation in the body of the manuscript).

**2.4** The captions of botanical illustrations (abbreviations of anatomical descriptions) should be in accordance with the rules adopted by the journal. Please request standards by email to [revista@sbfgnosia.org.br](mailto:revista@sbfgnosia.org.br).

## 3. Text formatting and contents of the work

**3.1 Original papers:** Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figures with Legends, Tables and Structural Formulae. Results and Discussion sections may appear as a combined 'Results and Discussion' section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted in exceptional and well-justified cases. If submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement in the covering letter, giving compelling reasons for the length of the paper.

**3.2 Short communications:** This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with



brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words.

**3.3 Reviews** will, in general, be invited by the Editor-in-Chief and only those with more than 100 references will be considered. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be concise and not include experimental details.

**3.4** In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample covering letter are available at [www.sbfagnosia.org.br/revista](http://www.sbfagnosia.org.br/revista). Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.

**3.5** The originals should be on A4-sized paper, double-spaced using Times New Roman size-12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

**3.6 Title and subtitle:** They should be in lower case, using Times New Roman size-14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the journal.

**3.7 Authors:** The authors' names should appear centred underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (e.g. Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.

**3.8 Author affiliations:** After each author name there should be superscript Arabic numerals indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address, telephone number and fax number of the main author should appear after the References. The journal will not publish commercial e-mail addresses.

**3.9 Abstract:** A brief and concise abstract of  $\leq 200$  words highlighting the most important information (including the methodology, results and conclusions) that allows readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding reading of the entire work.

**3.10 Keywords:** Very important for database searches, thus validating the article. The authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.

**3.11 Introduction:** The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published and where they are available.

**3.12 Materials and methods:** The description of the Material and the Methods used should be brief and sufficiently clear for comprehension and reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://www.tropicos.org>, <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/> or <http://www.theplantlist.org/> or.

**3.13 Results:** The Results should be presented with minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by suitable tables and figures. The data, if pertinent, should be subjected to statistical analyses.

**3.14 Discussion:** The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based upon them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion can be presented as one section.

**3.15 Acknowledgements:** This is an optional item. Please acknowledge anyone who made a substantial contribution towards the article.

**3.16 Author contributions:** The role of each author involved in the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, and he/she should be referred to by his/her initials. Please see the template for examples available at [www.sbfagnosia.org.br/revista](http://www.sbfagnosia.org.br/revista).

#### 4. References

The formatting of the references should be standardised to conform to the requirements of the journal as outlined. *Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide.* Endnote® users, please see the template section available at [www.sbfagnosia.org.br/revista](http://www.sbfagnosia.org.br/revista) to obtain the Endnote® style for RBFAR.

**4.1** References within the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. e.g. (Silva, 1999) or (Silva & Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, e.g. (Silva, 1999, p. 24).

**4.2** The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

**4.2.1** Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform *Chemical Abstracts Service Source Index* (<http://www.cas.org/sent.html> or <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>).

In the case of an authorised abbreviation of a certain periodical that cannot be located and is not obvious, the title should be cited complete (e.g.):

Kumar D, Bhujbal SS, Deoda RS, Mudgade SC 2010. *In-vitro* and *in-vivo* antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. *J Sci Res* 2: 196-202.

In case the cited journal is not readily accessible, the *Chemical Abstract Number* can be quoted, as follows:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

In a citation, the sources should be shown in italics: Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.

#### 4.2.2 Book:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

#### 4.2.3 Book chapter:

El Sohly MA, Stanford DS, Murphy TP 2007. Compounds properties and drug quality. In El Sohly MA (org.) *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

#### 4.2.4 Thesis or dissertation materials:

Singab ANBI 1996. *Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants*. Tokyo, 173p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy.  
Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da*

*escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

#### 4.2.5 Scientific meetings:

Oliveira RMMW, Lolli LF, Santos CAM 2006. Possible involvement of GABAA-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *19th ECNP Congress*. Paris, France.

**4.2.6** Patents: Should be identified as indicated below; whenever possible the *Chemical Abstracts Service* number should be informed.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP* 61,118,396, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

#### 4.2.7 Internet pages:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*. <http://www.raintree.com/plantdrugs.htm>, access in October 2009.

### 5. Abbreviations

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11<sup>th</sup> General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m (meter; cm (centimeter); mm (millimeter);  $\mu$ m (micrometer); nm (nanometer); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram);  $\mu$ g (microgram); ng (nanogram); mL milliliter;  $\mu$ L (microliter); s (second); min (minute); h (hour); N (normal); M molar; mM (millimolar);  $\mu$ M (micromolar); SD (standard deviation); SE (standard error); X (mean); Ci (Curie); mp (melting point); bp (boiling point); TLC (thin-layer chromatography); GC (gas chromatography); NMR (nuclear magnetic resonance); MS (mass spectrometry); UV (ultraviolet); CD (circular dichroism); IR (infrared); g instead of rpm; ppm (parts per million); cpm (counts per minute); dpm (disintegrations per minute); Hz (Hertz); LD50 (median lethal dose); LC50 (median lethal concentration); TLV (threshold limit value). When using a word that is asserted to be a proprietary term or trademark, authors must use the symbol ®.

### 6. Illustrations

**6. 1** The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be



modified or enhanced by the production staff of the journal. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

**6.2** Remove all colour from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in colour (see Costs section for details).

**6.3** Chemical structures are not considered as figures, should be numbered sequentially in bold letters according to their citations in the manuscript, and placed closed to the desired point in the manuscript body. Structures should be drawn according to the style set by the American Chemical Society. Preferences for the drawing of structures can be found as a pre-set style in appropriate software packages.

**6.4** Upload each figure in .tiff, .jpg or .eps format. The figure number and the top of the figure should be indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that will be clearly legible upon reduction and which is consistent within each figure and set of figures. If a key to symbols is required, please include this in the figure legend.

## **7. Submission of manuscripts**

**7.1** Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

**7.2** Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbfar-scielo>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by e-mail will not be accepted.

**7.3 Important:** All authors, with their respective e-mail addresses, should be entered into the system.

**7.4** The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board.

## **8. Costs**

**8.1.** The journal will cover the costs of publication of manuscripts that are  $\leq 15$  pages (including tables and figures). The journal uses recycled paper, so colour pictures are accepted and will be available only online unless the author(s) agree to cover the extra expenses for the print publication irrespective of the number of pages of the article.

**8.2.** Authors may be requested to provide voluntary financial support after acceptance.

## **9. Proofs and reprints**

**9.1.** Galley proofs will be sent to all authors as a PDF file. Rephrasing of sentences or additions is not permitted at the page-proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 5 days of receipt to ensure timely publication of the manuscript.

**9.2** Before publication, the articles will be available ahead of print on the Scielo Portal.

For further information, please contact:

**Revista Brasileira de Farmacognosia**  
Professor Cid Aimbiré M. Santos, Editor  
Laboratório de Farmacognosia,  
Departamento de Farmácia - UFPR  
Rua Prof. Lothário Meissner, 632 - Jd Botânico  
80210-170, Curitiba-PR, Brasil  
[revista@sbfenosia.org.br](mailto:revista@sbfenosia.org.br)

September 2012.

## ARCHIVES OF BIOLOGICAL SCIENCES, BELGRADE

### Instructions for Contributors

1. Articles should be original contributions in the field of biological sciences written in English. Papers describing new techniques and methods may be accepted if they contribute to the solution of biological problems. Review articles, critical reviews of scientific books and monographs, and notes for rapid publication will be accepted as well.

2. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that is not under consideration for publication elsewhere, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3. Manuscripts should be printed double-spaced in a unicode Times New Roman font with size 12 points, wide margins, and as concise as possible. Footnotes should be avoided. A short title of not more than 30 letters should be supplied.

4. The typescript should contain the following features: Title, followed by the author's name and full address; Abstract, which should not exceed 150 words; Key Words; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgments; and References. Exceptionally, Results and Discussion could make one section. References should be given alphabetically in the following manner:

Adamovic, L (1898). *Flora jugoistočne Srbije*. Jugoslavenska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, 1-200.

Бабкин, П.С. (1985). К вопросу о восстановлении рефлекторной деятельности в постнатальном онтогенезе человека. *Физиологический Журнал СССР*, 44, 922-927, Москва.

Lowry, O.H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L., and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 165-175.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, page reference, publisher's name, and place of publication should be given, e.g.,

MacIntyre, R. J. (1982). Regulatory genes and adaptation: Past, present, and future, In: *Evolutionary Biology*, 15 (Eds. M. K. Hecht, B. Wallace, and T. G. Prauce), 247-285. Plenum Press, New York.

In the text, references should be given as: Doane (1969) or (Doane, 1969). When a citation includes more than two authors, e.g., Doane, Abraham, and Kolar, the paper should be cited in the text as Doane et al. (1975). If papers by the same author(s) in the same year are cited, they should be distinguished by the letters a, b, c, etc. References to a paper "In press" must mean that it has been accepted for publication.

5. Illustrations should accompany the manuscript, but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text. Glossy photographs of positive prints should be sent unmounted and should be restricted to minimum. Charts, graphs, or diagrams should be drawn in black ink on good quality white paper. Lettering to appear on the illustrations should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable



reduction. Illustrations should not be larger than A-4 format. The author's name should be given on the back of each illustration. The figure number (in Arabic numerals) should be indicated on the top of the illustration, where this is not clear. Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

6. Tables should be numbered in Arabic numerals, typed on separate sheets, and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text.

7. Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

8. Key words: Not more than 7-10.

9. The Latin names of species and genera used in the investigation should be italicized.

10. Corrections of proofs should be restricted to printer's only.

11. Offprints: Twenty offprints will be supplied free to the author.

12. The official abbreviation of the journal is *Arch. Biol. Sci. Belgrade*.

13. Notes. The Journal also publishes short reports of studies of high quality which are complete in themselves and of length which does not satisfy their publication as a full-length paper. The maximum length is five-double-spaced printed pages including references. One table or figure may be given on a separate sheet.

A copy on computer disk should be supplied. Please provide files on CD for PC. The word processing format should be MS Word RTF. The disc should carry the text (including key words), references, figure, legends, and table headings. Diagrams, photographs, figures and maps should be supplied as pictures in TIFF format, and the file resolution should be not less than 240 ppc/300 ppi at 170 mm wide, preferably at 300 dpi.

The manuscripts should be sent to: Prof. Dr. Božidar Ćurčić, Institute of Zoology, Faculty of Biology, Studentski Trg 3, 11000 Belgrade, Serbia (E-mail: bcurcic@bio.bg.ac.rs); tel/fax +381 11 263 8500 and +381 11 328 1789.