



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

RITA DE CÁSSIA PEREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. E
Calymperes lonchophyllum Schwägr. (Bryophyta) NO CONTROLE DA LAGARTA-
DO-CARTUCHO DO MILHO *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (Lepidoptera)

BELÉM
2014



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

RITA DE CÁSSIA PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. E
Calymperes lonchophyllum Schwägr. (Bryophyta) NO CONTROLE DA LAGARTA-
DO-CARTUCHO DO MILHO *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (Lepidoptera)**

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: Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa.

**BELÉM
2014**



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

RTA DE CÁSSIA PEREIRA DOS SANTOS

AValiação fitoquímica de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera) / Rita de Cássia Pereira dos Santos. - Belém, 2014.

Santos, Rita de Cássia Pereira dos

Avaliação fitoquímica de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera) / Rita de Cássia Pereira dos Santos. - Belém, 2014.

104 f.

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

Área de concentração Agroecossistemas da Amazônia.

1. *Campylopus surinamensis* – análise química. 2. *Calymperes lonchophyllum* – análise química. 3. *Spodoptera frugiperda* – controle. 4. Inseticida. I. Título.



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

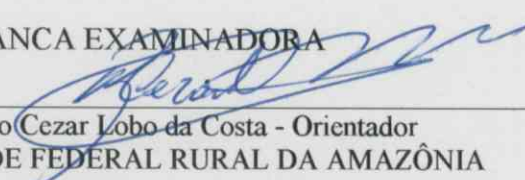
RITA DE CÁSSIA PEREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. E *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) NO CONTROLE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (Lepidoptera)

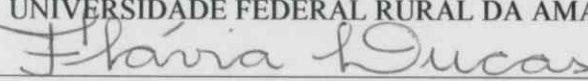
Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias: área de concentração Agroecossistemas da Amazônia, para obtenção do título de Doutor.

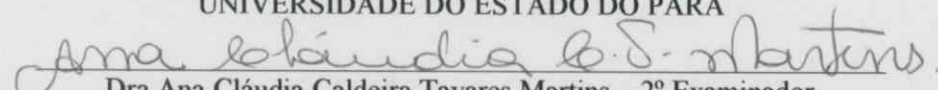
Aprovado em 12/02/ 2014.

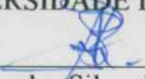
BANCA EXAMINADORA

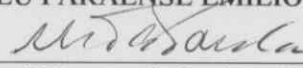

Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

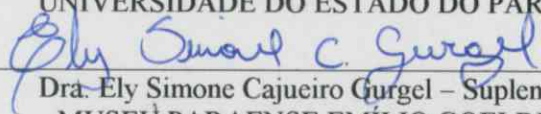
Dr. Wilson José Mello e Silva Maia - Co-orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

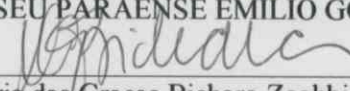

Dra Flávia Cristina Araújo Lucas – 1º Examinador
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ


Dra Ana Cláudia Caldeira Tavares Martins – 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 DO ESTADO DO PARÁ


Dra. Ely Simone Cajueiro Gurgel – Suplente
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI


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

*“Porque em tudo Deus lhe mostra uma solução!
Na verdade a minha prova tinha um gosto amargo,
mas minha vitória hoje tem sabor de mel”*

Damares – “Sabor de mel”

Dedico,
Ao Senhor JESUS, toda honra e toda glória!
Aos meus pais Virgílio Pereira dos Santos (*in. memore.*) e Maria de Lourdes dos Santos que
são exemplos para a minha vida;
A minha irmã “Dasdôres”, que sempre
compartilhou dos meus sonhos e desalentos,
vitórias e momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida, força, coragem e fé, para continuar mesmo quando tudo parecia naufragar. Hoje chego ao fim desta etapa de minha caminhada e quero agradecer-te do fundo da minha alma;

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

À Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação;

Ao coordenador do curso de doutorado, Dr. Francisco de Assis Oliveira, pelo apoio para conclusão deste curso, e às secretárias, Shyrle e Shyrlei pela amizade e disponibilidade em seus atendimentos;

Ao Prof. Dr. Roberto Cesar Lobo e o Prof. Dr. Wilson Maia pelas orientações e pelo conhecimento passado; e aos seus orientados Thiago, Alam e Nágila pela ajuda e momentos de descontração no LABIN/ICA/UFRA;

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) na pessoa da Dra. Anna Luiza Ilkiu-Borges, Coordenadora do Departamento de Botânica e do Lab. de Briologia, a qual estava disposta a ajudar sempre que necessário, disponibilizando-me o referido Lab., local onde trabalhei durante todo o período da Tese e pude fazer a identificação e triagem das espécies de briófitas estudadas;

À Universidade Federal do Pará na pessoa da Dra Eloísa Andrade, Coordenadora do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), pelas análises fitoquímicas e contribuição no primeiro artigo desta Tese. E à Técnica Rafaela deste mesmo laboratório, pela solicitude e auxílio na preparação das amostras dos aromas e leitura cromatográfica.

Ao Dr. Alberto Cardoso Arruda e a Dra Mara Arruda, coordenadores do Laboratório da Central de Extração Química da Universidade Federal do Pará (UFPA) e sua equipe, pelo auxílio na preparação dos extratos. Em especial aos doutorandos Manolo e Gesiel pessoas incríveis e que foram fundamentais tanto na extração quanto na preparação das concentrações testadas.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições feitas para este trabalho.

Às Dra. Manuela Fernandes da Silva e Maria das Graças Zoghbi, por se disponibilizarem como orientadoras no início do curso, mesmo não podendo dar continuidade com suas orientações no decorrer do doutorado;

À Dra. Regina Lobato Lisboa, minha eterna orientadora, que me iniciou na vida científica, orientando-me da melhor forma possível;

Aos professores deste curso pelos conhecimentos repassados;

À minha inseparável amiga e irmã de alma, Eryka Guimarães, que além de companheira de pesquisa, também tenho o seu apoio incondicional e a sua parceria eterna; Ao seu esposo e meu amigo, M.Sc. Luiz Guimarães, pela amizade e incentivo; E a seus familiares pelo apoio e acolhimento.

À Dra. Ana Cláudia, pela contribuição sem igual desde o início deste projeto e pela correção do manuscrito do trabalho; Ao seu esposo e meu compadre M.Sc. Alcindo, pela amizade, motivação, apoio e carinho; E a sua família pelos prazerosos dias de acolhida em sua casa.

Às briólogas, amigas e companheiras de trabalho do Laboratório de Briologia-MPEG, Ana claudinha, Ana Paula, Eline, Eliete e Luciana pela agradável companhia e momentos de descontração;

Aos alunos do curso de mestrado do MPEG/UFRA (Turma 2011) pelo agradável convívio e préstimos;

Ao "Alê" pelo incentivo, apoio e amizade;

Ao bolsista de PIBIC, Giovani, aluno da Dra. Ana Claudia, que esteve pronto a regar as mudas de milho diariamente;

Ao "Doquinha" funcionário desta instituição de ensino, pela colaboração e solicitude na condução do experimento sempre que necessário;

Ao prof. Walter Velasco, um ser-humano extraordinário, que se deslocou de Belém até Abaitetuba, para nos ceder o abudo do seu projeto, o qual foi usado no cultivo do milho, e sempre esteve disposto a colaborar conosco;

Aos colegas de Doutorado pelo companheirismo e incentivo durante o curso;

A minha mãezinha, onde eu sempre encontro "colo", alento e muito amor; e a minha enorme família por toda a atenção, incentivo e apoio sempre que precisei.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, são dignos da minha profunda gratidão, e sem os quais a conclusão desta Tese seria impossível.

SUMÁRIO

	p.
RESUMO GERAL	12
ABSTRACT GENERAL	13
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.1. IMPORTÂNCIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VALIDA MÉTODOS DAS BRIÓFITAS.....	14
1.2. ATIVIDADE INSETICIDA E/OU FAGODETERRENTE (<i>ANTIFEEDANT</i>) DAS BRIÓFITAS.....	17
1.3. A LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO, A IMPORTÂNCIA DO USO DE PLANTAS COMO INSETICIDA NATURAL E A INDICAÇÃO DE BRIÓFITAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL DE <i>Campylopus surinamensis</i> Müll. Hal. E <i>Calymperes lonchophyllum</i> Schwägr. (Bryophyta) OCORRENTES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA	32
RESUMO	32
ABSTRACT	33
2.1. INTRODUÇÃO	34
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.2.1. ÁREA DE ESTUDO E SELEÇÃO DAS ESPÉCIES DE BRIÓFITAS.....	35
2.2.2. COLETA, IDENTIFICAÇÃO E TRIAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO.....	36
2.2.3. OBTENÇÃO DO CONCENTRADO VOLÁTIL.....	37
2.2.4. ANÁLISE DO CONCENTRADO VOLÁTIL POR CG-EM	37
2.2.5 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	38
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	44
3. ATIVIDADE INSETICIDA E FAGODETERRENTE DE <i>Campylopus surinamensis</i> Müll. Hal. (Bryophyta) SOBRE LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
3.1. INTRODUÇÃO	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.2.1 SELEÇÃO, COLETA E TRIAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO.....	54
3.2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	55

3.2.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES.....	56
3.2.4 CRIAÇÃO DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	56
3.2.5 EXPERIMENTO: TESTE POR INGESTÃO SEM CHANCE DE ESCOLHA....	57
3.2.5.1 Delineamento experimental.....	58
3.2.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	58
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.3.1 FAGODETERRÊNCIA.....	59
3.3.1.1 Após 24 horas.....	59
3.3.1.2 Após 48 horas.....	61
3.3.1.3 Após 72 horas.....	62
3.3.2 MORTALIDADE	65
3.3.2.1 Após 24 horas.....	65
3.3.2.2 Após 48 horas.....	65
3.3.2.3 Após 72 horas.....	66
REFERÊNCIAS	69
4 ATIVIDADE INSETICIDA E FAGODETERRENTE DE <i>Calymperes lonchophyllum</i> SCHWÄGR. (BRYOPHYTA) SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. SMITH (Lepidoptera: Noctuidae)	74
RESUMO.....	74
ABSTRACT	75
4.1. INTRODUÇÃO.....	76
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.2.1 SELEÇÃO, COLETA E TRIAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO.....	77
4.2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	78
4.2.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES	78
4.2.4 CRIAÇÃO DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	79
4.2.5 EXPERIMENTO: TESTE POR INGESTÃO SEM CHANCE DE ESCOLHA....	79
4.2.5.1 Delineamento experimental	80
4.2.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	81
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.3.1 FAGODETERRÊNCIA.....	81
4.3.1.1 Após 24 horas.....	81
4.3.1.2 Após 48 horas.....	83
4.3.1.3 Após 72 horas.....	84
4.3.2. MORTALIDADE	87

4.3.2.1 Após 24 horas.....	87
4.3.1.2 Após 48 horas.....	87
3.3.2.3 Após 72 horas.....	88
4.5. REFERÊNCIAS	92
CONCLUSÕES GERAIS	97
ANEXOS.....	98

RESUMO GERAL

A flora briofítica é abundante no mundo inteiro e está presente em praticamente todos os ecossistemas da Terra. Um foco importante em estudos de briófitas é o conhecimento da composição química de extratos e dos óleos essenciais ou concentrados voláteis. Estas plantas são importantes fontes naturais de terpenos, ésteres, acetogeninas, compostos aromáticos, alcalóides, compostos fenólicos (flavonóides), taninos, saponinas, ácidos graxos, glicosídeos cardíacos, e outros. Muitos destes constituintes químicos possuem aromas e um intenso sabor amargo ou pungente, o que evidencia a utilização das briófitas no controle de insetos, garantindo-lhes uma relevante importância como plantas inseticidas ou fagodeterrentes. A carência de literatura sobre a investigação fitoquímica de espécies de briófitas é uma grande lacuna na pesquisa para este grupo vegetal. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos voláteis das espécies de musgos *Campylopus surinamensis* (Dicranaceae) e *Calymperes lonchophyllum* (Calymperaceae) ocorrentes na Amazônia Brasileira e avaliar o efeito do seu extrato etanólico no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* de 3º instar, em condições controladas. As amostras foram coletadas em um fragmento de Floresta Amazônica no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Bárbara, Pará, sobre substratos terrestre e corticícola. Os extratos pentânicos obtidos por destilação-extração simultânea (DES) foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-EM). Os extratos etanólicos obtidos por maceração a frio com etanol PA foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), para a realização dos testes de mortalidade e fagodeterência sobre as lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*. Foram aplicados cinco tratamentos (2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/µl e controle com DMSO diluído em água). Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, para fagodeterência, com suas médias comparadas pelo teste U de Mann-Whitney e para mortalidade foi aplicado o teste de Fischer com modificação de Tocher. Foram identificados 34 constituintes químicos, pertencentes ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos, terpenos, fenilpropanóides, ésteres e ácidos graxos. Naftaleno foi o hidrocarboneto aromático predominante em *C. lonchophyllum* e *C. surinamensis* (71,8% e 45,71%, respectivamente). Este constitui o primeiro relato da composição química volátil dessas espécies, e os resultados sugerem que estes musgos são importantes fontes naturais de terpenos, ácidos graxos e ésteres. Quanto às atividades de fagodeterência/antifeedant e mortalidade, para *Campylopus surinamensis* foi observada a ação fagodeterrente de extratos nas concentrações de 2,00 µg/µl; 1,00 µg/µl e 0,50 µg/µl depois de 24 horas de contato e não houve efeito inseticida. Para *Calymperes lonchophyllum* somente após 48 horas de contato das lagartas com os tratamentos 1, 2 e 3 foi observada uma ação fagodeterrente. Para se produzir efeito inseticida em lagartas de 3º instar foram necessárias 72 horas de exposição de extrato nas concentrações de 2,00 e 1,00 µg/µl. Estas espécies de musgos podem ser de grande importância e interesse para o controle de *Spodoptera frugiperda* em plantações de milho. Não há na literatura especializada a existência de outros trabalhos que tenham avaliado a ação inseticida e/ou fagodeterrente destes musgos, sendo esta, a primeira pesquisa científica a testar essa atividade biológica. Estes resultados são passíveis de patente, resguardando assim, o direito de autoria.

Palavras-chave: Calymperaceae, Dicranaceae, Constituintes voláteis, Plantas inseticidas, Praga do milho, Fagodeterência.

ABSTRACT GENERAL

The bryoflora is abundant worldwide and is present in virtually all Earth's ecosystems. An important focus on bryophyte studies is the knowledge of the chemical composition of extracts and essential oils or concentrate volatiles. These plants are important sources of natural terpenes, esters, acetogenins, aromatic compounds, alkaloids, phenolic compounds (flavonoids), tannins, saponins, fatty acids, cardiac glycosides, and others. Many of these chemical constituents possess aromas and an intense bitter or pungent flavor, which highlights the use of bryophytes in insect control, guaranteeing them a great importance as insecticide or antifeedant plants. The lack of literature on the phytochemical investigation of bryophytes species is a big gap in the research for this plant group. Therefore, this study aimed to analyze the volatile chemical constituents of the mosses species *Campylopus surinamensis* (Dicranaceae) and *Calymperes lonchophyllum* (Calymperaceae) occurring in the Brazilian Amazon and evaluate the effect of its ethanol extract in the control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in 3rd instar, in controlled conditions. The samples were collected in a fragment of the Amazon forest in Parque Ecológico de Gunma, municipality of Santa Bárbara, Pará State, on terrestrial and corticicolous substrates. The pentanic extracts obtained by simultaneous distillation-extraction (SDE) were analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS). The ethanol extracts obtained by cold maceration with PA ethanol were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO), to achieve the mortality and antifeedant tests in the caterpillar of *S. frugiperda* in the 3rd instar. Five treatments were applied (2.0, 1.0, 0.5 and 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and control with DMSO diluted in water). The experimental data were submitted to analysis of variance, for antifeedant activity, with its means compared using the Mann-Whitney U test and for mortality was applied the Fischer's test with Tocher's modification. 34 chemical constituents were identified, belonging to the group of aromatic hydrocarbons, aldehydes, terpenes, phenylpropanoids, esters and fatty acids. Naphthalene was the predominant aromatic hydrocarbon in *C. lonchophyllum* and *C. surinamensis* (71.8 and 45.71%, respectively). This is the first report of the volatile chemical composition of these species, and the results suggest that these mosses are important sources of natural terpenes, fatty acids and esters. As for antifeedant activity and mortality, for *Campylopus surinamensis* was observed antifeedant action of extracts at concentrations of 2.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ after 24 hours of contact and no insecticidal effect. For *Calymperes lonchophyllum* only after 48 hours of contact of the caterpillars with treatments 1, 2 and 3, was observed an antifeedant activity. To produce insecticidal effect on caterpillars of 3rd instar were required 72 hours of extract exposure at concentrations of 2.00 and 1.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. These species of mosses can be of great importance and interest for the control of *S. frugiperda* in corn fields. There are not other studies in the specialized literature assessing the insecticide and/or antifeedant effect of these mosses, which is the first scientific research to test this biological activity. These results are subject to patent, thus protecting the right of authorship.

Keywords: Calymperaceae, Dicranaceae, volatile constituents, insecticide plants, pest of corn, antifeedant effect.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E VÁLIDOS MÉTODOS DAS BRIÓFITAS.

As briófitas (antóceros, hepáticas e musgos), estão representadas pelos filos Anthocerotophyta (STOTLER e CRANDALL-STOTLER, 2005), Marchantiophyta (CRANDALL-STOTLER e STOTLER, 2000) e Bryophyta (GOFFINET e BUCK, 2004), respectivamente. São plantas criptógamas, atraqueófitas, de estrutura simples apresentando pequeno porte (a maioria até 10 cm), possuem ampla distribuição geográfica, estão presentes em praticamente todos os ecossistemas da Terra e contribuem significativamente para a diversidade vegetal (LEMOS-MICHEL, 2001; LISBOA, 1993). São capazes de tolerar condições ambientais extremas, ocorrendo desde o ártico às áreas tropicais, como a Amazônia, desde o deserto até ambientes submersos, exceto em ambientes marinhos (COSTA et al., 2010; FRAHM, 2003).

Habitam os mais variados substratos, como troncos e ramos vivos (corticícola) ou em decomposição (epíxila), sobre folhas (epífila), superfícies de rochas (rupícola), solos (terrícola) e substrato artificial - concreto ou argamassa (casmófito) (FUDALI, 2001), demonstrando preferência por locais úmidos, já que necessitam de água para realizar a fecundação (DELGADILLO e CÁRDENAS, 1990; SCHOFIELD, 1985).

Diversos estudos têm mostrado que as briófitas apresentam grande importância na composição da biomassa de muitos ecossistemas, contribuindo para controlar o assoreamento dos rios e da erosão do solo (GLIME, J. M. e SAXENA, 1991) e ajudando na germinação das sementes e estabelecimento das comunidades vegetais (WELCH, 1948). Também determinam as condições de pH, presença de cálcio ou nutrientes na água, além de atuar como bioindicadoras e/ou biomonitoras em estudos de poluição ambiental (FATOBA et al., 2012; FOAN e SIMON, 2012; LISBOA e ILKIU-BORGES, 1995; CAMPOS, 1999). Podem ainda, indicar a presença de certos minérios no meio ambiente, uma vez que concentram facilmente o cobre e o enxofre (LISBOA e ILKIU-BORGES, 1996; FATOBA et al., 2012; BURTON e PETERSON, 1979).

As briófitas têm sua importância econômica na decoração e jardinagem, como meio de cultura para orquídeas, como aditivos no solo e como combustível (turfa) (GLIME, 2007; 2013; ANDO e MATSUO, 1984; DING, 1982; WU, 1982). Na fabricação de uísque escocês, por exemplo, são usadas para garantir-lhe o sabor característico (MOLOZZI et al., 2003).

Com relação às suas propriedades fitoquímicas, apenas 5% (Asakawa, 2001) de um total de aproximadamente 18.000 (SHAW e GOFFINET, 2000) espécies de briófitas mundialmente conhecidas, têm sido estudadas.

Desde o início da década de 1970, o professor e pesquisador Asakawa e seu grupo, têm focado seus estudos sobre os constituintes químicos de briófitas no Japão. Eles descobriram que estas plantas contêm grandes quantidades de metabolitos secundários bastante representativos, sendo o grupo das hepáticas o mais estudado, com destaque para o gênero *Plagiochila* (Dumort) Dumort (ASAKAWA, 1982; 1990a; 1990b; 1993; 1995; 1999; 2001; 2007; ASAKAWA et al., 1980; 1988; 2013; LUDWICZUK et al., 2008, entre outros).

Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários, os quais apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e são encontrados em concentrações relativamente baixas em determinados grupos de plantas. Frequentemente, têm funções importantes na proteção das plantas contra os raios UV, ataques de insetos, fungos, vírus e bactérias, entre outras (PERES, 2004; SIMÕES et al., 2007)

Na composição química de diversas espécies de briófitas já foram encontrados Terpenóides, Ésteres, Acetogeninas, Compostos aromáticos, Alcalóides, Compostos fenólicos (Flavonóides), Taninos, Saponinas, Ácidos graxos, Glicosídeos cardíacos e uma grande diversidade de estruturas químicas (ADEDEJI et al., 2012; ASAKAWA, 1982; 1990a; 1990b; 1993; 1995; 1999; 2001; 2007; ASAKAWA et al., 1980; 2013; CANSU et al. 2013; DING, 1982; FATOBA et al. 2003; JOCKOVIC, et al, 2007; LUDWICZUK et al., 2008; MORANTES, et al., 2007; PEJIN, et al., 2012; SUIRE, 1972; ÜCÜNCÜ et al., 2010; XIE e LOU, 2009; WU 1982). Muitos destes componentes têm aromas e intenso sabor amargo ou pungente, além de exibir atividades biológicas e propriedades medicinais (ALAM, 2012; ASAKAWA, 2007).

Novos compostos de briófitas têm sido descritos para as hepáticas, que apresentam grandes quantidades de terpenos e substâncias semelhantes aos terpenos (ASAKAWA, 1995), devido à presença de oleocorpos existentes em suas células (GRADSTEIN e COSTA, 2003). Curiosamente, alguns sesquiterpenos isolados a partir de hepáticas são enantiômeros semelhantes aos encontrados em plantas superiores. E alguns terpenóides esqueletos só ocorrem em briófitas, como pinguisanes, isolado pela primeira vez de *Aneura pinguis* (L.) Dumort. e miltailanos, isolados de *Bazzania* Gray, *Myliia* Gray e *Reboulia* Raddi (ASAKAWA et al., 1980; KINGHORN et al., 2013;

WADA e MUNAKATA, 1971) estando presente também em diversas outras espécies de hepáticas (ASAKAWA, 1995; ASAKAWA et al., 1980). Os terpenos mais frequentes em hepáticas são β -bazanene, β -barbatene, α -pineno, β -pireno e limoneno (ASAKAWA, 1995; HEINRICHS, 2001), sendo que, estes dois últimos ocorrem em *Plagiochila rutilans* Lindenb. (HEINRICHS 2001).

Os musgos e os antóceros são quimicamente menos estudados uma vez que não possuem oleocorpos em suas células (ASAKAWA, 1995; ASAKAWA et al., 2013; HEROUT, 1990). Porém, já foram encontrados novos compostos para os musgos, a exemplo de dois flavonóides (apigenina-7-O-triglycoside e luteolina-7-O-neohesperidosido) presentes em *Dicranum scoparium* Hedw. (Dicranaceae) com efeito fitotóxico, ou seja, atividade alelopática, impedindo o crescimento de outro musgo (*Tortula muralis* HEDW) e da Magnoliophyta *Raphanus sativus* L. (BASILE et al., 2003).

Fatoba et al. (2003) analisaram seis espécies de musgos (*Bryum coronatum* Schwägr, *Thuidium gratum* (P. Beauv.) A. Jaeger, *Calymperes afzelii* Sw., *Barbula lambarenensis* P. de la Varde, *Hyophila involuta* (Hook.) A. Jaeger e *Octoblepharum albidum* Hedw.), que indicaram além de compostos fenólicos, a presença de alcalóides, taninos, saponinas e glicosídeos cardíacos. No entanto, os musgos também possuem em sua composição química terpenóides, inclusive sesquiterpenos, embora este grupo não contenha oleocorpos (CANSU et al., 2013; ÜCÜNCÜ et al., 2010). Estes referidos autores ainda detectaram ácidos graxos (maior ocorrência nos musgos) do tipo aldeídos em *Tortula muralis* Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. *Hylocomium splendens* (Schimp) Hedw. e *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr.

Para os antóceros, Asakawa (1995) relata que já foram encontrados constituintes químicos do tipo sesquiterpenóides e compostos aromáticos, estes últimos ligninas e derivados do ácido cinâmico. Seus sesquiterpenóides são do tipo Cuparane, amplamente distribuídos em hepáticas, porém, também podem ser encontrados em antóceros do gênero *Megaceros* Campb. (ex. *Megaceros tosamus* Stephani) e espécies de *Phaeoceros* Prosk., em pequenas quantidades. *Anthoceros laevis* L. e *A. punctatus* L., possuem derivados de ácidos cinâmicos, enquanto que ligninas do tipo ácido megacerotônico foram detectadas em *Dendroceros japonicus* Stephani, *Megaceros flagellaris* (Mitt.) Stephani.

A partir do amplo conhecimento destes compostos químicos existentes nas briófitas, foi possível testar e avaliar as seguintes atividades biológicas: citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, carcinogênica, inibição enzimática e antimicrobiana (antifúngica, antibacteriana, antiviral). Além dos efeitos fitotóxicos, cardiotônicos (aumento do fluxo sanguíneo coronário), *antifeedant*/fagodeterrente, inseticida e toxicidade diante de moluscos e peixes (DEY e DE, 2012; ANDE et al., 2010; ASAKAWA et al., 1980; 1988; BUKVIČKI et al., 2012; CANSU et al., 2013, FRAHM e KIRCHHOFF, 2002; HAINES e RENWICK, 2009; MARKHAM et al., 2006; SABOVLJEVIC M. et al., 2001; VATS e ALAM, 2013, ÜCÜNCÜ et al., 2010).

Neste contexto, a maior contribuição é dada por pesquisadores do Japão, Índia e China. Entretanto, o estudo com relação a sua química, farmacologia, e aplicação de fontes de cosméticos e medicamentos ou drogas agrícolas vem sendo realizado em diversos países, com mais de 1000 espécies de briófitas estudadas na América do Sul e do Norte, África do Sul e do Norte, Europa, Ásia, Oceania e Antártida (ADIO, 2005a; 2005b; AFRON, 2012; FRAHM, 2003; FRAHM e KIRCHHOFF, 2002; NAGASHIMA et al., 2002, PINHEIRO et al., 1989; VIDAL et al., 2012).

No Brasil, o conhecimento químico das briófitas é incipiente. Foram publicados somente dois trabalhos nesta linha de pesquisa. O primeiro, desenvolvido no estado do Pará, testou os efeitos antibactericidas dos extratos de 25 espécies de briófitas (musgos e hepáticas), incluindo *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (PINHEIRO et al., 1989). O segundo, realizado no estado do Ceará, realizou fitoquimicamente o extrato do musgo *Octoblepharum albidum* e sua atividade antibactericida (VIDAL et al., 2012).

1.2. ATIVIDADE INSETICIDA E/OU FAGODETERRENTE (*ANTIFEEDANT*) DAS BRIÓFITAS.

As briófitas, na maioria das vezes, não são atacadas por insetos, caracóis, lesmas e outros pequenos animais (ASAKAWA et al., 1988; DVIDSON e LONGTON, 1987). Este fato, aliado ao isolamento dos sesquiterpenóides (pungisane, dramine e poligodial) obtidos de *Porella obtusata* (Tayl.) Trev (HUNECK, 1984), levou Frahm e Kirchhoff (2002), a desenvolverem um estudo testando o efeito *antifeedant*/fagodeterrente (ASAKAWA et al., 1980; VENDRAMIM e GUZZO, 2009) do extrato do musgo *Neckera crispa* Hedw. e da hepática *P. obtusata* sobre a lesma (*Arion lusitanicus*), onde folhas de alface foram pulverizadas com diferentes concentrações destes extratos. Os

resultados de fagodeterrência foram satisfatórios para as duas espécies de briófitas, sobretudo, para *P. obtusata*.

Wada e Munakata (1971) testaram a atividade inibitória de terpenóides (sesquiterpenos) ocorrentes em plantas para controlar a alimentação de insetos. Um dos sesquiterpenos testados foi pinguisane, isolado da hepática *A. pinguins*. Testou-se as concentrações de 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.63% e 0.031% sobre *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera) e destas concentrações, 0.5%, apresentou resposta inibitória.

Asakawa et al. (1980), em seu trabalho sobre os tipos de secoaromadendranos (sesquiterpenos) de espécies de *Plagiochila* (Dumort) Dumort com ação fagodeterrente em insetos, revelaram que a pungência característica das espécies de hepáticas (*Plagiochila fruticosa* Mitt., *P. Hattoriana*, *P. ovalifolia* Mitt. e *P. yokogurensis* Stephani) foi devido a este novo tipo de sesquiterpeno (plagiochiline A). Este sesquiterpeno apresentou forte efeito fagodeterrente contra o verme do exército africano (*Spodoptera exempta* (Walker)).

Labbe' et al. (2005) analisaram os constituintes químicos da hepática *Balantiopsis cancellata* (Nees) Steph. (Balantiopsidaceae), e isolaram os ésteres (ácido benzóico 2-feniletanol, ácido cinâmico-*cis*-2-feniletanol, ácido cinâmico-*trans*-2-feniletanol, ácido *trans*- β -metiltioacrilato e feniletanodiol benzoato. Estes foram testados na inibição do crescimento do fitopatógeno *Cladosporium herbarum* e no controle da atividade *antifeedant*/fagodeterrente de *S. littoralis*. A resposta foi positiva tanto para fagodeterrência quanto para a ação antifúngica, principalmente do éster ácido *trans*- β -metiltioacrilato.

Markham et al. (2006) avaliaram o efeito fagodeterrente do extrato protéico de 17 espécies de samambaias e seis musgos, sobre *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera) (lagarta-da-espiga) e *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (lagarta-do-cartucho do milho). O musgo *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid e as samambaias *Asplenium platyneuron* (L.) BSP., *Athyrium pycnocarpon* (Spreng.) Tidstr., *Gymnocarpium dryopteris* (L.) Newmn. e *Onoclea sensibilis* L., causaram fagodeterrência sobre as lagartas, reduzindo os danos nos discos das folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) utilizadas nos ensaios, e também a estagnação do crescimento larval.

Haines e Renwick (2009) analisaram o efeito *antifeedant* de musgos na pré-ingestão e pós-ingestão pela lagarta generalista, *Trichoplusia ni* Hu Hübner (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae). A aceitabilidade e qualidade dos musgos *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) usando o lepdóptero. Na pré-ingestão, as lagartas consumiram muito mais o controle, porém o musgo *C. americanum* foi consumido em quantidade suficiente para avaliar as respostas do pós-ingestivo. Assim, os resultados evidenciaram uma atividade de fagodeterência para a maioria dos musgos.

Ande et al. (2010) avaliaram a ação inseticida de quatro espécies de musgos em experimento de campo na Nigéria, incluindo *Calymperes afzelii*, contra a broca do caule do milho (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). Todos os musgos testados apresentaram efeito tóxico contra o ataque da lagarta, sobretudo, *C. afzelii* e *Bryum coronatum* Schwaegr que obtiveram atividade tão boa quanto o Tricel, o inseticida inorgânico usado no controle.

Não foi encontrado na literatura, estudos que relatassem previamente tanto a composição química quanto a avaliação do efeito inseticida e/ou fagodeterrente das duas espécies de musgos selecionadas para o presente estudo. Portanto, este trabalho apresenta uma primeira abordagem para o estudo em questão dos musgos *Campylopus surinamensis* Müll. Hal e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. Até o momento, no Brasil, nada foi estudado quanto ao potencial dos fitoquímicos das briófitas no controle da atividade *antifeedant*/fagodeterrente em insetos.

1.3. A LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO, A IMPORTÂNCIA DO USO DE PLANTAS COMO INSETICIDA NATURAL E A INDICAÇÃO DE BRIÓFITAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE.

Várias espécies agronômicas de plantas vêm sendo testadas nos Sistemas Agroflorestais, como milho, sorgo, feijão, arroz e soja (DANIEL et al., 2004.). O milho representa um dos mais importantes cereais do mundo. Para o Brasil, esta cultura tem valor tanto sob o aspecto econômico quanto social, sendo produzida em todos os Estados do país (AGRIANUAL, 2003; PEREIRA, 2007). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (ca. 6%), atrás apenas dos Estados Unidos (41%) e da China (19%). Sua área de plantio é de 13 milhões de hectares, aproximadamente, e a produção anual estimada é de 41,5 milhões de toneladas de grãos, sendo que a safrinha (segunda safra) representa 13,5% desta produção (AGRIANUAL, 2003).

Este cereal é também matéria prima para um grande número de produtos industrializados, indispensável tanto na alimentação humana quanto na animal (TEIXEIRA, 1997). No entanto, desde o plantio até a colheita, a cultura é atacada por

uma série de pragas, principalmente a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* que é praga-chave para esta cultura (ROSA et al., 2009).

A fase adulta de *S. frugiperda* é uma mariposa com cerca de 35mm de envergadura, apresenta coloração pardo-escuro nas asas anteriores e branco acinzentado nas asas posteriores. As lagartas recém-eclodidas alimentam-se da própria casca do ovo. Após esta alimentação, permanecem em repouso por um período variável de 2 a 10 horas. A lagarta completamente desenvolvida mede cerca de 40 mm, e com coloração variável de pardo escuro até quase preta e com o Y invertido na parte frontal da cabeça (CRUZ et al. 1982).

O período médio de duração das fases de ovo, de larva, de pupa e de adulto é em torno de 3, 25, 11 e 12 dias, respectivamente. Após completarem seu desenvolvimento, abandonam a planta e penetram no solo a uma profundidade de aproximadamente 5cm, onde empupam. Algumas vezes a pupação não se dá no solo, podendo ocorrer em restos culturais (LEIDERMAN e SAUER, 1953).

É importante considerar que, no início da fase larval as lagartas têm preferência alimentar pelas folhas jovens da planta e o desenvolvimento da população das lagartas se dar na fase vegetativa (HARRISON, 1984; HOY e SHELTON, 1987). Após o seu desenvolvimento larval, as lagartas infestam a cultura e se instalam nas folhas do cartucho, perfuram a base da planta, danificam a espiga, causando danos severos a plantação (PARRA et al. 1995; GASSEN, 1996). Além disso, em geral, as lagartas têm mais sensibilidade aos compostos secundários nos ínstares iniciais diminuindo conforme o desenvolvimento larval avança (BELLONDA e ZUCOLOTO, 2009).

Spodoptera frugiperda é considerada uma das pragas mais importantes de muitas culturas agrícolas nas Américas. No Brasil, destaca-se como um dos principais lepidópteros desfolhadores do milho, reduzindo a produção em cerca de 34 a 40%, acarretando prejuízos de até 400 milhões de dólares ao ano (CRUZ et al., 1999).

O ataque da lagarta-do-cartucho vem aumentando severamente em áreas de cultivos de milho, podendo causar até 60% de redução no rendimento dos grãos (PEREIRA, 2007). A severidade do ataque desta praga pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento da cultura e da lagarta, uma vez que esta se alimenta da planta desde a sua emergência até a formação das espigas, embora tenha preferência por cartuchos de plantas jovens (PEREIRA, 2007; CRUZ e TURPIN, 1982).

As lagartas são predominantemente especialistas, alimentando-se em uma ou poucas famílias de plantas. Têm uma relação evolutiva especial e amplamente relatada

na literatura com as defesas químicas das plantas verdes (BERNAYS, 1998). A importância da interação das lagartas com suas respectivas plantas-hospedeiras é tão grande, que elas são conhecidas por nomes associados a essas plantas, a exemplo da lagarta-do-cartucho do milho (*S. frugiperda*).

O tipo de cultivar utilizada e o local de plantio, também podem influenciar no grau de ataque de *S. frugiperda* sobre a planta (CRUZ, 1995). Este inseto também causa danos às culturas do abóbora, algodão, alface, amendoim, arroz, batata, couve, espinafre, feijão, repolho, sorgo, tomate, trigo (CRUZ e MONTEIRO, 2004).

O controle de *S. frugiperda*, tem sido realizado quase que exclusivamente com produtos agrotóxicos caros, que são aplicados logo que sua ocorrência é detectada. E não há adoção de critérios mínimos de manejo, resultando muitas vezes no fracasso do controle da lagarta (PEREIRA, 2007). O uso constante e indiscriminado destes produtos tem acarretado a presença de altos níveis de resíduos tóxicos nos alimentos, desequilíbrio biológico, contaminações ambientais, intoxicações de pessoas e animais, bem como o aparecimento de linhagens de insetos resistentes (TRINDADE et al., 2000).

Produtos naturais provenientes de plantas podem ser uma alternativa no manejo destas pragas, na forma de extratos de plantas cientificamente conhecidas (GUERRA, 1985). Estas práticas costumam ser baratas e acessíveis aos produtores rurais (VIEGAS-JUNIOR, 2003). Novas substâncias são necessárias para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixo impacto ambiental (VIEGAS-JUNIOR, 2003).

No Brasil, a utilização destas alternativas de controle de pragas, vem crescendo em substituição aos inseticidas altamente tóxicos ao homem e ao meio ambiente (LEÃO, 1996; VIEGAS-JUNIOR, 2003). A ação destes fitoquímicos nas pragas pode ser por repelência, inibição de oviposição e da alimentação total ou parcial (fagodeterrência), alterações no sistema hormonal, distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases (ROELD, 2001; SAITO e LUCCHINI, 1998; VENDRAMIM e GUZZO, 2009).

Os novos conhecimentos científicos, cada vez mais aprofundados sobre as espécies vegetais, desenvolvidos por estudos interdisciplinares de pesquisa nas áreas da botânica, química, farmacologia, agronomia e outras ciências afins, é fundamental para

dar suporte e longevidade ao uso do potencial natural ainda existente no planeta (VIEGAS-JÚNIOR, 2003; PHILIPPI JR., 2000).

Diante do exposto, acredita-se que o pouco conhecimento das briófitas nesta área de pesquisa, deve-se a razões como: o seu pequeno porte, dificuldade de identificação e separação dos espécimes, o pequeno número de especialistas, além da falta de parceria com profissionais de outras linhas de pesquisa com cunho químico e agrônomo.

Considerando-se que há na literatura científica comprovação da atividade biológica das briófitas e os avanços nesta linha de pesquisa, é oportuna a realização de um estudo químico com enfoque para o potencial *antifeedant*/fagodeterrente de espécies de briófitas que ocorrem na Amazônia Brasileira.

QUESTÕES E HIPÓTESES

1. Os musgos *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. (Dicranaceae) e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Calymperaceae) podem ser considerados importantes fontes naturais de terpenos, ácidos graxos, ésteres e outros constituintes químicos?

Hipótese 1

H0: Os musgos *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. (Dicranaceae) e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Calymperaceae) não são fontes naturais de terpenos, ácidos graxos, ésteres e outros constituintes químicos.

H1: Os musgos *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. (Dicranaceae) e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Calymperaceae) são fontes naturais de terpenos, ácidos graxos, ésteres e outros constituintes químicos.

2. Existe atividade inseticida e/ou fagodeterrente dos extratos de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr, sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith)?

Hipótese 2

H0: Não existe atividade inseticida e/ou fagodeterrente dos extratos de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr, sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith).

H1: Existe atividade inseticida e/ou fagodeterrente dos extratos de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr, sobre a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith).

OBJETIVO GERAL

Analisar a composição química volátil de duas espécies de musgos e avaliar o efeito do seu extrato etanólico no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em condições controladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar os constituintes químicos voláteis de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) ocorrentes na Amazônia Brasileira.

2. Avaliar a atividade inseticida e/ou fagodeterrente de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) de 3º instar.

A Tese está organizada em três manuscritos: Artigo 1- Composição química volátil de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) ocorrentes na Amazônia Brasileira; Artigo 2- Atividade inseticida e fagodeterrente de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. (Bryophyta) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae); Artigo 3- Atividade inseticida e/ou fagodeterrente de *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae).

Os manuscritos estão formatados segundo as normas das revistas às quais serão submetidos. Para margens, espaçamentos e numeração das páginas foram adotadas as normas de apresentação de dissertações e teses da Universidade Federal Rural da Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 2003.
- AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; KIM, T. Y.; RI, M. B.; GIRI, A. P.; VERSTAPPEN, F. W. A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, W. A. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**. v.5, 49-58. 2006.
- ALAM, A. Some Indian bryophytes known for their biologically active compounds. **IJA BPT**. v.3, p. 239 - 246, 2012.
- 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. 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, 1995. 562p.

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, 2013. 780 p.

BELLONDA. H. C. H. B.; ZUCOLOTO, F. Lagartas desfolhadoras. 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, 2009.

BURTON MHS, PETERSON PJ. Metal accumulation by aquatic bryophytes from polluted mine streams. **Envir Pollut**, v.19, n.19, p.39-46. 1979.

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

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.

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

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

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

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.

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

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

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. e 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.

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

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

FATOBA, P. O., OMOJASOLA, P. F., AWE, S AND 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.

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

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.; 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, p14-41, 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. 1991, 100p.

GRADSTEIN, S. R.; COSTA, D. P. 2003. (Org.) **The Hepaticae and Anthocerotae of Brazil**. 1. ed. Memoirs of the New York Botanical Garden, v. 87, p.318.

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

HASHIMOTO T., SUZUKI, H., TORI, M., ASAKAWA, Y. **Phytochemistry**, v.30, 1991. 1523p

HARRISON, F. P. 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, 1984

HEINRICHS J, GROTH, H., GRADSTEIN, S.R., RYCROFT, D.S., COLE, W.J., ANTON, H.. *Plagiochila rutilans* (Hepaticae): a poorly known species from Tropical America. **The Bryologist** v. 104, n. 3, p. 350-361, 2001.

HEROUT, V. Diterpenes and Higher Terpenes from Bryophytes. In: Zinsmeister, H. D.; Mues, R. (Eds.). **Bryophytes, their Chemistry and Chemical Taxonomy**. Clarendon Press, Oxford, p. 83-102, 1990.

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

HUNECK, S. Chemistry and biochemistry of bryophytes. In: SCHUSTER, R. M. **New manua of Bryology**, Nichinan. P 1-116, 1984

JOCKOVIĆ, N.; SABOVLJEVIĆ, M.; , N. Contribuição para os constituintes químicos de Balkan briófitas: ácidos fenólicos, flavonóides, triterpenos e alcaloides. **Natura Montenegrina, Podgorica**, v.6, p. 123-129, 2007.

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

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

LEIDERMAN, L. M.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais. *O Biólogo*. (S. I.), v.19, n.6, p. 105-113, 1953.

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

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

LUDWICZUK A.; F. NAGASHIMA; R. S. GRADSTEIN AND Y. ASAKAWA, Volatile components from the selected Mexican, Ecuadorian, Greek, German and Japanese liverworts. **Natural Product Communications** v.3, p.133-140, 2008.

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.

MORANTES, J., C. PRIETO, E. LINARES, J. RINCÓN; F. ARISTIZÁBAL. Análisis fitoquímico y de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* v.31, n.121, p.473- 479, 2007.

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

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.

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

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.

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.

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, S. 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.

ROELD, 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.

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.

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

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

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.

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

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.

SUIRE, C. Les donnees actuelles sur la chimie des bryophytes. **Rev. Bryol. Lichenol**, v 4, p. 105-256, 1975

TEIXEIRA, M. R. O. A cultura do milho e sua importância nos sistemas de produção de Mato Grosso do Sul, Dourados. **Anais. EMBRAPA-CPAO**. Documentos, 23. 78p 1997.

TRINDADE, R. C. P.; MARQUES, I. M. R.; XAVIER, H. S.; OLIVEIRA, J. V. de. Extrato metanólico da amêndoa da semente de Nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do tomateiro. **Scientia Agrícola**, v.57, n.3, p.407-413, 2000.

ÜCÜNCÜ, O.; CANSU, T. B.; ÖZDEMİR, T.; ALPAY KARAOĞLU, S.; YAYLIN, N. 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**, v. 34: p. 825 – 834, 2010.

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

VANDERPOORTEN, A.; GOFFINET, B. **Introduction of Bryophytes**. Cambridge University Press, 2009. 294p.

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

VIANNA, V. M.; PINHEIRO, L.A.F.V. **Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais**. SÉRIE TÉCNICA IPEF v. 12, n. 32, p. 25-42, dez. 1998.

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.

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

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, 1948.

2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL DE *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. E *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) OCORRENTES NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

RESUMO

A flora briofítica é abundante no mundo inteiro e está presente em praticamente todos os ecossistemas da Terra. Um foco importante em estudos de briófitas, é o conhecimento da composição química de extratos e dos óleos essenciais ou concentrados voláteis. A carência de literatura sobre a investigação fitoquímica de espécies de briófitas é uma grande lacuna na pesquisa para este grupo vegetal. Portanto, visando ampliar o conhecimento dos compostos químicos que ocorrem em briófitas, o presente trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos voláteis das espécies de musgos *Campylopus surinamensis* e *Calymperes lonchophyllum* ocorrentes na Amazônia Brasileira. As amostras foram coletadas em um fragmento de Floresta Amazônica no Parque Ecológico de Gunma, município de Santa Bárbara, Pará, 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). No total, foram identificados 34 constituintes químicos nos extratos pentânicos das duas espécies estudadas. Os compostos identificados pertencem principalmente aos grupos dos hidrocarbonetos aromáticos, terpenóides, ésteres, ácidos graxos e aldeídos. Naftaleno foi o hidrocarboneto aromático predominante em *C. lonchophyllum* e *C. surinamensis* (71,8% e 45,71%, respectivamente). Este constitui o primeiro relato da composição química volátil dessas espécies, e os resultados sugerem que estes musgos são importantes fontes naturais de terpenos, fenilpropanóides, ácidos graxos, aldeídos e ésteres.

Palavras-chave: Musgos, Dicranaceae, Calymperaceae, Constituintes voláteis.

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia

2. Volatile chemical composition of *Campylopus surinamensis* (Müll.) Hal. and *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) occurring in the Brazilian Amazon

ABSTRACT

The bryoflora is abundant worldwide and is present in virtually all of Earth's ecosystems. An important focus on bryophytes studies, is the knowledge of the chemical composition of extracts and essential oils or volatile concentrates. The lack of literature on the phytochemical investigation of bryophytes species is a big gap in the research for this plant group. Therefore, to enhance the understanding of the chemical compounds that occur in bryophytes, this study aimed to analyze the volatile chemical constituents of mosses species *Campylopus surinamensis* and *Calymperes lonchophyllum* occurring in the Brazilian Amazon. The samples were collected in a fragment of the Amazon forest in Parque Ecológico de Gunma, municipality of Santa Bárbara, Pará State, and submitted to extraction by simultaneous distillation-extraction (SDE) to obtain the volatile compounds, which were analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS). In total, were identified 34 chemical constituents in pentanic extracts from the two studied species. The identified compounds mainly belong to the group of aromatic hydrocarbons, terpenoids, esters, fatty acids and aldehydes. Naphthalene was the predominant aromatic hydrocarbon in *C. lonchophyllum* and *C. surinamensis* (71.8 and 45.71%, respectively). This is the first report of the volatile chemical composition of these species, and the results suggest that these mosses are important sources of natural terpenes, phenylpropanoids, fatty acids, aldehydes and esters.

Keywords: Mosses, Dicranaceae, Calymperaceae, volatile constituents.

2.1. INTRODUÇÃO

A flora briofítica é abundante no mundo inteiro, reunindo cerca de 18.000 espécies (Shaw & Goffinet, 2000), das quais aproximadamente 1.527 ocorrem no Brasil (Costa, 2014). Apesar do número expressivo de espécies esse grupo de plantas ainda permanece pouco explorado, provavelmente em função da pequena biomassa, baixo valor econômico, e a dificuldade prática em separar amostras individuais das mesmas, o que pode desestimular alguns pesquisadores (Rovere & Calabrese, 2011). Atualmente uma abordagem importante em estudos de briófitas é o estudo de substâncias biologicamente ativas produzidas pelas mesmas (Asakawa, 2007; Asakawa et al., 2012; Cansu et al., 2013).

Acredita-se que já foram estudadas, quanto ao seu potencial químico, mais de 1.000 espécies de briófitas, a maioria hepáticas, coletadas em países da América do Sul e do Norte, África do Sul e do Norte, Europa, Ásia, Oceania e Antártida (Adedejiet al., 2012; Adio & König 2005a, b; Asakawa, 1982, 1990a, b, 2001, 2007; Cansu et al., 2013; Clarke & Robinson, 2008; Fatoba et al., 2003, 2012; Jockovic et al., 2007, 2008; Pejinet al., 2012; Rauha et al. 2000; Sabovljevic et al., 2001, 2010, 2011, 2012; Ücuncü et al., 2010; Xie & Lou, 2009). Alguns desses autores identificaram uma série de metabólitos secundários presentes em briófitas, especialmente os pertencentes à classe dos terpenóides (mono-, sesqui- e diterpenos), que representam o maior grupo, com ca. 1.400 estruturas químicas relatadas na literatura. Foram encontrados também compostos aromáticos pertencentes à classe dos benzenóides (ca. 150), flavonóides, principalmente ácidos fenólicos (ca. 360), fenilpropanóides (ca. 65), derivados de ácidos graxos (ca. 25), além de outros (Asakawa, 1995, 2001, 2007; Xie & Lou, 2009; Xie et al., 2010).

Fatoba et al. (2003) estudaram seis espécies de musgos (*Bryum coronatum* Schwägr, *Thuidiumgratum* (P. Beauv.) A. Jaeger, *Calymperes afzelii* Sw., *Barbula lambarenensis* P. de La Varde, *Hyophila involuta* (Hook.) A. Jaeger e *Octoblepharum albidum* Hedw.) que levou ao isolamento de compostos fenólicos, alcalóides, taninos, saponinas e glicosídeos cardíacos. Dois flavonóides (apigenina-7-O-triglicosídeo e luteolina-7-O-neo-hesperidosídeo) foram isolados de *Dicranum scoparium* Hedw., da família Dicranaceae Schimp. (Basile et al., 2003).

Extratos de musgos e hepáticas têm apresentado diversas atividades biológicas, tais como, antibacteriana (Basile et al., 1999; Cansu et al., 2013; Pinheiro et al., 1989; Vidal et al., 2012), antifúngica (Cansu et al., 2013; Sabovljevic et al., 2011; Ücuncü et

al., 2010), antioxidante (Dey & De, 2012), inseticida (Ande et al., 2010; Asakawa, 2007; Asakawa et al., 1980; Fatoba et al., 2003; Labbé et al., 2005), antiofídica (Pereanez et al., 2010), anti-inflamatória e antiúlcera (Nakagawara et al., 1992) e citotóxica e antitumoral (Glime, 2007; Perry et al., 1996; Shen et al., 2010; Spjut et al., 1986). O número de estudos sobre compostos biologicamente ativos de briófitas vem crescendo rapidamente, resultando na identificação de várias substâncias com elevada atividade biológica (Dey & De, 2012; Cansuet al., 2013; Mellegard et al., 2009; Üçüncü et al., 2010).

No Brasil, as pesquisas com esse grupo de plantas vêm enfocando principalmente os aspectos taxonômicos, florísticos e ecológicos, contudo, dois trabalhos abordaram estudos biológicos e químicos de briófitas. No primeiro, realizado por Pinheiro et al. (1989) com briófitas do estado do Pará, foram testados e constatados os efeitos antibacterianos de extratos de 25 espécies, incluindo musgos e hepáticas. Das 25 espécies estudadas 10 responderam positivamente, incluindo *C. lonchophyllum* (Calymperaceae Kindb). No segundo, desenvolvido no estado do Ceará, por Vidal et al. (2012), foi investigada a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Octoblefarum albidum* Hedw e do mesmo extrato em associação com aminoglicosídeos. O screening fitoquímico revelou a presença de taninos, antocianinas, flavonas, flavonóis, flavononas, aurones, proantocianidinas, alcalóides e terpenos, e os testes mostraram atividade inibitória para todas as linhagens de bactérias testadas.

Embora a atividade antibacteriana de *C. lonchophyllum* tenha sido comprovada, no Brasil, de acordo com a literatura consultada, não há relatos anteriores sobre a sua composição química. Da mesma maneira, não foram encontrados relatos de estudos químicos com *C. surinamensis*.

Visando ampliar o conhecimento químico das briófitas, este trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos voláteis das espécies de musgos *C. lonchophyllum* e *C. surinamensis* ocorrentes na Amazônia Brasileira.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. ÁREA DE ESTUDO E SELEÇÃO DAS ESPÉCIES DE BRIÓFITAS

O Parque Ecológico de Gunma (PEG) está localizado em um fragmento de Floresta Amazônica, no município de Santa Bárbara, nordeste do estado do Pará, Amazônia Oriental Brasileira (01°13'00.86''S e 48°17'41.18''W). Possui uma área com cerca de 400 ha de floresta nativa e 140 ha de área aberta para uso múltiplo, a qual tem

sofrido diversas alterações em decorrência do crescimento urbano, caça e extração madeireira ilegal, além da construção de uma rodovia que atravessa o parque.

A flora e ecossistemas do Parque foram estudados no âmbito 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). Esses autores implantaram 20 parcelas permanentes de 1 ha cada, sendo 15 de ambientes de florestas conservadas de terra firme, duas de igapó e uma de várzea, além de duas florestas secundárias em diferentes estágios de sucessão.

A sua brioflora foi estudada por Fagundes et al. (no prelo), em seu trabalho “Riqueza e aspectos ecológicos das comunidades de briófitas (Bryophyta e Marchantiophyta) de um fragmento de Floresta de Terra Firme no Parque Ecológico de Gunma, Município de Santa Bárbara, Pará, Brasil”.

Os solos que ocorrem no Parque são classificados de três tipos Latossolos Amarelos Álicos, Concrecionário Laterítico Álico e Gley Pouco Úmido (Almeida et al. 2009).

O Tipo climático é Af_i - tropical úmido, pela classificação de Köppen (Bastos et al. 1984), com temperatura média anual de 26°C, mínima de 22°C e máxima de 31°C. A precipitação pluviométrica anual varia de 2500 a 3000mm e a umidade relativa do ar atinge ca. 85% (SUDAM, 1984).

As espécies *C. surinamensis* e *C. lonchophyllum* foram selecionadas para esse estudo devido serem cosmopolitas e abundantes em florestas de planície em todo o Neotrópico (Costa, 2014), o que facilita a sua obtenção. Além disso, também já foram desenvolvidas pesquisas sobre metabólitos secundários com propriedades farmacológicas envolvendo outras espécies de musgos da mesma família e/ou do mesmo gênero (Asakawa, 1995; Basile et al., 2003; Fatobaet al., 2003; Pinheiro et al., 1989; Xie& Lou, 2009).

2.2.2. COLETA, IDENTIFICAÇÃO E TRIAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de *C. lonchophyllum* foram coletadas em ecossistema de floresta secundária de terra firme, sobre troncos de árvores vivas. As amostras de *C. surinamensis* em floresta de igapó, sobre o solo, utilizando-se das técnicas de coleta de Yano (1989). Estes ambientes possuem sua preservação ameaçada pela atividade antrópica existente nas proximidades desta área.

No Laboratório de Briologia do Museu Paraense Emílio Goeldi procedeu-se a lavagem do material botânico, a identificação e a separação das espécies, usando-se pinça (Flume5) com o auxílio de estereomicroscópio (Leica, Wild M3Z). Como briófitas de diferentes gêneros ou espécies podem ocorrer juntas (Richards, 1984), após secagem à temperatura ambiente durante três dias, foram separados apenas espécimes pertencentes às duas espécies de musgos selecionadas para este estudo. Incluiu-se tanto o gametófito quanto o esporófito, quando presente, ou seja, a planta inteira.

As espécies foram identificadas pelo autor do presente estudo, que é especialista em briófitas, seguindo as técnicas usuais para o grupo com auxílio de literatura especializada, sendo adotada a classificação taxonômica de Goffinet et al. (2008). As exsiccatas foram depositadas no Herbário João Murça Pires (MG), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Belém, Pará, Brasil.

2.2.3. OBTENÇÃO DO CONCENTRADO VOLÁTIL

As amostras (2,6 g), secas à temperatura ambiente por um período de dois (tempo para separação das mesmas), foram submetidas à extração durante 2 h, por micro destilação-extração simultânea (DES), utilizando um microextrator tipo Nickerson & Likens da Chrompack. A extração foi realizada no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), da Universidade Federal do Pará (UFPA). Foi utilizado *n*-pentano (2mL) como solvente, e o extrator foi acoplado a um sistema de refrigeração para manutenção da temperatura da água de condensação em aproximadamente 10° C. Todas as extrações foram feitas em duplicata.

2.2.4. ANÁLISE DO CONCENTRADO VOLÁTIL POR CG-EM

Os componentes voláteis foram analisados por cromatografia 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 de filme) nas seguintes condições operacionais: gás de arraste hélio, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s (medida a 100 °C); temperatura do injetor 240 °C; tipo de injeção: sem divisão de fluxo (0,1 µL da solução pentânica); temperatura do forno programada para 60-260 °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

Os constituintes foram identificados através da comparação dos seus espectros 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 químicos e índices de retenção (IR) estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, em ordem crescente dos seus IR. No total, foram identificados 25 constituintes químicos de *C. surinamensis*, correspondentes a 87,07% do total dos constituintes presentes no extrato pentânico, e nove de *C. lonchophyllum*, representando 95,74% do total dos constituintes, também presentes no seu extrato pentânico. Os constituintes químicos identificados nos extratos das duas espécies pertencem, principalmente, ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos, aldeídos, terpenos, fenilpropanóides, ésteres e ácidos graxos.

O constituinte predominante no extrato pentânico de *C. surinamensis* foi o hidrocarboneto aromático naftaleno (45,71%). Outros constituintes presentes em alto teor foram os ácidos graxos hexadecanóico (9,02%) e hexanóico (7,26%) e o éster ftalato de di-isobutílica (2,87%). No extrato pentânico de *C. lonchophyllum* o naftaleno (71,82%) foi detectado com um teor mais alto do que no de *C. surinamensis*, além do fenilpropanóide metileugenol (5,78%), dos sesquiterpenos β -bazaneno (7,4%) e *cis*- β -guaíeno (4,15%) e do éster 2-metilpropanoato de 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentil (1,91%).

Naftaleno foi predominante nos extratos pentânicos das duas espécies estudadas (*C. surinamensis* e *C. lonchophyllum*). Naftaleno e seus derivados são comuns em algumas espécies de hepáticas e de musgos. Embora não tenha sido feita a quantificação, Asakawa (1995) e Rycroft et al. (1998), identificaram esse composto nas hepáticas *Adelanthus decipiens* (Hook.) Mitt., *Plagiochila subdura* Inoue, *Pellia epiphylla* (L.) Corda, *Scapania undulata* H. Buch e *Triandrophyllum subtrifidum*

(Hook. & Taylor) Fulford & Hatcher, além de outras. Também foram observadas quantidades significativas de hidrocarbonetos aromáticos em algumas espécies de musgos (Harmens et al., 2011; Wilson, 1989). *Abietinella abietina* (Hedw.) M. Fleisch. e *Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr., coletadas em áreas rurais da Áustria, apresentaram ca. 7,3% de naftaleno em sua composição química (Krommer et al., 2007). Em *Hypnum cupressiforme* Hedw. também de áreas rurais da Áustria e República Tcheca, foi encontrado aproximadamente de 2,6% a 7,3% de compostos aromáticos (Holoubek et al. 2000, 2007; Krommer et al., 2007). Nesta última espécie, foi encontrado 45,3% de acenafteno, um hidrocarboneto aromático derivado do naftaleno, e em *Dicranum scoparium* Hedw., pertencente à família Dicranaceae, também foi detectado 4,1% deste mesmo composto (Foan et al., 2010; Holoubek et al., 2000, 2007).

Naftaleno e acenafteno, detectados em *D. scoparium*, espécie comum em substratos terrestres, assim como ciclopentatiapirano, identificado no extrato pentânico de *C. surinamensis*, coletada também sobre o mesmo substrato, são encontrados em solos contaminados (Shirani, 2011),

Uma parte dos hidrocarbonetos aromáticos ocorrentes em briófitas são resíduos provenientes de impurezas resultantes da deposição de poluentes ambientais, uma vez que as briófitas têm facilidade de absorver poluentes orgânicos persistentes (POPs), como por exemplo, o naftaleno e seus derivados (Harmens, et al., 2011; Wilson, 1989). Porém, de acordo com Wilson (1989) e Asakawa (1995), esses compostos também são constituintes químicos naturais produzidos por briófitas.

Com relação à classe dos terpenóides, apesar dos terpenos serem comuns em hepáticas, e raros em musgos (Asakawa, 2001), nas espécies estudadas houve a ocorrência tanto de mono-, quanto de sesquiterpenos. Isto sugere que, apesar de serem morfologicamente diferentes das hepáticas, alguns musgos podem ser evolutivamente relacionados com as hepáticas, a exemplo de *Plagiomnium acutum* (Lindb.) T.J. Kop., o qual possui em sua composição química os sesquiterpenos *ent*- β -cedreno, α -cedreno, α -acoradieno e o diterpeno (+)-dolabela-3,7-dien-18-ol (Asakawa, 2001; Toyota et al. 1998).

Monoterpenos já foram identificados em *Splachnum rubrum* Hedw, espécie referida como primeiro relato de ocorrência de monoterpenos em musgos, sendo estes: α - ou β -felandreno, δ -3-careno e α -pineno (Asakawa, 1995).

Os sesquiterpenos β -bazaneno e *cis*- β -guaiano, majoritários em *C. lonchophyllum* são comuns em hepáticas, tais como *Bazzania jauriana* J., *Bazzania trilobata* (L.) Gray, *Frullania bicornistipula* Spruce, *Lejeunea aquatica* Horik. e espécies de *Radula* Dumort. (Asakawa, 1995).

β -Barbateno, um dos sesquiterpenos presentes em *C. lonchophyllum*, também foi encontrado nas hepáticas *Plagiochila buchtiniana* Stephani, *P. longispina* Lindenb. & Gottschee, *P. diversifolia* Lindenb. & Gottsche (Heinrichset al., 2000).

Com relação aos musgos há citação na literatura de 28 sesquiterpenos, distribuídos entre as espécies *Tortula muralis* Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. (Ücuncü et al., 2010) e 17 nas espécies *Hylocomium splendens* Schimp (Hedw.) e *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr. (Cansu et al., 2013). Apenas o α -guaiano encontrado em *L. sciuroides* pertence à classe sesquiterpênica do tipo guaiano encontrado neste trabalho.

β -Bazaneno foi identificado em *Scapania aspera* M. Bernet & Bernet (Bukvicki et al., 2013) e no óleo essencial de *Plagiochila asplenoides* (Adio & König, 2005a).

(*E*)- β -Ionona previamente citado ocorrer em *Tortula muralis* Hedw (Ücuncü et al., 2010), também foi identificado em *C. lonchophyllum*.

Maaliol, presente em *C. surinamensis*, foi isolado de *Lepidozia fauriana* (Sasakawa, 2013). Sesquiterpenos do tipo miltailanos foram isolados de *Mylia taylorii* (Kingham et al., 2013).

O fenilpropanóide metileugenol foi detectado em porcentagem significativa (5,78%) em *C. lonchophyllum*. De acordo com a literatura consultada, não foram encontrados trabalhos que relatem a ocorrência de metileugenol em briófitas.

A predominância de ácidos graxos em *C. surinamensis* também foi observada em outros estudos químicos de briófitas, uma vez que há grande ocorrência destes compostos secundários tanto em musgos quanto em hepáticas (Asakawa, 1995). Além disso, alguns desses constituintes químicos costumam ser semelhantes nos dois grupos de briófitas supracitados (Asakawa, 1982; Huneck, 1983).

O ácido hexadecanoico (9,02%), um dos constituintes majoritários em *C. surinamensis*, é comum em hepáticas dos gêneros *Asterella* P. Beauv., *Lophocolea* De Not. e *Marchantia* L. (Asakawa, 1995; Chopra & Kumra, 1988; Sabovljevic et al., 2001) e no musgo *T. muralis* (Ücuncü et al., 2010).

Nos musgos *Dicranella palustris* (Dicks.) A.C. Crundwell, *Dicranum fulvum* Hook., *D. japonicum* Mitt., e *D. scoparium* Hedw. (Dicranaceae), por exemplo, foram detectados os ácidos 9,12-octadecadienóico e 9,12,15-octadecatrienóico (Asakawa 1995). Esses mesmos compostos foram encontrados na hepática *Riccia fluitans* L. (Kohn et al., 1987; Asakawa, 1995). Compostos semelhantes a estes foram encontrados em *C. surinamensis*, espécie pertencente à família Dicranaceae.

Aldeído, como *n*-nonanal, já foi identificado nos musgos *T. muralis*, *H. lutescens*, *H. cupressiforme*, *P. nutans* (Ücuncü et al., 2010) e *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. (Li & Zhao, 2009), enquanto (2*E*)-decenal, (2*E*,4*E*)-decadienal e (2*E*,4*Z*)-decadienal foram encontrados em *H. splendens* (Cansu et al., 2013). Nesse estudo, os aldeídos acima citados para espécies de musgos e hepáticas também estão entre os identificados em *C. surinamensis*.

O éster ftalato de di-iso-butila identificado no extrato pentânico de *C. surinamensis* neste trabalho é comum em algas, como *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen (Nurulet al., 2011). Porém, para as briófitas não foram encontrados relatos de ocorrência desse composto químico, mas seus derivados foram relatados por Labbe et al. (2005), Yan et al. (2008) e Klavina et al. (2012).

Klavina et al. (2012) detectaram nas espécies de musgos *Aulacomnium palustris* (Hedw.) Schwagr., *Polytrichum commune* Hedw., *P. juniperum* Hedw., *Ptilium crista-castrensis* (Hedw.) De Not. e *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt. os compostos benzênicos, 1,4-dimetilbenzeno e 1,2-dimetilbenzeno. Todos são derivados de benzenóides.

Os ésteres 2-metilpropanoato de 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil) propil e 2-metilpropanoato de 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil, derivados do ácido propanóico, foram detectados nos extratos pentânicos de *C. surinamensis* e *C. lonchophyllum*, respectivamente. Ácido propanóico, foi encontrado em 10 espécies de musgos pertencentes às famílias Aulacomniaceae, Polytrichaceae, Hypnaceae, Hylocomiaceae e Sphagnaceae e uma hepática (Plagiochilaceae) estudadas por Klavina et al. (2012).

O presente estudo representa o primeiro registro da composição química volátil de *C. surinamensis* e *C. lonchophyllum*, pertencentes às famílias Dicranaceae e Calymperaceae, respectivamente, cujos resultados indicaram que essas espécies são fontes naturais de terpenos, fenilpropanóides, ácidos graxos, aldeídos e ésteres.

Tabela 1. Constituintes químicos (%) identificados no extrato pentânico de *Campylopus surinamensis*.

Constituintes	IR	%
Ácido hexanóico	967	7,26
2-Pentilfurano	984	1,75
(2E)-Octen-1-al	1049	1,53
n-Nonanal	1100	1,63
(2E)-Nonen-1-al	1157	0,67
Ácido octanóico	1167	0,95
Naftaleno	1178	45,71
Ciclo-pentatiapirano	1108	0,71
(2E,4E)-Nonadienal	1210	0,76
4-Oxononanal	1240	0,68
(2E)-Decenal	1260	1,00
Ácido nonanóico	1267	1,00
(2E,4Z)-Decadienal	1292	0,73
(2E,4E)-Decadienal	1315	1,68
2-Metilpropanoato de 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metil-etil)-propil	1347	0,73
γ -Nonalactona	1358	0,62
(2E)-Undecenal	1357	0,74
β -Bazaneno	1519	0,92
Maaliol	1566	0,53
Heptadecano	1700	0,88
Ftalato de di-iso-butil	1908	2,87
Ácido hexadecanóico	1959	9,02
Ácido(Z,Z)-9,12-octadecadienóico	2183	1,88
Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienóico	2191	1,79
Derivado do ácidoftálico	2534	1,03
Total		87,07

Tabela 2. Constituintes químicos (%) identificados no extrato pentânico de *Calymperes lonchophyllum*.

Constituintes	IR	%
Naftaleno	1178	71,82
2-Metilpropanoato de 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil	1331	1,91
Metileugenol	1403	5,78
β -Barbateno	1440	0,97
Miltail-4(12)-eno	1445	0,95
(<i>E</i>)- β -Ionona	1487	1,51
<i>cis</i> - β -Guaieno	1492	4,15
Acetato de metil- <i>p</i> -terc-butilfenil	1497	1,25
β -Bazaneno	1519	7,4
Total		95,74

REFERÊNCIAS

- Adams RP 2007. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Pub. Corp., London, 804 p.
- Adedeji OA, Ayodele AO, Elijah EC, Olubunmi AF 2012. Phytochemical screening of two tropical moss plants: *Thidiumgratum* P. Beauv and *Barbulaindica* Bridgown 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 asplenoides*. *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.
- 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.
- Almeida, E F, Potiguara, RCV, Macedo, EG, Lins, ALFA 2009. Anatomia foliar de espécies de *Xylopia* L. (Annonaceae) ocorrentes no Parque Ecológico de Gunma, Santa Bárbara, estado do Pará. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 4(2): 175-194.
- Ande AT, Wahedi JA, Fatoba PO 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 (Eds.) *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: 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 RN, Bhatla SC (Eds.). *Bryophyte development: physiology and biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, p. 259-287,

Asakawa Y 1995. Chemical constituents of the bryophytes. In: Herz E, Kirby GW, Moore RE, Steglick W, Tamm C (Org.). *Progress in the chemistry of organic natural products*, 42, New York: Springer-Verlag, p. 1-266.

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, 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, López- Sáez JA, Cobianchi 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 *Tortulamuralis* Hedw. (*Bryophyta*) and *Raphanussativus* L. (*Magnoliophyta*). *Phytochemistry* 62: 1145–1151.

Bastos TX, Diniz TDAS, Kobayash ILT, Santos AR 1984. Estudos mesoclimáticos – variação termopluviométrica em campos experimentais da EMBRAPA-CPATU no Estado do Pará. - EMBRAPA-CPATU, *Pesquisa em Andamento* 134: 1-3.

Bukvicki DR, Tyagi AK, Gottardi DG, Veljic MM, Jankovic SM, Guerzoni ME, Marin PD, 2013. Assessment of the chemical composition and in vitro antimicrobial potential of extracts of the liverwort *Scapania aspera*. *Nat. Prod. Commun.* 8(9):1313-1316.

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

Chopra RN, Kumra PK 1988. *Biology of bryophytes*. Wiley, New York, 350 p.

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

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

Fatoba PO, Omojasola PF, Awe S, Ahmed FG 2003. Phytochemical screening of some selected tropical African mosses. *NISEB Journal* 3: 49-52.

Fatoba PO, Ogunkunle CO, Okewole GA 2012. Mosses as biomonitors of heavy metal deposition in the atmosphere. *Int. J. Environ. Sci.* 1:56-62.

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.

Glime JM 2007. Chapter 2: Medicines and antibiotics. In: *Bryophyte Ecology. Volume 5. Uses*. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. http://www.bryoecol.mtu.edu/chapters/2_Medicine.pdf. Access in February 2013.

Goffinet B., Buck W. R., Shaw A. J. 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.

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 *Plagiochilasect. 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 I*, Nichinan, Miyazaki: The Hattori Botanical Laboratory, p. 1-116
- Jocković N, Pavlović M, Sabovljević M, Kovačević N 2007. Contribution to the chemical constituents of Balkan Bryophytes: Phenolic acids, flavonoids, triterpenes and alkaloids. *Natura Montenegrina* 6: 123 – 129.
- Jocković N, Andrade PB, Valentão P, Sabovljević M 2008. HPLC–DAD of phenolics in bryophytes *Lunularia cruciata*, *Brachytheciastrum velutinum* and *Kindbergia praelonga*. *J. Serb. Chem. Soc.* 73:1161–1167.
- Kinghorn AD, Falk H, Kobayashi J, Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F 2013. *Chemical constituents of Marchantiophyta*. In: Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F (Eds.). *Chemical constituents of bryophytes: bio- and chemical diversity, biological activity, and chemosystematics*. New York: Springer Verlag. p. 254.
- Kļaviņa L, Bikovens O, Šteinberga I, Maksimova V, Eglīte L 2012. Characterization of chemical composition of some bryophytes common in Latvia. *Environmental and Experimental Biology* 10: 27–34.
- Kohn G, Vierengel A, Vandekerckhove O, Hartmann E 1987. 9-Octadecen-6-ynoic acid from *Riccia fluitans*. *Phytochemistry* 26, p. 2101.
- Krommer V, Zechmeister HG, Roder I, Scharf S, Hanus-Ilmarinen A 2007. Monitoring atmospheric pollutants in the biosphere reserve Wienerwald by a combined approach of biomonitoring methods and technical measurements. *Chemosphere* 67: 1956–1966.
- Labbaé C, Faini F, Villagrán C, Coll J, Rycroft DS 2005. Antifungal and insect antifeedant 2-phenylethanol esters from the liverwort *Balantiopsis cancellata* from Chile. *J. Agric. Food Chem.* 53: 247–249.
- 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
- Mellegard H, Stalheim T, Hormazabal V, Granum P E, Hardy SP 2009. Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 85–90.
- 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.

- Nurul ZA, Darah I, Shaida SF, Nor SA 2011. Phytochemical Composition and Antibacterial Potential of Hexane Extract from Malaysian Red Algae, *Acanthophoraspicifera* (Vahl) Borgesen. *World Applied Sciences Journal* 15: 496-501.
- 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.
- Pereanez JA, Lobo-Echeverri T, Rojano B, Vargas L, Fernandez M, Gaviria CA, Nunez V 2010. Correlation of the inhibitory activity of phospholipase A2 snake venom and the antioxidant activity of Colombian plant extracts. *Braz. J. Pharmacog.* 20: 910-916.
- Perry, NB, Foster LM, Lorimer SD, May BC, Weavers RT 1996. Isoprenyl phenyl ethers from liverworts of the genus *Trichocolea*: cytotoxic activity, structural corrections, and synthesis. *J. Nat. Prod.* 59: 729-733.
- Pinheiro SMF, Lisboa CL, Vasconcelos BR 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.
- 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.
- Rovere A, Calabrese G, 2011. Moss diversity in degraded environments under restoring in the Lago Puelo National Park (Chubut, Argentina). *Rev. Chil. Hist. Nat.*, vol. 84, n. 4, pp. 571-580.
- 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.
- Sabovljević M, Bijelović A, Grubišić D 2001. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lekovite Sirovine* 21: 17-29.
- Sabovljević A, Soković M, Glamoclija J, Ćirić A, Vujčić M, Pejin B, Sabovljević 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, Soković M, Glamoclija J, Ćirić A, Vujčić M, Pejin B, Sabovljević 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 alopecuroides* Nieuwland ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraaceae) in *in vitro* conditions. *Pak. J. Bot.*, 44: 339-344.
- Shaw AJ, Goffinet B 2000. *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1-476
- 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.
- Shirani A, 2011. *Behaviour of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Stabilised and Solidified Contaminated Soil*. Thesis submission for the degree of Doctor of Philosophy. Geoenvironmental Research Center Institute of Sustainability, Energy and Environmental Management Cardiff School of Engineering. Cardiff University. 227 p.
- Spjut R, Suffness WM, Cragg GM, Norris DH 1986. Mosses, liverworts, and hornworts screened for antitumor agents. *Econ. Bot.* 40: 310-338.
- Sudam, 1984. Atlas de climatologia da Amazônia brasileira. *Publicação* 39. Belém. 125p.
- Toyota, M., Kimura, K., Asakawa, Y., 1998. Occurrence of ent-sesquiterpene in the Japanese moss-*Plagiomnium acutum*: first isolation and identification of the ent-sesqui- and dolabellane-type diterpenoids from the Musci. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 46, 1488.
- Ücuncü O, Cansu TB, Özdemir T, Alpay Karaoglu S, Yaylin N 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (*Tortulamarialis* Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., and *Pohliamutans* (Hedw.) Lindb.) from Turkey. *Turk J Chem* 34: 825 – 834.
- Van den Dool H, Kratz PDJ 1963. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 463-471.
- 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.
- Wilson MA, Sawyer J, Hatcher PG, Lerch III HE 1989. 1,3,5-Hydroxybenzene structures in mosses. *Phytochemistry* 28: 1395-1400.

Xie CF, Lou HX 2009. Secondary metabolites in bryophytes: An Ecological Aspect. *Chemistry & Biodiversity* 6: 303-311

Xie CF, Qu JB, Wu XZ, Liu N, Ji M, Lou HX 2010. Antifungal macrocyclic bis(bibenzyls) from the Chinese liverwort *Ptagiochasmintermedum* L. *Nat. Prod. Res.*, 24: 515-520.

Yan C, Xing Yu J, Xing T, Xiao Qing C 2008. Comparison of volatile components from *Marchantia convolute* obtained by microwave extraction and phytosol extraction. *J. Chil. Chem. Soc.* 53: 1518-1522.

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.

3. ATIVIDADE INSETICIDA E FAGODETERRENTE DE *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. (Bryophyta) SOBRE LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

Briófitas contêm metabólitos secundários com aromas característicos, sabor amargo e pungência, os quais podem ser utilizados no controle de insetos. São plantas adequadas para pesquisa de substâncias naturais que podem ser usadas como parte de um sistema de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Neste trabalho foi avaliada a atividade inseticida por ingestão e/ou fagodeterrente do extrato etanólico do musgo *Campylopus surinamensis*, no controle de *Spodoptera frugiperda*. Foram testados cinco tratamentos (2,0%; 1,0%; 0,5% e 0,25% $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e o controle) usando-se o método de avaliação sem chance de escolha. Observou-se a fagodeterrência e a mortalidade após 24, 48 e 72 horas da aplicação do extrato vegetal. Houve ação fagodeterrente do extrato nas concentrações de 2,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 1,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ depois de 24 horas de contato, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Os testes estatísticos mostraram que *Campylopus surinamensis* em qualquer uma das concentrações analisadas não produz efeito inseticida sobre as lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*, entretanto, devido sua ação fagodeterrente, são plantas adequadas para o controle deste inseto-praga ocorrente nos sistemas agrários. Este é o primeiro trabalho científico a testar a atividade inseticida e/ou fagodeterrente de *Campylopus surinamensis*.

Palavras-chave: Calymperaceae, Extrato de briófitas, Plantas inseticidas, Herbivoria, Praga do milho.

3. Insecticide and antifeedant activity of *Campylopus surinamensis* (Müll.) Hal. (Bryophyta) on fall armyworm of corn, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT

Bryophytes contain secondary metabolites with characteristic aromas, bitter taste and pungency, which can be used to control insects. Are suitable plants for screening of natural substances that can be used as part of an Integrated Pest Management (IPM) system. In this work was evaluated the insecticidal activity by ingestion and/or antifeedant effect of the ethanol extract of the moss *Campylopus surinamensis*, to control *Spodoptera frugiperda*. Five treatments were tested (2.0, 1.0, 0.5 and 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and the control) using the method of valuation with no-choice tests. It was observed the antifeedant effect and mortality after 24, 48 and 72 hours after application of the plant extract. There was antifeedant activity of the extract at concentrations of 2.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ after 24 hours of contact, with no significant difference between the treatments. Statistical tests showed that *C. surinamensis* in any of the analyzed concentrations produces no insecticidal effect on larvae in 3rd instar of *S. frugiperda*, however, due its antifeedant activity, are suitable plants for the control of this insect pest occurring in agricultural systems. This is the first scientific work to test the insecticide and/or antifeedant activity of *C. surinamensis*.

Keywords: Calymperaceae, bryophytes extract, insecticide plants, herbivory, pest of corn.

3.1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada praga-chave da cultura do milho e seu dano pode levar à redução de até 60% no rendimento de grãos, dependendo principalmente do estágio da cultura e do ínstar da lagarta (Cruz et al., 1999, 2009; Busato et al, 2002). Seu controle demanda elevado número de aplicações de inseticidas sintéticos, o que agrava o problema de resistência da praga a esses produtos, presença de altos níveis de resíduos tóxicos nos alimentos, desequilíbrio biológico e contaminações ambientais (Cruz, 1995).

Pesquisas com plantas são realizadas basicamente com dois objetivos: descoberta de novas moléculas que permitam a obtenção de novos inseticidas sintéticos e/ou obtenção de inseticidas botânicos naturais para o uso direto no controle de pragas (Vendramim; Castiglioni, 2000). Dessa forma, os inseticidas naturais têm sido cada vez mais requisitados, apresentando inúmeras vantagens quando comparados ao emprego de inseticidas sintéticos, pois são obtidos de recursos renováveis e não são persistentes, ou seja, degradam-se com maior velocidade que os sintéticos, não deixando resíduos nos alimentos e no meio ambiente (Vieira et al., 2001).

Briófitas normalmente crescem em *habitats* úmidos, coexistem com fungos apodrecidos, insetos, lesmas e outros predadores de plantas sem sofrer efeitos adversos (Asakawa et al., 1988, Glime, 2006). Isto sugere uma alta estabilidade e uma grande ação dos compostos de defesa que estas plantas produzem (Asakawa et al. 1980; Dvidson e Longton, 1987).

São plantas adequadas para pesquisa de substâncias naturais e promissoras como parte de um sistema de Manejo Integrado de Pragas (MIP), uma vez que muitos estudos têm demonstrado que briófitas contêm compostos com atividades inseticida, fagodeterrente, antimicrobiana, antifúngica e outras (Asakawa, 1995; 1990; Ande et al., 2010; Labbe' et al., 2005; Markham et al., 2006; Pinheiro et al., 1989; Vidal et al., 2012).

Os estudos bio-direcionados testando a atividade inseticida e/ou fagodeterrente das briófitas, são em sua maioria, bioensaios com lagartas, sobretudo as larvas de *Spodoptera* Guenée, usando-se tanto musgos quanto hepáticas (Asakawa et al., 1980; Labbe' et al., 2005; Wada e Munakata, 1971; Markham et al., 2006).

A atividade inibitória do sesquiterpenóide, pinguison, isolado da hepática *Aneura pinguis* (L.) Dumort foi testada sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. por Wada e Munakata (1971). Enquanto que, Labbe' et al. (2005), testaram nesta mesma espécie de lepdóptero, a atividade *antifeedant* de quatro ésteres (2-phenylethyl benzoate, 2-phenylethyl *cis*-cinnamate, 2-phenylethyl *trans*-cinnamate e isotachin B), isolados da hepática *Balantiopsis cancellata* (Nees) Steph. Nesta mesma linha de pesquisa, Asakawa et al. (1980) avaliaram quatro espécies de *Plagiochila* (Dumort) Dumort no controle de *Spodoptera exempta* (Walker) e Markham et al. (2006), testaram seis musgos de *Ceratodon* Brid., *Bryum* Hedw., *Fissidens* Hedw. e *Sphagnum* L. em *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Todos estes trabalhos revelaram respostas positivas das briófitas para atividade fagodeterrente.

Campylopus surinamensis, é um musgo pertencente à família Dicranaceae, cosmopolita e amplamente distribuído em todas as regiões brasileiras (Costa, 2014), o que facilita sua obtenção. Habitam principalmente locais expostos ao sol, sendo comum em mata secundária de terra firme, campinas amazônicas e também em savanas arenosas e ocorrem sobre substrato corticícola e solos arenosos (Frahm, 1991; Lisboa, 1993; Santos e Lisboa, 2008). Além disso, também já foram desenvolvidas pesquisas sobre compostos biologicamente ativos envolvendo outras espécies de musgos da mesma família (Basile et al. 1999; Veljic et al. 2008). Para esta espécie, não existem registros experimentais de suas possíveis atividades biológicas, entretanto, Asakawa (1995) relata compostos secundários importantes e promissores para Dicranaceae. Por estes motivos, decidiu-se iniciar um estudo da atividade inseticida e/ou fagodeterrente desta espécie.

Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade inseticida por ingestão e/ou fagodeterrente (*antifeedant*) do extrato etanólico de *C. surinamensis* sobre a lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda* de 3º instar.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 SELEÇÃO, COLETA E TRIAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO.

Foi selecionada, para condução dos bioensaios, a espécie *C. surinamensis*, frequente em seus substratos e bem visíveis, de ampla ocorrência em toda a região amazônica com fácil adaptação a diferentes condições ambientais (Costa, 2014; Lisboa 1993; Santos e Lisboa, 2008).

Aproximadamente 100g de material botânico fresco foi coletado 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), em ecossistema de floresta de igapó, sobre o solo, utilizando-se das técnicas de coleta de Yano (1989). As amostras foram lavadas, separadas e identificadas pelo autor do presente estudo, que é especialista em briófitas, seguindo as técnicas usuais para o grupo com auxílio de literatura especializada (Crum e Anderson, 1981; Florschütz, 1964; Frahm, 1991; Lisboa, 1993). A classificação taxonômica adotada foi a de Goffinet et al. (2008) e as exsiccatas encontram-se depositado no Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Pará, Brasil.

O material botânico depois de separado e identificado foi lavado, desidratado ao sol e conservado em ambiente refrigerado. Como este grupo de plantas pode ocorrer em tufos, tapetes ou moitas (Richards, 1984), reunindo espécies de diferentes gêneros foi feita a separação minuciosa apenas dos espécimes do musgo selecionado para o estudo, com auxílio de pinça (Flume 5) e estereomicroscópio (Leica, Wild M3Z), incluindo-se a planta inteira (gametófito e esporófito). Todo esse procedimento foi conduzido no Laboratório de Briologia do Museu Paraense Emílio Goeldi.

3.2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

As análises foram realizadas no Laboratório Central de Extração Química da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde a amostra seca de *C. surinamensis* foi pesada (30 g) em balança de precisão (Shimadzo, modelo AY220). Este peso de material desidratado não é padrão, entretanto foi o suficiente para a obtenção da quantidade de extrato desejada para o experimento. Posteriormente, o material foi triturado em liquidificador, transferido para um Erlenmeyer, no qual foi adicionado etanol PA (600ml), cobrindo todo o material vegetal e vedado com folha de alumínio, de acordo com metodologia bastante usual na indústria farmacêutica.

O processo consistiu em um período de seis dias, realizando-se três extrações por maceração a frio (Remaceração), à temperatura ambiente (25 a 30° C), com etanol PA, onde a cada dois dias, o material foi filtrado a vácuo e remacerado, renovando-se apenas o líquido extrator, para assegurar que o maior número de substâncias fosse extraído desta matriz vegetal. 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., 2007).

O teor extrativo foi determinado pela massa seca de 556 mg de extrato de *C. surinamensis* para realização dos experimentos.

3.2.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES

O extrato etanólico da planta foi diluído em dimetil sulfóxido (DMSO). Foi preparada uma solução estoque, utilizando-se a concentração (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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Markham et al., 2006, adaptado). Para o grupo controle foi usado DMSO diluído em água.

3.2.4 CRIAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*

As lagartas foram coletadas inicialmente em uma área de cultivo de milho anexa ao Setor 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. Posteriormente, foram colocadas em caixa gerbox plásticas transparentes de 12 x 12 x 3cm, contendo folhas de milho (dieta natural) para obtenção da colônia inicial das larvas. O período médio de duração das fases de ovo, larva, pupa e de adulto é em torno de 3, 25, 11 e 12 dias, respectivamente (LEIDERMAN e SAUER, 1953).

A criação 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, estas, foram transferidas para novas caixas gerbox limpas e com papel filtro umedecido no fundo para não desidratarem. As mariposas emergidas foram acondicionadas em gaiolas de tubo de PVC (cloreto de polivinila) de 30cm de diâmetro, por 40cm de altura, revestido internamente com papel de filtro para postura. A alimentação das mariposas foi realizada com solução de mel a 10%, embebidas em pedaços de algodão, sendo renovada 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 foram transferidas com pincel para gaiolas feitas de garrafas Pets (Maia et al., 2004), adaptadas para lagartas. Após o primeiro ínstar (Recém-nascidas, em média 1,81mm) as lagartas foram colocadas em copos descartáveis contendo a dieta artificial de Bowling (1967).

3.2.5 EXPERIMENTO: TESTE POR INGESTÃO SEM CHANCE DE ESCOLHA

Foram utilizadas para os bioensaios 25 lagartas de 3º instar, entre 10 e 12 dias de vida. Este instar foi selecionado, devido ao fato de que, no início da fase larval as lagartas têm preferência alimentar pelas folhas jovens da planta e o aumento da população ainda pode ser controlado (Harrison, 1984; Hoy e Shelton, 1987). Após o seu desenvolvimento larval, as lagartas infestam a cultura e se instalam nas folhas do cartucho, perfuram a base da planta, danificam a espiga, causando danos severos a plantação (Parra et al. 1995; Gassen, 1996). Além disso, é importante considerar que, em geral, as lagartas têm mais sensibilidade aos compostos secundários nos instares iniciais diminuindo conforme o desenvolvimento larval avança (Bellonda e Zucoloto, 2009).

As seções foliares, usadas no experimento, foram obtidas a partir do cultivo de parcelas de milho, seguindo as recomendações usuais para cultura em relação à adubação e tratos culturais.

O método utilizado para avaliar a viabilidade larval de *S. frugiperda* submetida a diferentes concentrações dos extratos etanólicos brutos de *C. surinamensis* foi fundamentado em Borgoni e Vendramim (2005); Markham et al. (2006) e Labbe' et al. (2005), com adaptações.

Aplicaram-se cinco tratamentos (2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/ µl e o controle com DMSO diluído em água). Estas concentrações foram fundamentadas em trabalhos realizados com extratos de briófitas no controle de insetos, incluindo a ordem Lepidoptera e a espécie *S. frugiperda*. (Markham et al, 2006; Labbe' et al. 2005; Wada e Munakata, 197; e outros).

As seções foliares de milho foram cortadas com um perfurador tipo scrapbook, obtendo-se discos de 2,3 cm de diâmetro. Os discos foliares foram pipetados com uma porção de 50 µl dos respectivos tratamentos. Após a evaporação do solvente, as folhas foram transferidas para placas de Petri, previamente forradas com discos de papel de filtro de 10 cm de diâmetro, as quais receberam uma lagarta, cada. As placas de Petri foram mantidas úmidas durante todo o experimento para preservar a turgescência dos discos foliares.

3.2.5.1 Delineamento experimental

Foi utilizado o inteiramente casualizado com os cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição composta por uma larva de 3º instar (Figura 1).

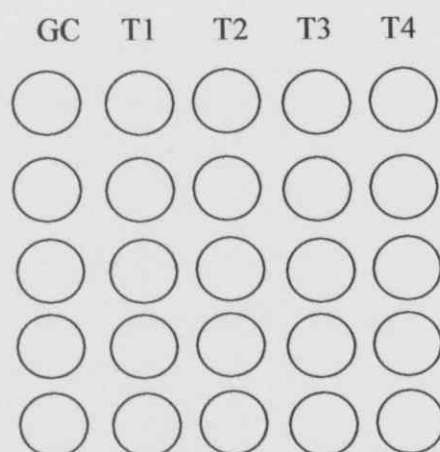


Figura 1. Croqui do teste por ingestão sem chance de escolha com *S. frugiperda* tratado com extrato de *C. surinamensis*. **GC**. Grupo Controle; **T1**. Tratamento com 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **T2**. Tratamento com 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **T3**. Tratamento com 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **T4**. Tratamento com 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.2.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os elementos avaliados foram o consumo alimentar/fagodeterrência 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 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 foram unilaterais, com um nível de confiança de $\alpha = 0,05$.

Pressupondo que o número de lagartas mortas nos tratamentos seria 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, para verificar 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).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 FAGODETERRÊNCIA

3.3.1.1 Após 24 horas

Considerando a soma dos escores de consumo foram observadas diferenças entre os tratamentos e o grupo controle (Figura 2). Tal fato também foi comprovado após a aplicação do teste U, o qual apresentou diferenças entre os tratamentos e o controle (Tabela 1).

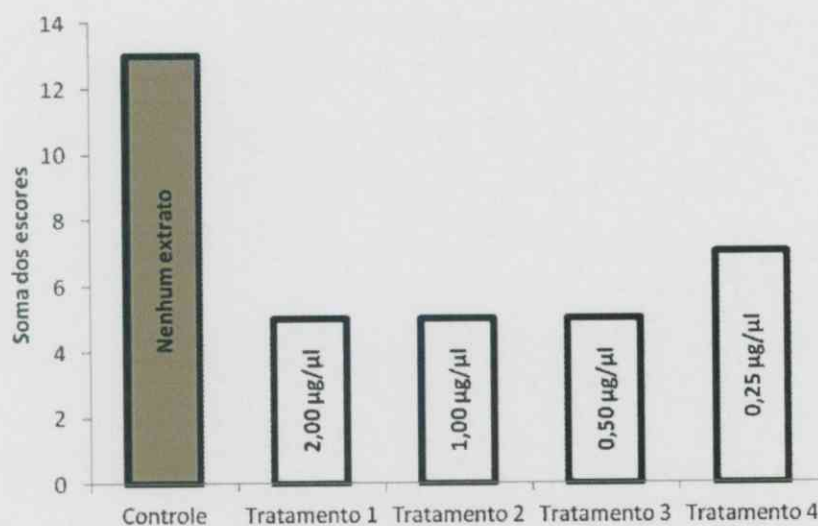


Figura 2. Soma dos escores de consumo de *S. frugiperda* em 3º instar, ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. surinamensis*. Resultados após 24 horas de aplicação dos tratamentos.

Tabela 1. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. surinamensis* x fagodeterência de *S. frugiperda* de 3º instar. Teste realizado após 24 horas, comparando-se o grupo controle e cada um dos tratamentos.

	Grupo Controle vs. T1 (2,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T2 (1,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T3 (0,50 µg/µl)	Grupo Controle vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	2,0889	2,0889	2,0889	1,5667
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0184	0,0184	0,0184	0,0586

De acordo com a tabela 1, observam-se diferenças significativas entre o Grupo Controle e os Tratamentos 1, 2 e 3 (p-valor=0,0184) sendo aceita a hipótese de que os escores de consumo das lagartas destes grupos são menores que os escores do Grupo Controle depois de 24 horas de contato das lagartas no 3º instar com o alimento indicando uma ação fagodeterrente de extratos de *C. surinamensis* nas concentrações de 2,00; 1,00 e 0,50 µg/µl.

A fagodeterência nestas concentrações também foi comprovada por Markham et al. (2006), que avaliaram os efeitos defensivos de dezessete espécies de samambaias e seis musgos sobre *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera) (lagarta-da-espiga) de 2º instar e *S. frugiperda* (lagarta-do-cartucho do milho) de 5º instar em soja. Estes autores testaram as concentrações (0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,4 e 2,1 µg/µl), para cada espécie, com observações de 24, 48, e 72 horas. Destas, a concentração 2,1 µg/µl do musgo *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid causou a maior redução de danos nos discos das folhas de soja utilizadas nos ensaios, à partir de 24 horas de contato dos discos foliares com as lagartas. Isto confirma a ação fagodeterrente para *C. surinamensis* neste estudo, onde as suas concentrações ativas (2,00 µg/µl; 1,00 µg/µl e 0,50 µg/µl), assemelham-se com as da espécie de *C. purpureus*, sob o mesmo período em horas.

Todavia o grupo que recebeu o tratamento 4 não apresentou diferenças significativas (p-valor= 0,05) em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 2. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. surinamensis* x herbivoria de *S. frugiperda* de 3º instar. Teste realizado após 24 horas, comparando-se os tratamentos entre si, tomados dois a dois.

	T1 (2,00 µg/µl) vs. T2 (1,00 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T3 (0,50 µg/µl) vs. T4 (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

Também não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, como mostram os resultados do Teste U, aplicado aos tratamentos tomados dois a dois expostos na Tabela 2. Portanto, nesta análise não houve nenhuma concentração de extrato mais eficiente que a outra em promover uma ação fagodeterrente.

3.3.1.2 Após 48 horas

Após 48 horas, todos os tratamentos apresentaram menores escores de consumo alimentar (Figura 3), sendo significativamente menores (p-valor = 0,0045 para os tratamentos 1, 2 e 3; p-valor = 0,0141 para o tratamento 4) em comparação aos do grupo controle (Tabela 3). Estes resultados evidenciaram ainda mais a ação fagodeterrente de extratos de *C. surinamensis* em lagartas do milho no 3º instar para as respectivas concentrações (2,00 µg/µl; 1,00 µg/µl e 0,50 µg/µl), uma vez já constatada a inibição alimentar após 24 horas de contato das lagartas com o alimento.

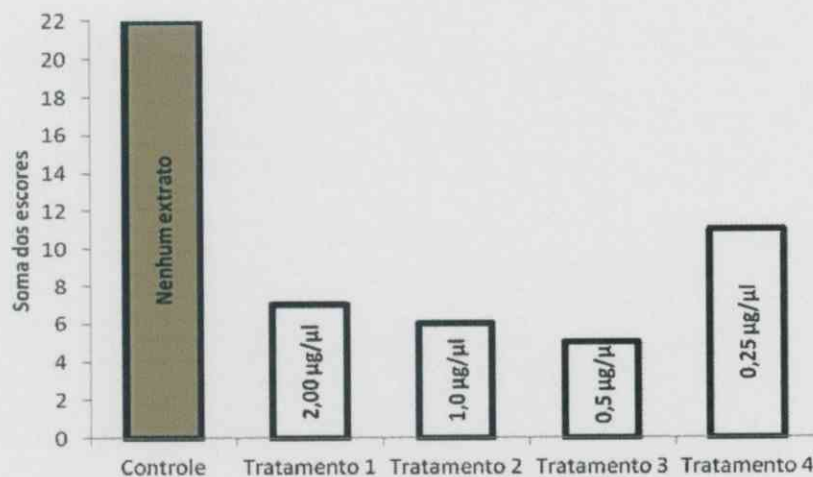


Figura 3. Soma dos escores de consumo de *S. frugiperda* em 3º instar, ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. surinamensis*. Resultados após 48 horas de aplicação.

Tabela 3. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. surinamensis* x herbivoria de *S. frugiperda* de 3º instar. Teste realizado após 48 horas, comparando-se o grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo Controle vs. T1 (2,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T2 (1,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T3 (0,50 µg/µl)	Grupo Controle vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	2,6112	2,6112	2,6112	2,1934
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0045	0,0045	0,0045	0,0141

Na análise de significância entre os tratamentos não foi observado diferenças significativas entre quaisquer deles (Tabela 4).

Tabela 4. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. surinamensis* x herbivoria de *S. frugiperda* de 3º instar. Teste realizado após 48 horas, comparando-se os tratamentos entre si, tomados dois a dois.

	T1 (2,00 µg/µl) vs. T2 (1,00 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T3 (0,50 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	0,5222	1,0445	0,9400	0,5222	1,2534	1,5667
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,3008	0,1481	0,1736	0,3008	0,1050	0,0586

3.3.1.3 Após 72 horas

Constatada a ação fagodeterente em todos os tratamentos até 48 horas, os mesmos valores significativos também foram observados após 72 horas de contato das

lagartas com o alimento. Portanto, as diferenças significativas se repetem (p -valor = 0,0045 para os tratamentos 1, 2 e 3), em relação ao grupo controle. Com valor menor ainda (p -valor = 0,0045) para o tratamento 4 (Tabela 5). Além de todos os tratamentos também terem apresentado menores escores de consumo alimentar (Figura 4).

Tabela 5. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. surinamensis* x herbivoria de *S. frugiperda* em 3º instar. Teste realizado após 72 horas, comparando-se o grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo Controle vs. T1 (2,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T2 (1,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T3 (0,50 µg/µl)	Grupo Controle vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	2,6112	2,6112	2,6112	2,6112
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0045	0,0045	0,0045	0,0045

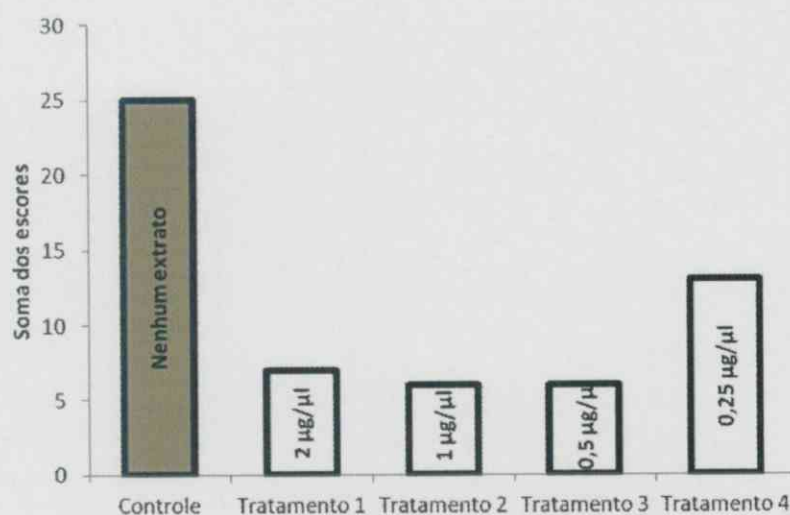


Figura 4. Soma dos escores de consumo de *S. frugiperda* de 3º instar, ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. surinamensis*. Resultados após 72 horas de aplicação.

A comparação de consumo alimentar das lagartas foi realizada de maneira simultânea para as diferentes concentrações de extrato de *C. surinamensis* (Figura 5), agrupando-se os resultados medidos após 24, 48 e 72 horas de contato das lagartas com o alimento.

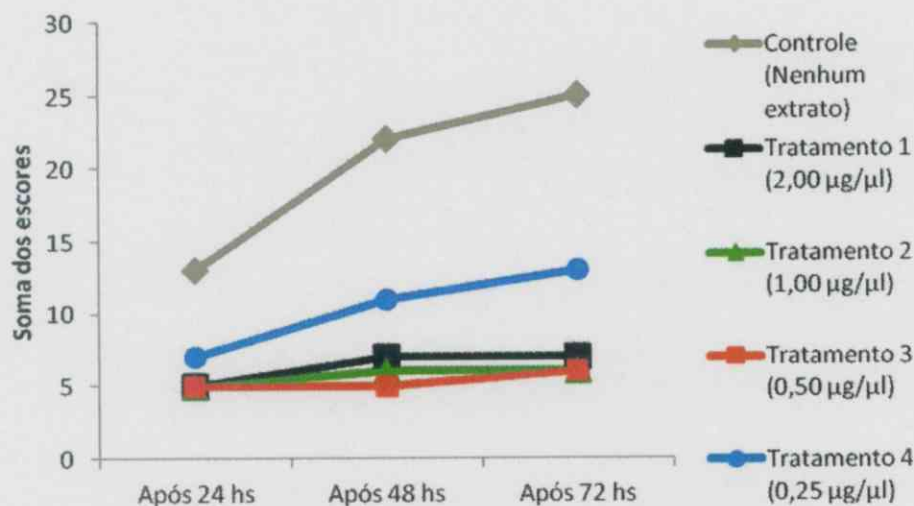


Figura 5. Evolução da soma dos escores de herbivoria x tratamentos de *S. frugiperda* ao longo de três dias de observação.

Observou-se que as diferenças de consumo entre os grupos de lagartas, que receberam seus respectivos tratamentos, e o grupo controle são maiores. Além do mais, os grupos que se alimentaram de folhas de milho com concentrações de extrato de 2,00; 1,00 e 0,50 µg/µl apresentaram diferenças mínimas entre os escores, indicando que estas três concentrações têm aproximadamente a mesma eficiência em promover uma ação fagodeterrente sobre *S. frugiperda* de 3º ínstar.

Constituintes químicos identificados em *C. surinamenses* (Santos et al., in prep.), são relatados em literatura (Adedeji et al., 2012; Alam, 2012; Asakawa, 2007; Fatoba et al., 2003; Sabovljevic M. et al., 2001), como detentores de aromas, intenso sabor amargo ou pungente, o que evidencia a sua utilização no controle de insetos.

Santos et al., (in prep.), ao estudarem a composição química volátil de *C. surinamensis*, identificaram quantidades significativas de ésteres, incluindo os do tipo benzenóicos. Labbe' et al., (2005), ao testarem ésteres benzenóicos isolados da hepática *Balantiopsis cancellata* (Nees) Steph. (Balantiopsidaceae), no controle da fagodeterência sobre *Spodoptera littoralis* Boisdu no 5º ínstar, obtiveram resposta positiva contra a referida espécie-praga. Os resultados deste trabalho corroboram com os encontrados no estudo dos autores supracitados, considerando-se a eficácia dos constituintes químicos encontrados nestas espécies de briófitas para a fagodeterência sobre *Spodoptera*.

3.3.2 MORTALIDADE

3.3.2.1 Após 24 horas

Na repetição 1 do tratamento 3, observou-se a mortalidade de apenas uma lagarta. A Tabela 5 demonstra que o grupo que recebeu o Tratamento 3 foi o único que apresentou diferenças em relação ao grupo controle e também aos demais. Entretanto, o número de mortes no Grupo Controle e no grupo que recebeu o Tratamento 3 são estatisticamente iguais (p-valor (Tocher) = 0,5000). Portanto, após 24 horas, nenhuma das concentrações de *C. surinamensis* apresentou ação inseticida significativa e não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 6. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 3, de extratos da espécie *C. surinamensis*, com lagartas do milho no 3º instar, realizado após 24 horas.

	Grupo Controle Nenhum extrato	T1 2,00 µg/µl	T2 1,00 µg/µ	T3 0,50 µg/µl	T4 0,25 µg/µl	Total
Viva	5	5	5	4	5	24
Morta	0	0	0	1	0	1
Total	5	5	5	5	5	25
p-valor (Fisher) = 0,5000						
p-valor (Tocher) = 0,5000						

3.3.2.2 Após 48 horas

O Teste de Fisher comparou os resultados do Grupo Controle com os dos Tratamentos 1 e 2 (Tabela 7) e em seguida com o Tratamento 3 e 4 (Tabela 8). Não foram observadas diferenças significativas entre os números de lagartas vivas ou mortas entre o Grupo Controle e os tratamentos.

Tabela 7. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamentos 1 e 2, de extratos da espécie *C. surinamensis*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 48 horas

	Grupo Controle Nenhum extrato	T1 2,00 µg/µl	T2 1,00 µg/µ	Total
Viva	5	3	3	11
Morta	0	2	2	4
Total	5	5	5	15
p-valor (Fisher) = 0,2222				
p-valor (Tocher) = 0,2222				

Tabela 8. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 3, de extratos da espécie *C. surinamensis*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 48 horas.

	Grupo Controle Nenhum extrato	T3 0,50 µg/µl	T4 0,25 µg/µ	Total
Viva	5	4	5	14
Morta	0	1	0	1
Total	5	5	5	15
p-valor (Fisher) = 0,5000				
p-valor (Tocher) = 0,5000				

Para os tratamentos 1 e 2 (Tabela 7), onde os grupos receberam as concentrações de 2,00 e 1,00 µg/µl de extrato da espécie *C. surinamensis*, foram observadas duas lagartas mortas, cada, enquanto que o grupo controle não apresentou nenhuma. Entretanto, não houve diferenças significativas quando comparados os números de lagartas vivas ou mortas entre o grupo controle e os respectivos tratamentos (p-valor Fisher e Tocher= 0,222).

Apesar de registradas uma morte (Tabela 8) verificou-se que o número de mortes no Grupo Controle e no grupo que recebeu o Tratamento 3, foram estatisticamente iguais (p-valor Fisher e Tocher = 0,5000).

Portanto, após 48 horas, nenhuma das concentrações utilizadas teve uma ação inseticida significativa.

3.3.2.3 Após 72 horas

Os grupos que receberam os Tratamentos 2 e 3 apresentaram as maiores diferenças para o número de lagartas mortas em relação ao Grupo Controle. Os Tratamentos 1 e 4 também possuem diferenças nos resultados (Tabela 9 e 10). E ainda assim, estatisticamente não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 9. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 2 ou 3, de extratos da espécie *C. surinamensis*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 72 horas.

	Grupo Controle Nenhum extrato	T2 1,00 µg/µl	T3 0,50 µg/µ	Total
Viva	5	2	2	9
Morta	0	3	3	6
Total	5	5	5	15
p-valor (Fisher) = 0,0833				
p-valor (Tocher) = 0,0833				

Tabela 10. Número de lagartas vivas e mortas observadas para os Tratamentos 2 ou 3 e Tratamentos 1 ou 4, de extratos da espécie *C. surinamensis*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 72 horas.

	T2 ou T3 1,00 ou 0,50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	T1 ou T4 2,00 ou 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Total
Viva	2	3	5
Morta	3	2	5
Total	5	5	10
p-valor (Fisher)	0,5000		
p-valor (Tocher)	0,1032		

A Figura 6 mostra que em todos os tratamentos houve mortalidade entre as lagartas. Após 48 horas, nos grupos que receberam os Tratamentos 1 e 2, já haviam 40% de lagartas mortas. Esta proporção chegou a 60% nos grupos que receberam os Tratamentos 2 e 3. Entretanto, o teste de Fisher não encontrou diferenças significativas entre os tratamentos, fato que permite concluir que extratos de *C. surinamensis* em concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ não produzem efeito inseticida sobre as lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*.

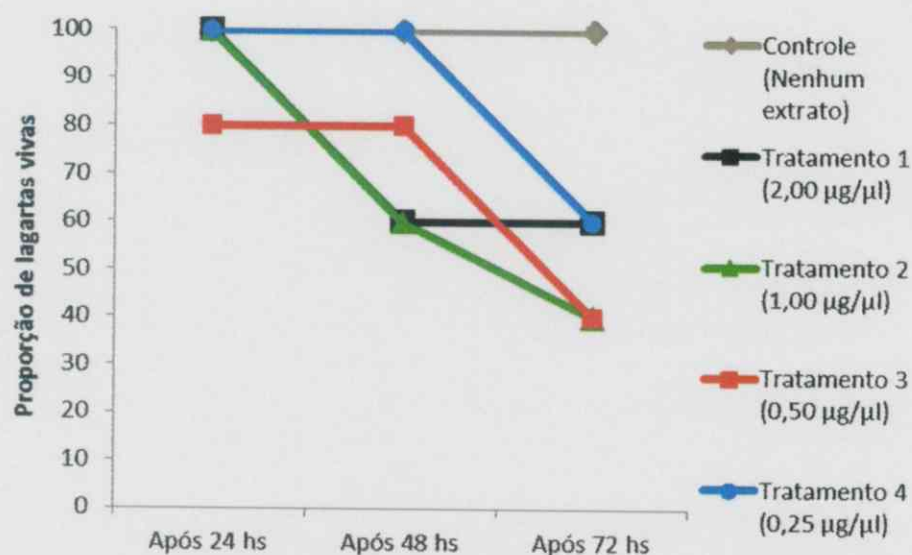


Figura 6. Evolução da soma dos escores de efeito inseticida x tratamentos de *S. frugiperda* ao longo de três dias de observação.

Markham et al. (2006), testou concentrações semelhantes as estudadas neste trabalho em seis musgos ocorrentes na Carolina do Norte (EUA) e verificou uma

expressiva mortalidade de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera) (lagarta-da-espiga) no 2º ístar, após 48 horas da aplicação do extrato do musgo *C. purpureus*, nas concentrações de 0,9 e 2,1 µg/µL. Estes resultados diferem dos encontrados para o estudo em questão, apesar da ocorrência de 40% a 60% de lagartas mortas até 72 horas, para tratamentos próximos aos estudados pelos autores supracitados (2,00; 1,00; 0,50 µg/µl), porém, sem valor sigficativo para mortalidade. Com base nos dados estatísticos a ação inseticida de *C. surinamensis* para *S. frugiperda* de 3º ístar, pode ocorrer significativamente com a aplicação de extratos com maiores concentrações.

Apesar de não ocorrerem diferenças significativas sobre a mortalidade das larvas de *S. frugiperda* quando da aplicação dos extratos de *C. surinamensis*, os resultados confirmam a existência de princípios ativos em seus compostos secundários para fagodeterência, uma vez que houve inibição da alimentação e observação de morte das lagartas. Assim, os resultados sugerem esta espécie de briófita como importante fonte de princípios ativos para o controle da lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda* ocorrente nos sistemas agrários, entretanto, há necessidades de outros estudos utilizando-se diferentes fases de *S. frugiperda*, a fim de dar maior segurança a sua aplicabilidade. O presente estudo representa o primeiro trabalho científico a testar a atividade inseticida e/ou fagodeterrente de *Campylopus surinamensis*.

REFERÊNCIAS

- Adediji, 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
- Alam, A. (2012). Some Indian bryophytes known for their biologically active compounds. *IJA BPT*. 3: 239 – 246.
- 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. (1990). Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In *Bryophytes: Their Chemistry and Chemical Taxonomy* (Eds H. D. Zinsmeister, and R. Mues), Clarendon Press: Oxford, U.K. 369-410.
- Asakawa, Y. (1995). Chemical constituents of the bryophytes. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Eds. W. Herz, W.B. Kirby, R.E. Moore, W. Steglich, and C. Tamm). Springer, Vienna. 1-618.
- Asakawa, Y. (2007). Biologically active compounds from Bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, 79: 57–580.
- Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., Kubo, I. and K. Nakanishi (1980). Insect antifeedant secoaromadendrane-type sesquiterpenes from *Plagiochila* species. *Phytochemistry*, 9, 2147-2154.
- 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., Woodcock, C.M., Woodcock, and Z. Zhong-Ning (1988). Activity of drimane antifeedants and related compounds against aphids, and comparative biological effects and chemical reactivity of (-)- and (+)- polygodial. *J. chem. ecol.*, 14, 1845-1855.
- Basile, A., Giordano S., López- Sáez, J. A. and R. C. Cobianchi (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479–1482
- 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. Access in January 2013.

- Bellonda, H. C. H. B. and F. Zucoloto (2009). In: Panizzi, A. R. and Parra, J. R. Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica. **11**, p.425-464.
- 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.
- Busato G. R., Grützmacher, A. D., Garcia, M. S., Giolo, F. P. and A. F. M. Busato (2002). 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.
- Costa DP (2014). Briófitas. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128472>). Access in July 2014.
- Crum, H.A. and L. E Anderson (1981). *Mosses of Eastern North America*, **1 e 2**. New York, Columbia University Press, 1-1328.
- Cruz, I. (1995). A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. *Embrapa-CNPMS Circular Técnica*, **21**, 1- 45, Sete Lagoas.
- Cruz, I., M. L. C., Figueiredo and M. J. Matoso (1999). Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. *Embrapa-CNPMS, Circular Técnica*, **30**, 1- 40, Sete Lagoas.
- Cruz, I., P.A. Viana and J.M. Waquil (2009). Pragas: pragas da fase vegetativa e reprodutiva. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_5ed/prvegetativa.htm. Greene, G.L., N.C. Lepla & W.A. Deckerson, Access in August 2014.
- Davidson, A. J. and R. E. Longton (1987). Acceptability of mosses as food for a herbivore, the slug, *Arion hortensis* Symp. *Biol. Hung.* **35**, 707-719.
- Fatoba, P.O, Omojasola, P. F, Awe, S., and F. G. Ahmed (2003). Phytochemical Screening of Some Selected Tropical African Mosses. *NISEB Journal* **3**: 49-52.
- Florschütz, P. A.(1964) The Mosses of Suriname. Musci Part I. In: *Flora of Suriname*. (Ed. Lanjouw, J). Leiden, Brill, 1-271.

- Frahm, J.P. (1991). *Dicranaceae: Campylopodoideae, Paraleucobryoideae. Flora Neotropica. Monograph 54*. New York, Botanical Garden. 1-238.
- Gassen, D. (1996). *Manejo de Pragas associadas à cultura do milho*. Passo Fundo: Aldeia Norte, 127p.
- Glime J. M. (2006). Bryophytes and herbivory. *Cryptogam, Bryol*, **27**, 191–203.
- 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.
- 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.
- Hoy, C. W. and, A. M. Shelton (1987). Feeding response of *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to cabbage leaf age. *Environmental Entomology*, v. 16, p. 680-682.
- 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.
- Leiderman, L. M. and Sauer, H. F. G. (1953). A lagarta dos milharais. *O Biólogo*. (S. I.), v.19, n.6, p. 105-113.
- Lisboa, R. C. L.(1993). *Musgos Acrocárpicos do Estado de Rondônia*. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke. 1-272 .
- 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.
- Parra, J. R. P., Zucchi, R. A. and J. R. S. Lopes (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.

- Pinheiro S. 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.
- Sabovljevic, M., Bijelovic, A. and D. Grubisic (2001). Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lekovite Sirovine* **21**: 17-29.
- Santos, R. C. P and Lisboa, R. C. L. (2008). Musgos (Bryophyta) da Microrregião do Salgado Paraense e sua utilização como possíveis indicadores de ambientes perturbados. *Rodriguésia* **59**, 361- 368.
- Santos, R. C. P, Moraes, E. N. R., Zoghbi, M. das G. B. and E. H. A. Andrade (in prep.): Estudo da composição química de duas espécies de briófitas (Bryophyta) ocorrentes na Amazônia Brasileira. *Revista Brasileira de Farmacognosia*
- 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 (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC.
- 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.
- Veljić, M., Tarbuk, M., Marin, P. D., Ćirić, A., Soković M. and M. Marin (2008). Antimicrobial Activity of Methanol Extracts of Mosses from Serbia. **46**, 871-875.
- Vendramim, J.D., E. Castiglioni (2000). Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas, p.113-128. In: J.C. Guedes, I.D. da Costa, E. Castiglioni. *Bases e técnicas do manejo de insetos*, cap. 8. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, Palloti, 248p.
- Vieira, P. C., Mafezoli, J. and M. W. Biavatti (2001). Inseticidas de origem vegetal. In: *Produtos naturais no controle de insetos* (Eds J. T. B. Ferreira, A. G. Corrêa and P. C. Vieira), 1-176. Ed. da UFSCar, São Carlos.
- 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.

Yano O. (1989). Briófitas. In: *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico* (Eds. O. Fidalgo and V. L. R. Bononi), 27-30. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo.

4 ATIVIDADE INSETICIDA E FAGODETERRENTE DE *Calymperes lonchophyllum* SCHWÄGR. (BRYOPHYTA) SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO DO MILHO *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

As substâncias produzidas por plantas através de metabolismo secundário podem apresentar atividades biológicas diversas e algumas podem ser de interesse para aplicações em controle de insetos. Além das plantas fanerógamas, as briófitas também podem ser utilizadas para este fim, uma vez que possuem em sua composição química importantes metabólitos secundários do tipo terpenóides, compostos aromáticos, derivados dos ácidos graxos e muitos outros. A lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) foi selecionada para este estudo por ser uma praga chave na cultura do milho e também pelas positivas evidências em pesquisas científicas quanto à atividade inseticida e/ou fagodeterrente das briófitas, no controle deste inseto. Este trabalho avaliou a atividade inseticida por ingestão e/ou fagodeterrente (*antifeedant*) do extrato etanólico de *Calymperes lonchophyllum* sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* de 3º instar. Testaram-se cinco tratamentos (2,0%; 1,0%; 0,5% e 0,25% µg/µl e o controle) com cinco repetições, cada repetição contendo uma larva. As avaliações de fagodeterência e mortalidade foram realizadas após 24, 48 e 72 horas da aplicação do extrato vegetal. Após 48 horas de contato das lagartas com os tratamentos 1, 2 e 3 foi constatada uma ação fagodeterrente. Quanto à mortalidade, para se produzir efeito inseticida em lagartas de 3º instar foram necessárias 72 horas de exposição de extrato de *Calymperes lonchophyllum* às concentrações de 2,00 e 1,00µg/µl. Assim, esta espécie de musgo pode ser de grande importância e interesse para o controle de *Spodoptera frugiperda* em plantações de milho. Esta constitui a primeira pesquisa científica para o estudo da atividade inseticida e/ou fagodeterrente de *Calymperes lonchophyllum*.

Palavras-chave: Calymperaceae, Extrato de briófitas, Plantas inseticidas, Herbivoria, Praga do milho.

4. Insecticide and antifeedant activity of *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Bryophyta) on fall armyworm of corn *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT

The substances produced by plants through secondary metabolism can have multiple biological activities and some may be of interest for applications in insect control. Besides of phanerogam plants, bryophytes can also be used for this purpose, since in its chemical composition have important secondary metabolites like terpenoids, aromatic compounds, derivatives of fatty acids and many others. The fall armyworm of corn (*Spodoptera frugiperda*) was selected for this study because it is a key pest in corn crop and also by positive evidence in scientific researches on the insecticidal and/or antifeedant activity of bryophytes in the control of this insect. This study evaluated the insecticidal activity by ingestion and/or antifeedant effect of the ethanol extract of *Calymperes lonchophyllum* on fall armyworm of corn *Spodoptera frugiperda* of 3rd instar. Were tested five treatments (2.0, 1.0, 0.5 and 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and the control) with five replicates, each of them containing one larva. Evaluations of antifeedant effect and mortality were performed after 24, 48 and 72 hours of application of the plant extract. After 48 hours of contact of the caterpillars with the treatments 1, 2 and 3, it was observed an antifeedant activity. Regarding mortality, to produce insecticidal effect on larvae of 3rd instar, were required 72 hours of exposure to the extract of *Calymperes lonchophyllum* at concentrations of 2.00 and 1.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Thus, this moss species can be of great importance and interest for the control of *Spodoptera frugiperda* in corn fields. This is the first scientific research on the study of insecticidal and/or antifeedant activity of *Calymperes lonchophyllum*.

Keywords: Calymperaceae, bryophytes extract, insecticide plants, herbivory, pest of corn.

4.1. INTRODUÇÃO

O principal papel dos metabólitos secundários das plantas é a proteção contra pragas e patógenos. Pode se dizer que a ampla variedade de compostos produzidos pelas plantas é o produto de milhares de anos interagindo com os mais diferentes organismos (Simões et al., 2007). Assim, as plantas com propriedades inseticidas vêm sendo utilizadas pelo homem desde a Idade Antiga, numa prática que persiste até hoje, com mais de 2000 espécies de plantas conhecidas (Viegas-Junior, 2003). No Brasil, a utilização destas formas alternativas de controle de pragas, vem crescendo positivamente em substituição a inseticidas altamente tóxicos ao homem e ao meio ambiente.

Produtos naturais provenientes de plantas pode ser uma alternativa no manejo de pragas, na forma de extratos de plantas cientificamente conhecidas (Guerra, 1985). Estas práticas constituem formas alternativas e baratas que os produtores rurais têm ao seu alcance, para evitar prejuízos na produção e eliminar riscos à saúde de quem trabalha no campo (Souza, 2004; Leão, 1996). A ação destes fitoquímicos nas pragas pode ser por repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases (Roeld, 2001; Saito & Lucchini, 1998).

O milho (*Zea mays* L.) constitui um dos mais importantes alimentos do planeta, entretanto, é atacado severamente pela *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta-do-cartucho do milho (Busato et al., 2002; Cruz et al., 1999). Assim, por se tratar de praga chave na cultura do milho e também pelas evidências dos estudos da atividade inseticida e/ou fagodeterrente das briófitas, revelarem respostas positivas no controle do gênero *Spodoptera* Guenée (Asakawa et al., 1980; Labbe' et al., 2005; Wada e Munakata, 1971; Markham et al., 2006), este lepidóptero foi selecionado para este experimento.

Geralmente, as briófitas não são atacadas por insetos, caracóis, lesmas e outros artrópodes (Asakawa et al., 1988; Davidson e Longton, 1987), pois apresentam uma grande variedade de terpenos lipofílicos, compostos aromáticos, derivados dos ácidos graxos, ésteres e muitos outros (Asakawa 1995). Muitos destes componentes têm aromas característicos, pungência e sabor amargo, além de exibir um extraordinário conjunto de atividades biológicas e propriedades medicinais (Tadesse 2002, Asakawa 2007, 1995). Segundo Asakawa (1990), muitos dos compostos secundários das briófitas, possuem atividade antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, antitumoral, anti-

alergênica, *antifeedant*, inseticida, entre outras (Asakawa, 2007; Frahm e Kirchhoff, 2002; Shen et al., 2010, Vidal et al., 2012).

Na busca por inseticidas naturais obtidos a partir de espécies de briófitas da Amazônia brasileira, relatamos neste trabalho os resultados alcançados em um estudo bio-direcionado de *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. (Calymperaceae), um musgo comumente encontrado sobre troncos vivos ou em decomposição de árvores nativas da Floresta amazônica (Lisboa e Ilkiu-Borges, 2007; Moraes e Lisboa, 2006; Santos e Lisboa, 2008; Tavares, 2009).

Calymperes lonchophyllum já foi testada no estado do Pará, Brasil, quanto aos efeitos antibacterianos de seus extratos (Pinheiro et al. 1989). Porém, para o país não há estudos do potencial dos fitoquímicos das briófitas no controle de insetos-pragas na agricultura (fagodeterrência/inseticida), assim como, não se encontrou literatura relatando esta atividade para esta espécie de musgo. Além disso, *Calymperes afzelii* Sw., pertencente a família Calymperaceae, foi avaliada quanto a sua atividade inseticida contra a broca do caule do milho (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) por Ande et al. (2010), obtendo-se resultados satisfatórios.

Este trabalho avaliou a atividade inseticida por ingestão e/ou fagodeterrente (*antifeedant*) do extrato etanólico de *C. lonchophyllum* sobre a lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda* de 3º instar.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 SELEÇÃO, COLETA E TRIAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO.

Calymperes lonchophyllum foi selecionada, adotando-se o critério de estudos de compostos biologicamente ativos de briófitas, onde a literatura comprova cientificamente o seu efeito antibactericida (Pinheiro et al., 1989). Esta espécie é frequente em seus substratos, de ampla ocorrência em toda a região amazônica, com fácil adaptação a diferentes condições ambientais (Costa, 2014; Lisboa, 1993; Santos e Lisboa, 2003; 2008).

Foram coletadas 100g de material botânico fresco em um fragmento de floresta amazônica no Parque Ecológico do Gunma, município de Santa Bárbara, Pará, (01°13'00.86''S e 48°17'41.18''W), em ecossistema de floresta secundária de terra firme, sobre troncos de árvores vivas, utilizando-se das técnicas de coleta de Yano (1989). As amostras foram lavadas, separadas com auxílio de pinça (Flume 5) e lupa

(Leica, Wild M3Z) e identificadas pelo autor do presente estudo, que é especialista em briófitas, seguindo as técnicas usuais para o grupo com auxílio de literatura especializada (Florschütz, 1964; Lisboa, 1993). Adotou-se a classificação taxonômica de Goffinet et al. (2008) e as exsicatas encontram-se depositadas no Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Pará, Brasil.

Após o processo de separação e identificação da espécie, o material botânico foi lavado, desidratado ao sol e conservado em ambiente refrigerado. Como estas plantas ocorrem geralmente em moitas, tapetes ou tufos reunindo indivíduos de diferentes gêneros ou espécies (Richards, 1984), foram minuciosamente separados apenas espécimes de *C. lonchophyllum*, usando-se a planta inteira (gametófito e esporófito). Todo esse procedimento foi conduzido no Laboratório de Briologia do Museu Emílio Goeldi.

4.2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

As análises foram realizadas no Laboratório Central de Extração Química da Universidade Federal do Pará (UFPA). A amostra seca de *C. lonchophyllum* foi pesada (6 g) em balança de precisão (Shimadzu, modelo AY220) e triturada em pistilo. Este peso de material desidratado não é padrão, entretanto foi o suficiente para a obtenção da quantidade de extrato desejada para o experimento. O processo consistiu em três extrações por maceração a frio (Remaceração), à temperatura ambiente (25 a 30° C), com etanol PA (120ml), de acordo com metodologia bastante usual na indústria farmacêutica.

A cada dois dias, o material era filtrado a vácuo e remacerado, renovando-se apenas o líquido extrator, por um período de seis dias, para assegurar que o maior número de substâncias fosse extraído da matriz vegetal. O extrato bruto (volume obtido de cada etapa foi colocado em um balão volumétrico, concentrado em rotavapor (marca Büchi, modelo R-3), sob pressão reduzida de 45°C ± 1°C (Barbosa 2004; Simões et al. 2007).

O teor extrativo foi determinado pela massa seca de 50 mg de extrato de *C. lonchophyllum*.

4.2.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E CONCENTRAÇÕES

Para realização dos experimentos, o extrato foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) quando do tratamento das larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Foi preparada uma solução estoque, utilizando-se a concentração (20mg/10ml) relação massa do extrato/volume do solvente. A partir desta solução foram preparadas as diluições (tratamentos) nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Markham et al., 2006, adaptado). Para o grupo controle foi usado DMSO diluído em água.

4.2.4 CRIAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*

As lagartas foram coletadas em uma área de cultivo de milho nas proximidades do Setor de Solos da Universidade Federal Rural da Amazônia e também em plantas cultivadas em casa de vegetação. Foram colocadas em caixas gerbox plásticas transparentes de 12 x 12 x 3cm, contendo folhas de milho (dieta natural) para obtenção da colônia inicial das larvas. O período médio de duração das fases de ovo, larva, pupa e adulto é em torno de 3, 25, 11 e 12 dias, respectivamente (Gassem, 1996).

As lagartas foram criadas no Laboratório de Bioecologia de Insetos (LABIN/ICA/UFRA), em ambiente climatizado ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Ao iniciarem a fase de pupa foram transferidas para novas caixas gerbox limpas e com papel filtro umedecido no fundo para manter a umidade. Os adultos (mariposas) foram acondicionados em gaiolas de tubo de PVC (cloreto de polivinila) de 30cm de diâmetro por 40cm de altura, revestidas internamente com papel de filtro para postura. As mariposas eram alimentadas com solução de mel a 10%, embebidas em pedaços de algodão. Os ovos (posturas) foram retirados e acondicionados em caixas gerbox esterilizadas. As larvas recém-eclodidas foram transferidas com pincel para gaiolas feitas de garrafas Pets (Maia et al., 2001), adaptadas para lagartas. Após o primeiro ínstar, as lagartas foram colocadas em copos descartáveis contendo a dieta artificial de Bowling (1967).

4.2.5 EXPERIMENTO: TESTE POR INGESTÃO SEM CHANCE DE ESCOLHA

Para os bioensaios foram utilizadas 25 lagartas de 3º ínstar, entre 10 e 12 dias de vida. Este ínstar foi selecionado, devido ao fato de que, no início da fase larval as lagartas têm preferência alimentar pelas folhas jovens da planta e o aumento da população ainda pode ser controlado (Harrison, 1984; Hoy e Shelton, 1987). Após o seu desenvolvimento larval, as lagartas infestam a cultura e se instalam nas folhas do cartucho, perfuram a base da planta, danificam a espiga, causando danos severos a plantação (Parra et al. 1995; Gassen, 1996). Além disso, é importante considerar que, em geral, as lagartas têm mais sensibilidade aos compostos secundários nos instares

iniciais diminuindo conforme o desenvolvimento larval avança (Bellonda e Zucoloto, 2009).

A viabilidade larval de *S. frugiperda* foi avaliada usando-se diferentes concentrações dos extratos etanólicos brutos de *C. lonchophyllum*, de acordo com Borgoni & Vendramim (2005), Markham et al. (2006) e Labbe' et al. (2005), com adaptações.

Foram aplicados cinco tratamentos (2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e o controle com DMSO diluído em água). Estas concentrações foram fundamentadas em trabalhos realizados com extratos de briófitas no controle de insetos, incluindo a ordem Lepidoptera e a espécie *S. frugiperda*. (Markham et al, 2006, Labbe' et al., 2005 e outros). As seções foliares de milho, usadas no experimento, foram obtidas a partir do cultivo de parcelas de milho, seguindo as recomendações usuais para cultura em relação à adubação e tratos culturais. Foram cortadas com um perfurador tipo scrapbook, obtendo-se discos de 2,3 cm de diâmetro. Foram pipetados 50 μl dos respectivos tratamentos nos discos foliares. As folhas foram transferidas para placas de Petri, previamente forradas com discos de papel de filtro de 10 cm de diâmetro, recebendo uma lagarta, cada. As placas de Petri foram mantidas úmidas durante todo o experimento para preservar a turgescência dos discos foliares.

4.2.5.1 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. Cada repetição foi composta por uma larva de 3º ínstar (Figura 1).

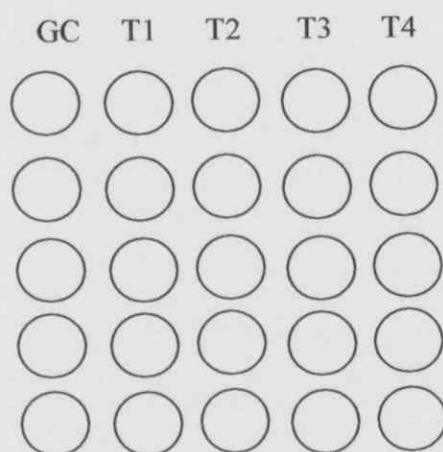


Figura 1. Croqui do teste por ingestão sem chance de escolha com *S. frugiperda* tratado com extrato de *C. lonchophyllum*. GC. Grupo Controle; T1. Tratamento com 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; T2. Tratamento com 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; T3. Tratamento com 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; T4. Tratamento com 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.2.6 ANÁLISE DOS DADOS

Foram analisados o consumo alimentar/fagodeterrência e a mortalidade das lagartas em 24, 48 e 72 horas após a realização do experimento. Para a primeira análise elaborou-se uma escala de dano foliar relativa com escores de 0 a 5 (Markham et al., 2006, adaptado), como uma ferramenta de comparação quantitativa para determinar a porcentagem de consumo de alimento/fagodeterrência 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 e estas foram 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). Este teste avalia 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 $\alpha = 0,05$.

Sendo o número de lagartas mortas nos tratamentos 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). As amostras neste desenho, foram pequenas, recorrendo-se a Modificação de Tocher, a qual verifica a significância de diferenças não tão extremas. Os cálculos de Fischer e Tocher 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

Realizando-se, a princípio, a soma dos escores de alimentação para representar o consumo, a Figura 2 demonstra as diferenças entre o comportamento alimentar dos diferentes grupos de lagartas. Os resultados deste experimento não revelaram grandes

diferenças no comportamento alimentar quando se compara cada um dos grupos com o grupo de controle.

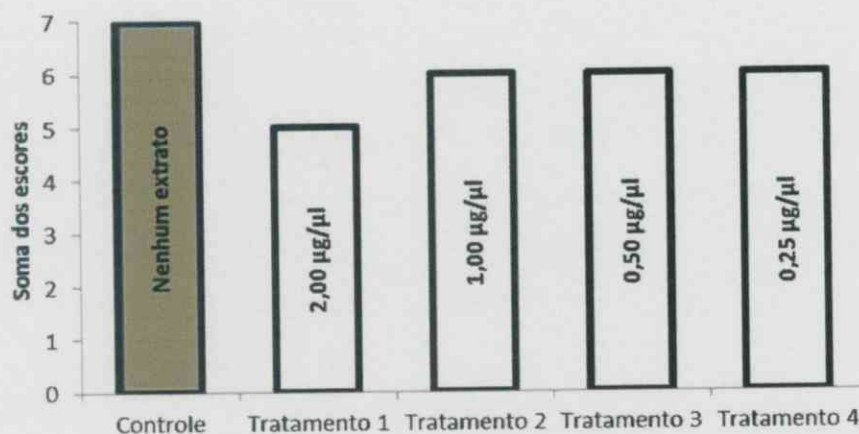


Figura 2. Soma dos escores de consumo das lagartas de *S. frugiperda* de 3º instar, ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. lonchophyllum* após 24 horas de contato.

A constatação da inexistência de diferenças no consumo alimentar após 24 horas é observada quando da aplicação do teste U, segundo o mesmo, não se verifica diferenças significativas entre o Grupo Controle e os Tratamentos 1 (p-valor = 0,1481), 2, 3 e 4 (p-valor = 0,3008). Neste caso, existem evidências de que as diferentes concentrações de extratos de *C. lonchophyllum* não provocam uma fagodeterrência significativa nas lagartas do milho de 3º instar após 24 horas de contato com o alimento (Tabela 1).

Tabela 1. Testes U de Mann-Whitney para extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 24 horas, comparando-se o grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo Controle vs. T1 (2,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T2 (1,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T3 (0,50 µg/µl)	Grupo Controle vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	1,0445	0,5222	0,5222	0,5222
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,1481	0,3008	0,3008	0,3008

Aplicando-se o Teste U às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. lonchophyllum* x herbivoria de *S. frugiperda* de 3º instar, para cada um dos pares de amostras comparadas entre si, constatou-se que também não existem diferenças significativas entre qualquer um destes pares de amostras. Portanto, nesta análise não

houve nenhuma concentração de extrato mais eficiente que a outra em promover uma ação fagodeterrente.

4.3.1.2 Após 48 horas

Verifica-se, através da Figura 3 que, após 48 horas, existem maiores diferenças entre o comportamento alimentar das lagartas nos diferentes grupos.

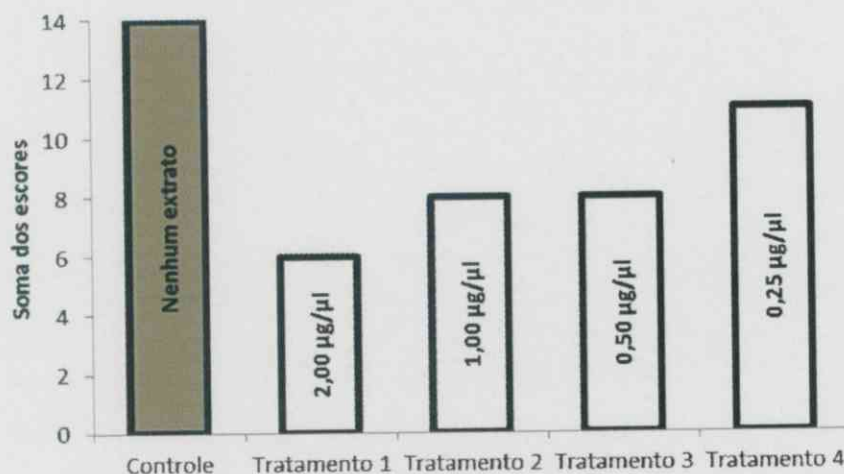


Figura 3. Soma dos escores de consumo das lagartas de *S. frugiperda* de 3º instar, ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. lonchophyllum* após 48 horas de contato.

Após a aplicação do teste U (Tabela 2) observou-se que o Grupo Controle é significativamente maior quando comparado às amostras de cada um dos Tratamentos 1 (P-valor=0,0108), 2 e 3 (P-valor=0,0473), o que permite considerar que houve uma ação fagodeterrente provocada pelas respectivas concentrações (2,00 µg/µl; 1,00 µg/µl e 0,50 µg/µl) de extrato de *C. lonchophyllum* quando a medição do consumo alimentar é feita após 48 horas de contato das lagartas com o alimento.

A ação fagodeterrente também foi confirmada por Wada e Munakata (1971), quando avaliaram a atividade inibitória do sesquiterpeno pinguison, isolado da hepática *Aneura pinguis* (L.) Dumort., sobre *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera), testando as concentrações (0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.63% e 0.031%), sendo as duas maiores (0.5%, 0.25%) similares as estudadas no presente trabalho. Os referidos autores encontraram as melhores respostas para a inibição alimentar na concentração (0.5%). Confirmando assim, a fagodeterência observada no presente estudo para o tratamento 3 (0,50 µg/µl).

Santos et al. (in prep.), ao estudarem a composição química volátil de *Campylopus surinamensis* Müll. Hal. e *C. lonchophyllum* ocorrentes na amazônia brasileira, identificaram em *C. lonchophyllum* compostos secundários do tipo terpenos,

inclusive sesquiterpenos. Considerando-se que a maioria dos terpenos possuem atividades fagodeterrentes (Camarillo et al., 2007; Wada e Munakata, 1971; Asakawa 2007), os resultados do presente estudo corroboram com os descritos pelos autores supracitados.

Tabela 2. Testes U de Mann-Whitney para extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com *S. frugiperda* de 3º instar, realizado após 48 horas, comparando-se o grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo Controle vs. T1 (2,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T2 (1,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T3 (0,50 µg/µl)	Grupo Controle vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	2,2978	1,6711	1,6711	0,9400
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0108	0,0473	0,0473	0,1736

Quanto ao tratamento 4, correspondente à menor concentração de extrato (0,25 µg/µl), o Teste U não indicou diferenças significativas. Entretanto, Wada e Munakata (1971) constataram a ação fagodeterrente para esta mesma concentração (0.25%) de extrato da hepática *A. Pinguis* sobre *S. Litoralis*.

Comparando os tratamentos entre si, o Teste U não indicou diferenças em nenhuma das situações, seja entre os tratamentos 1 e 2, 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4 ou 3 e 4 (Tabela 3).

Tabela 3. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. lonchophyllum* x herbivoria de *S. frugiperda* de 3º instar. Teste realizado após 48 horas, comparando-se os tratamentos entre si, tomados dois a dois.

	T1 (2,00 µg/µl) vs. T2 (1,00 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T3 (0,50 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	0,6267	0,6267	1,1489	0,0000	0,5222	0,5222
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,2654	0,2654	0,1253	0,5000	0,3008	0,3008

4.3.1.3 Após 72 horas

Novamente verifica-se, através da Figura 4 a existência de diferenças no consumo alimentar nos tratamentos quando se compara com aqueles observados no controle. No teste U (Tabela 4) foram encontradas diferenças significativas nos tratamentos 1 e 2 (P-valor=0,0236 e 0,0473, respectivamente) quando comparados ao

Grupo Controle, indicando que os escores destes dois tratamentos são estatisticamente menores que os do grupo de controle. Portanto, há evidências de que os extratos de *C. lonchophyllum* nas concentrações de 2,00 µg/µl e 1,00 µg/µl possuem ação fagodeterrente em lagartas do milho de 3º instar após 72 horas de contato das lagartas com o alimento.

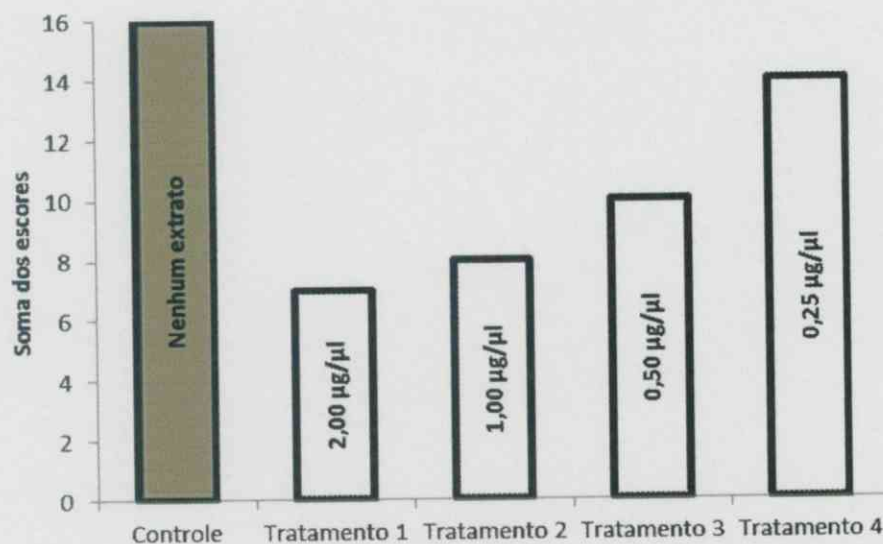


Figura 4. Soma dos escores de consumo das lagartas de *S. frugiperda* de 3º instar, ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. lonchophyllum* após 72 horas de contato.

Tabela 4. Testes U de Mann-Whitney para extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 72 horas, comparando-se o grupo de controle a cada um dos tratamentos.

	Grupo Controle vs. T1 (2,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T2 (1,00 µg/µl)	Grupo Controle vs. T3 (0,50 µg/µl)	Grupo Controle vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	1,9845	1,6711	1,3578	0,5222
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,0236	0,0473	0,0873	0,3008

Quanto aos tratamentos 3 e 4, os testes indicaram que não existem diferenças significativas (P-valor= 0,0873 e 0,3008, respectivamente). Isto sugere que apesar de já ter ocorrido inibição alimentar quando da aplicação do tratamento após 48 horas, o grupo de lagartas referente a este tratamento voltou a se alimentar. Portanto, foi rejeitada a ação fagodeterrente dos extratos de *C. lonchophyllum* nas concentrações de 0,50 µg/µl e 0,25 µg/µl em lagartas do milho de 3º instar após 72 horas de contato das lagartas com o alimento.

Aplicando-se o Teste U aos tratamentos entre si, em nenhum dos casos encontraram-se diferenças significativas. Estes resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Testes U de Mann-Whitney aplicados às diferentes concentrações de extratos da espécie *C. lonchophyllum* x herbivoria de *S. frugiperda* de 3º instar. Teste realizado após 72 horas, comparando-se os tratamentos entre si, tomados dois a dois.

	T1 (2,00 µg/µl) vs. T2 (1,00 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T1 (2,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T3 (0,50 µg/µl)	T2 (1,00 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)	T3 (0,50 µg/µl) vs. T4 (0,25 µg/µl)
Estatística "z"	0,2089	0,4178	1,4623	0,3133	1,2534	0,9400
Valor crítico	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449	1,6449
P-valor	0,4173	0,3381	0,0718	0,3770	0,1050	0,1736

A Figura 5 agrupa os resultados de consumo alimentar dos grupos de lagartas representado pela soma de seus escores, nos três momentos em que o experimento foi realizado, após 24, 48 e 72 horas, permitindo uma visão geral das diferenças encontradas. Fica evidente que há uma diminuição do consumo alimentar à medida que aumentam-se as concentrações de extrato.

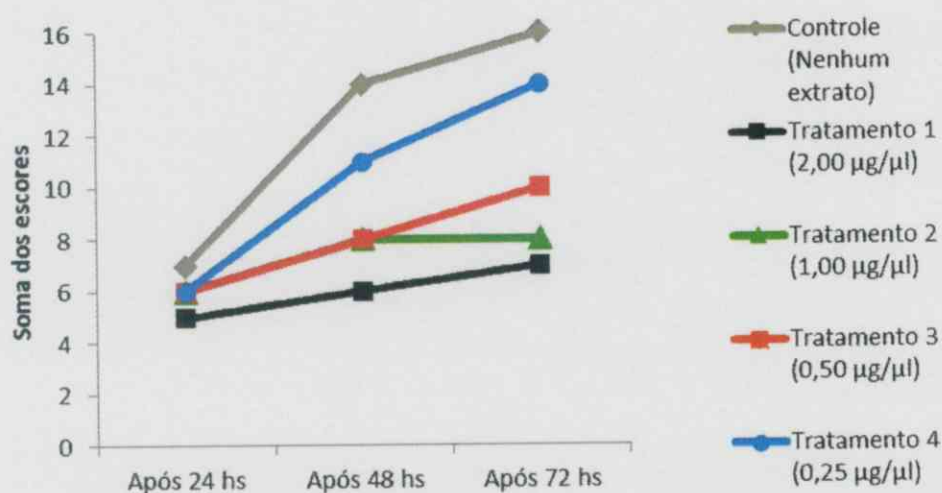


Figura 5. Evolução da soma dos escores de consumo de *S. frugiperda* de 3º instar ao longo de diferentes concentrações de extratos de *C. lonchophyllum* realizado após 24, 48 e 72 horas.

Haines e Renwick (2009) analisaram a ação inibitória de musgos na pré-ingestão e pós-ingestão pela lagarta generalista, *Trichoplusia ni* Hu Hübner (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae). A aceitabilidade e qualidade dos musgos *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) usando o lepdóptero. Apenas as dietas de controle e o musgo *C. americanum* foram consumidos evidenciando, portanto, a inibição alimentar para a maioria dos musgos. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, confirmando a atividade de fagodeterência dos musgos sobre larvas de lepdópteros.

4.3.2. MORTALIDADE

4.3.2.1 Após 24 horas

A Tabela 6 demonstra que após 24 horas de contato das lagartas com as folhas tratadas foram observadas mortes somente no tratamento 3. Entretanto, o número de mortes no Grupo Controle, no grupo que recebeu o Tratamento 3 e nos grupos que receberam os demais tratamentos, são estatisticamente iguais (p-valor=0,5000). Ou seja, nenhuma das concentrações de *C. lonchophyllum* apresentou ação inseticida significativa sobre *S. frugiperda*. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 6. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo Controle e Tratamento 3, de extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 24 horas.

	Grupo Controle Nenhum extrato	T1 2,00 µg/µl	T2 1,00 µg/µl	T3 0,50 µg/µl	T4 0,25 µg/µl	Total
Viva	5	5	5	4	5	24
Morta	0	0	0	1	0	1
Total	5	5	5	5	5	25
p-valor (Fisher) = 0,5000						
p-valor (Tocher) = 0,5000						

4.3.2.2 Após 48 horas

O único grupo com resultados diferentes aos do Grupo Controle, em relação ao número de lagartas mortas, é o que recebeu o Tratamento 1. Nos dados da tabela 7 observa-se que o Teste de Fisher foi aplicado para estas duas amostras verificando-se que o número de mortes no Grupo Controle e no grupo que recebeu o Tratamento 1 são estatisticamente iguais, não havendo diferenças na mortalidade (p-valor (Tocher) = 0,0833). Aplicando-se o Teste de Fisher entre o Tratamento 1 e cada um dos demais tratamentos, os resultados são os mesmos.

Assim, após 48 horas de contato das lagartas com o alimento não se observou ação inseticida significativa de nenhuma das concentrações de *C. lonchophyllum*.

Tabela 7. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo de Controle e Tratamento 1, de extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º ínstar, realizado após 48 horas

	Grupo Controle Nenhum extrato	T1 2,00 µg/µl	T2 1,00 µg/µl	T3 0,50 µg/µl	T4 0,25 µg/µl	Total
Viva	4	3	4	4	4	19
Morta	1	2	1	1	1	6
Total	5	5	5	5	5	25

p-valor (Fisher) = 0,5000
p-valor (Tocher) = 0,0833

4.3.2.3 Após 72 horas

Os Tratamentos 1, 2 e 4 apresentaram resultados diferentes aos do Grupo Controle. O resultado do Teste de Fisher realizado na Tabela 8, vale tanto para a comparação entre o Grupo Controle e o Tratamento 1 quanto para a comparação entre o Grupo Controle e o Tratamento 2, já que estes dois tratamentos possuem o mesmo número de lagartas vivas e mortas. Observou-se que o número de mortes nos grupos que receberam os Tratamento 1 ou 2 foram estatisticamente maiores que o do Grupo controle (p-valor (Tocher) = 0,0238).

Constatou-se, que após 72 horas de contato das lagartas com o alimento, a concentrações de 2,00 e 1,00µg/µl de *C. lonchophyllum* apresentaram ação inseticida significativa.

Tabela 8. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo Controle e Tratamento 1 ou 2, de extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º ínstar, realizado após 72 horas.

	Grupo Controle Nenhum extrato	T1 ou T2 2,00 ou 1,00µg/µl	Total
Viva	4	2	6
Morta	1	3	4
Total	5	5	10

p-valor (Fisher) = 0,2619
p-valor (Tocher) = 0,0238

Também foram testadas as diferenças entre o Tratamento 4 e o Grupo Controle. O Tratamento 4 não apresentou diferenças (p -valor (Tocher) = 0,0833) em relação ao Grupo Controle (Tabela 9).

Tabela 9. Número de lagartas vivas e mortas observadas para o Grupo Controle e Tratamento 4, de extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 72 horas.

	Grupo Controle Nenhum extrato	T4 0,25 µg/µl	Total
Viva	4	3	7
Morta	1	2	3
Total	5	5	10
p-valor (Fisher)	0,5000		
p-valor (Tocher)	0,0833		

Os Tratamentos 1 e 2 também apresentaram diferenças significativas quando comparados ao Tratamento 3, com o mesmo p -valor (Tocher) = 0,0238 (Tabela 10), quando anteriormente comparados com o Grupo Controle.

Quanto ao Tratamento 4, aplicou-se o Teste de Fisher para compará-lo aos Tratamentos 1 e 2 (Tabela 11), e não foram observadas diferenças significativas (p -valor (Tocher) = 0,1032), fato que permite concluir que o número de mortes nos grupos que receberam os Tratamentos 1 ou 2 são estatisticamente iguais ao Tratamento 4.

Apesar da concentração de extrato do Tratamento 3 apresentar-se maior (0,50µg/µl) que o Tratamento 4 (0,25µg/µl), neste último, observou-se um maior número (duas) de mortes. Entretanto, as diferenças entre estes tratamentos são consideradas estatisticamente não significativas.

Tabela 10. Número de lagartas vivas e mortas observadas para os Tratamentos 1 ou 2 e Tratamentos 3, de extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 72 horas

	T1 ou T2 2,00 ou 1,00µg/µl	T3 0,50µg/µl	Total
Viva	2	4	6
Morta	3	1	4
Total	5	5	10
p-valor (Fisher) = 0,2619			
p-valor (Tocher) = 0,0238			

Tabela 11. Número de lagartas vivas e mortas observadas para os Tratamentos 1 ou 2 e Tratamentos 4, de extratos da espécie *C. lonchophyllum*, com lagartas do milho de 3º instar, realizado após 72 horas

	T1 ou T2 2,00 ou 1,00 µg/µl	T4 0,25 µg/µl	Total
Viva	2	3	5
Morta	3	2	5
Total	5	5	10

p-valor (Fisher) = 0,5000
p-valor (Tocher) = 0,1032

Em experimento de campo na Nigéria, Ande et al. (2010) verificaram que o extrato de *Calymperes afzelii* Sw promoveu elevada atividade inseticida sobre a broca do caule do milho (*Elasmopalpus lignosellus*, Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) ocasionando maior ação quando comparada à atividade de outras três espécies de musgos testadas. A ação inseticida desta espécie de musgo foi tão boa quanto a do Tricel, o inseticida inorgânico usado no grupo controle.

A Figura 6 mostra a proporção de lagartas vivas nos respectivos tratamentos em cada instante em que a condição de vida ou morte foi observada.

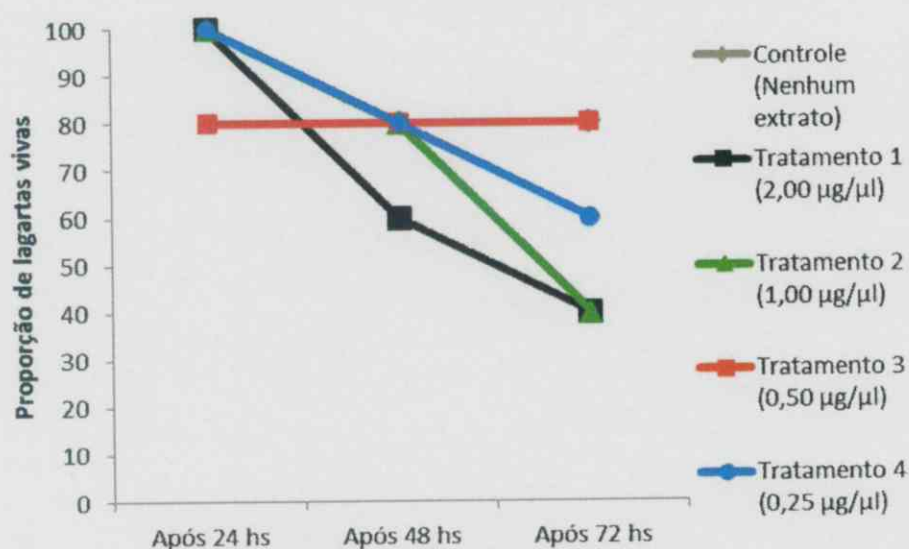


Figura 6. Evolução da proporção de *S. frugiperda* vivas entre diferentes concentrações de *C. lonchophyllum*. Observações realizadas após 24, 48 e 72 horas de contato do inseto com o alimento tratado.

A linha referente ao Grupo Controle começa em 100% após 24 horas. Sequencialmente após 48 e 72 horas, fica em 80%, sobrepondo-se às linhas dos tratamentos 4 e 3, respectivamente, mostrando uma estagnação própria para o grupo controle. Os tratamentos 1, 2 e 4 mostraram uma mortalidade progressiva, sendo que os tratamentos 2 e 4 apresentaram apenas 40% de lagartas vivas após 72 horas.

De uma maneira geral, observou-se uma maior mortalidade entre as maiores concentrações de extrato (2,00 e 1,00µg/µl), o que confirma os pressupostos deste estudo de que quanto maior a concentração de extrato maior a mortalidade.

Com base nos dados estatísticos estes resultados indicam *C. lonchophyllum*, como sendo uma espécie de briófita com atividade tanto inseticida quanto fagodeterrente sobre *S. frugiperda* de 3º instar. Isto sugere a confirmação da existência de compostos de defesa presentes nos constituintes químicos deste musgo que podem ser de interesse para aplicações no controle do gênero *Spodopera* ocorrente nos sistemas agrários. Entretanto são necessários estudos complementares a este, utilizando-se diferentes fases da lagarta, assim como um número maior de amostras a serem estudadas, para se avaliar o efeito residual dos extratos etanólicos de *C. lonchophyllum* e o comportamento dos mesmos em condições de campo, a fim de dar maior segurança a sua aplicabilidade.

O presente estudo representa o primeiro trabalho científico a testar a atividade inseticida e/ou fagodeterrente de *C. lonchophyllum*, e os resultados sugerem que este musgo ocorrente em grande quantidade na Amazônia brasileira é de grande importância e interesse para pesquisas de substâncias naturais que podem ser usadas como parte de um sistema de manejo integrado de pragas.

REFERÊNCIAS

- 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. (1990). 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. (1995). Chemical constituents of the bryophytes. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Eds. W. Herz, W.B. Kirby, R.E. Moore, W. Steglich, and C. Tamm), 1-618. Springer, Vienna.
- Asakawa, Y. (2007). Biologically active compounds from Bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, **79**, 557-580.
- Asakawa, Y., Toyota, M., Takemoto, T., Kubo, I. and K. Nakanishi (1980). Insect antifeedant secoaromadendrane-type sesquiterpenes from *Plagiochila* species. *Phytochemistry*, **9**, 2147-2154.
- 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., Woodcock, C.M., Woodcock, and Z. Zhong-Ning (1988). Activity of drimane antifeedants and related compounds against aphids, and comparative biological effects and chemical reactivity of (-)- and (+)- polygodial. *J. chem. ecol.*, **14**, 1845-1855.
- 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. Access in January 2013.
- Bellonda, H. C. H. B. and F. Zucoloto (2009). In: Panizzi, A. R. and Parra, J. R. Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica. **11**, p.425-464.
- 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.
- Busato G. R., Grützmacher, A. D., Garcia, M. S., Giolo, F. P. and A. F. M. Busato (2002). 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.
- Camarillo G., Ortega L., Serrato M. and C Rodríguez-Hernández (2007). Capítulo 5: *Tagetes* spp. plantas con potencial en el control de plagas. *Agric. Sostenible* **3**: 32-39.
- Costa DP (2014). Briófitas. In *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128472>). Access in July 2014.
- 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.
- Davidson, A. J. and R. E. Longton (1987). Acceptability of mosses as food for a herbivore, the slug, *Arion hortensis* Symp. *Biol. Hung.* **35**, 707-719.
- Florschütz, P. A. (1964) The Mosses of Suriname. Musci Part I. In: *Flora of Suriname*. (Ed. Lanjouw, J). Leiden, Brill, 1-271.
- Frahm, J. P. and K. Kirchhoff (2002). Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against the slug *Arion lusitanicus*. *Cryptogamie, Bryologie*, **23**, 271-275.
- Gassen, D. (1996). *Manejo de Pragas associadas à cultura do milho*. Passo Fundo: Aldeia Norte, 127p.
- 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.
- Guerra, M. S (1985). *Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos*. Brasília: Embrater, 1-166.
- 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.
- Hoy, C. W. and, A. M. Shelton (1987). Feeding response of *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) to cabbage leaf age. *Environmental Entomology*, v. 16, p. 680-682.
- Labbe', C., Faini, F., Villagrán, C., Coll, J. and D. S. Rycroft. (2005). Antifungal and Insect Antifeedant 2-Phenylethanol Esters from the Liverwort *Balanophora 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. 1-36.
- Lisboa, R. C. L. (1993). *Musgos Acrocárpicos do Estado de Rondônia*. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke. 1-272 .
- Lisboa, R. C. L. and A. L. Ilkiu-Borges (2007). Uma Nova Avaliação da Brioflora da Reserva Mocambo, Belém (PA). In: *Diversidade e Dinâmica da Área de Pesquisa Ecológica do Guamá-APEG* (Orgs. J.I Gomes, M. B. Martins, R. C. V Martins-da-Silva, and S.S. Almeida), 149-174. Embrapa Amazônia Ocidental, Belém.
- 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.
- Moraes, E. N. R. and R. C. L. Lisboa (2006). Inventário dos musgos (Bryophyta) da Serra dos Carajás, estado do Pará. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Ciências Naturais*, **2**, 39-68.
- Parra, J. R. P., Zucchi, R. A. and J. R. S. Lopes (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.
- Pinheiro, S. 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.
- Roeld, A. R. (2001). Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*, **1**, 43-50.

- Saito, M. L. and Lucchini, F. (1998). *Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguro ao meio ambiente*. São Paulo: Embrapa-CNPMA, 1-46.
- Santos, R. C. P and Lisboa, R. C. L. (2003). Musgos (Bryophyta) do nordeste paraense, Brasil – 1. Zona bragantina, Microrregião do salgado e município de Viseu. *Acta Amazonica* **33**, 415-422.
- Santos, R. C. P and Lisboa, R. C. L. (2008). Musgos (Bryophyta) da Microrregião do Salgado Paraense e sua utilização como possíveis indicadores de ambientes perturbados. *Rodriguésia* **59**, 361- 368.
- Santos, R. C. P, Moraes, E. N. R and E. H. A. Andrade (in prep.): Estudo da composição química de duas espécies de briófitas (Bryophyta) ocorrentes na Amazônia Brasileira. *Revista Brasileira de Farmacognosia*
- Shen J., Li G., Liu Q., He Q., Gu J., Shi Y. and H. Lou (2010). Marchantin C: A potential anti-invasion agent in glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* **9**: 33-39.
- 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 (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 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
- Tadesse, M. (2002). Characterisation and mode of action of natural plant products against leaf fungal pathogens. Shaker, Aachen.
- Tavares, A. C. C. (2009). *Florística e Ecologia das Comunidades de Briófitas em Florestas de Terra Firme no Estado do Pará, Amazônia*. 132f. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro.
- 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.

Yano O., (1989). Briófitas. In: *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico* (Eds. O. Fidalgo and V. L. R. Bononi), 27-30. Série Documentos. Instituto de Botânica, São Paulo.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo dá uma visão preliminar sobre a química de briófitas para a amazônia brasileira. Este é o segundo registro dos constituintes químicos deste grupo de plantas para o país. Entretanto, é o primeiro relato da composição química volátil dos musgos *Calymperes lonchophyllum* Schwägr. e *Campylopus surinamensis* Müll. Hal., e a primeira pesquisa científica a avaliar as atividades fagoderrente e inseticida destas espécies de briófitas no controle da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.

Com um total de 34 constituintes químicos identificados nos seus extratos pentânicos, *C. surinamensis* e *C. lonchophyllum* são consideradas importantes fontes naturais de terpenos, fenilpropanóides, ácidos graxos, aldeídos e ésteres.

O extrato etanólico de *C. surinamensis* não produziu efeito inseticida sobre as lagartas de 3º instar de *S. frugiperda*, entretanto, os resultados confirmaram a sua atividade fagoderrente significativa sobre as larvas deste lepdóptero.

O extrato etanólico de *C. lonchophyllum* apresentou tanto atividade fagoderrente quanto inseticida sobre *S. frugiperda* de 3º instar, confirmando a existência de compostos de defesa presentes nos constituintes químicos deste musgo.

De uma maneira geral conclui-se que os resultados do presente estudo sugerem *C. surinamensis* e *C. lonchophyllum*, como importante fonte de princípios ativos e também de grande interesse para pesquisas de substâncias naturais que podem ser usadas no controle da lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda*, ou até mesmo como parte de um sistema de manejo integrado de pragas (MIP). Entretanto, são necessários estudos complementares a este, utilizando-se diferentes fases da lagarta, assim como um número maior de amostras a serem estudadas, para se avaliar o efeito residual dos extratos etanólicos destes musgos, e o comportamento dos mesmos em condições de campo, a fim de dar maior segurança a sua aplicabilidade.

A falta de literatura que envolve a investigação fitoquímica de briófitas é uma grande lacuna na pesquisa para este grupo vegetal, o que faz do presente trabalho, subsídio importante para outros nesta mesma linha de pesquisa. Assim, os resultados deste estudo vêm para ampliar o conhecimento químico destas plantas, e comprovar a existência de seus compostos de defesa, ressaltando que os mesmos são passíveis de patente, resguardando assim, o direito de autoria.

ANEXOS

I) Normas editoriais dos periódicos



**Guidelines for the publication of manuscripts in
Revista Brasileira de Farmacognosia
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 IC₅₀ 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.¹

¹Standardization 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.

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.sbfgnosia.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 ≤ 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.sbfgnosia.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.sbfgnosia.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 Yaokexue 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 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m (meter; cm (centimeter); mm (millimeter); μ m (micrometer); nm (nanometer); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram); μ g (microgram); ng (nanogram); mL (milliliter); μ L (microliter); s (second); min (minute); h (hour); N (normal); M molar; mM (millimolar); μ 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 ≤ 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. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.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.