

DENISE MARIA DE OLIVEIRA MONTE

**POTENCIAL BIOINSETICIDA DE EXTRATOS DE *Cladonia substellata* Vainio
SOBRE PRAGAS DE FEIJÃO ARMAZENADO.**

GARANHUNS, PERNAMBUCO – BRASIL

DEZEMBRO - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**POTENCIAL BIOINSETICIDA DE EXTRATOS DE *Cladonia substellata* Vainio
SOBRE PRAGAS DE FEIJÃO ARMAZENADO.**

DENISE MARIA DE OLIVEIRA MONTE

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR
Dr. CARLOS ROMERO FERREIRA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Produção Agrícola, para obtenção do título de *Mestre*.

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL
DEZEMBRO - 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**POTENCIAL BIOINSETICIDA DE EXTRATOS DE *Cladonia substellata* Vainio
SOBRE PRAGAS DE FEIJÃO ARMAZENADO.**

DENISE MARIA DE OLIVEIRA MONTE

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
DEZEMBRO – 2012

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

G637f Monte, Denise Maria De Oliveira
Potencial bioinseticida de extratos de *Cladonia
substellata* Vainio sobre pragas de feijão armazenado/
Denise Maria De Oliveira Monte. _Garanhuns,2012.

69f

Orientador: Carlos Romero Ferreira de Oliveira
Dissertação (Curso de Mestrado Produção Agrícola –
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade
Acadêmica de Garanhuns, 2012
Inclui bibliografia

CDD: 633.2

1. Pragas
 2. Pragas – Grãos
 3. Liquen – Pragas
- I. Oliveira, Carlos Romero de
II. Titulo

Dedicatória

*À minha querida vó.
Lindinalva da Silva Monte. (in memoriam).*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus Pai todo Poderoso que coloco na frente em tudo na minha vida. Meus pais, Monte e Dulce Maria pelo amor e incentivo incondicional que me fizeram seguir.

Meus irmãos queridos Dayse Mary, Monte Júnior, João Paulo e João Lucca pelo amor e carinho.

Minha sobrinha Ana Sophia o mais novo membro da família Monte que chegou para renovar nossas esperanças.

Aos meus orientadores: Drº Carlos Romero pela orientação, incentivo e paciência; a Drª Claudia pelas valiosas sugestões e orientações.

Aos amigos da graduação que acreditaram na minha caminhada: Andréa Fernandes, Dayane Cristine e Juliana Simões que me acompanharam de longe torcendo por mim.

Minhas amigas de mestrado Patrícia Gondim e Juliana Andrade que estiveram comigo desde o início do mestrado dividindo apartamento e longas noites sem dormir para a conquista deste sonho.

De Serra Talhada tenho muito a agradecer aos amigos Mayara, Celinha, Felipe, Luana, Poliana, Taciana, Suely, Val, Morgana, Leandro, Talita, Fabrício, Ariadja e Camila que em muito me ajudaram na parte mais difícil da caminhada, pelas orientações, apoio, acolhimento e carinho.

Aos amigos: Jean, Karol e Daniel que sempre estiveram presentes em todos os momentos, chorando e sorrindo comigo me apoiando e incentivando quando mais precisei.

Aos professores Drº Jeanderson e a Drª Edilma da UFRPE-UAG pelo apoio e acolhimento.

A professora Drª Edna da UFPB-CCA que sempre acreditou em mim pelo apoio, carinho e compreensão.

A professora Drª Elaine da UFRPE-UAST que me acolheu quando cheguei a Serra e que muito contribuiu com sugestões e conselhos.

A professora Dr^a Eugênia e o professor Dr^o Nicácio pela colaboração e por permitirem o meu acesso ao laboratório de Produtos Naturais da UFPE sempre que necessário.

A doutora Mônica da UFPE, pela disponibilidade em ajudar sugerindo alternativas para o desenvolvimento dos experimentos.

E agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho.

Ao PPGPA da UFRPE-UAG pela oportunidade.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro à pesquisa e pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro à pesquisa.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Denise Maria de Oliveira Monte, filha de José da Silva Monte e Dulce Maria de Oliveira Monte, nasceu em João Pessoa, em 16 de janeiro de 1982.

Em 2010, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia – PB.

Em 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns – PE, sob a orientação do professor Dr. Carlos Romero Ferreira de Oliveira, defendendo a dissertação em 17 de dezembro de 2012.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6

CAPÍTULO I

POTENCIAL BIOINSETICIDA DE *Cladonia substellata* Vainio NO CONTROLE DE *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera, Chrysomelidae) EM FEIJÃO ARMAZENADO.

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL LIQUENICO	13
2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	13
2.3. ARMAZENAMENTO E CRIAÇÃO DOS INSETOS	15
2.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	15
2.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA <i>Callosobruchus maculatus</i>	16
2.5.1. POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS DE <i>Cladonia substellata</i> SOBRE <i>Callosobruchus maculatus</i> TESTE SEM CHANCE DE ESCOLHA	16
2.5.2. EFEITO REPELENTE DE EXTRATOS DE <i>Cladonia substellata</i> SOBRE <i>Callosobruchus maculatus</i> TESTE COM CHANCE DE ESCOLHA	17

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÕES	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	31

CAPÍTULO II

BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Cladonia substellata* Vainio SOBRE *Zabrotes subfasciatus* (BOH) (Coleoptera, Chrysomelidae) EM FEIJÃO ARMAZENADO.

RESUMO	37
ABSTRACT	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL LIQUENICO	41
2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	41
2.3. ARMAZENAMENTO E CRIAÇÃO DOS INSETOS	42
2.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA <i>Zabrotes subfasciatus</i>	42
2.4.1. EFEITO INSETICIDA DE EXTRATOS DE <i>Cladonia substellata</i> SOBRE <i>Zabrotes subfasciatus</i> TESTE SEM CHANCE DE ESCOLHA	42
2.4.2. EFEITO REPELENTE DE EXTRATOS DE <i>Cladonia substellata</i> SOBRE <i>Zabrotes subfasciatus</i> TESTE COM CHANCE DE ESCOLHA	43
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4. CONCLUSÕES	52
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO GERAL

Durante o armazenamento, os grãos, sementes e seus subprodutos estão sujeitos ao ataque de pragas, os quais ocasionam perdas qualitativas e quantitativas, como redução dos valores nutricionais e comerciais do produto. Para evitar perdas são utilizados produtos químicos, muitos dos quais vêm apresentando falhas no controle, o que tem levado ao seu uso indiscriminado. Em busca de novas alternativas, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver produtos de origem natural. Tendo em vista a diversidade de substâncias extraídas de líquens e o conhecimento acerca de sua atividade biológica, no presente trabalho foi estudado o potencial inseticida de extratos obtidos do líquen *Cladonia substellata* sobre os coleópteros *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, avaliando a toxicidade (efeito repelente) e a bioatividade sobre a mortalidade, emergência e oviposição dos insetos em feijão armazenado. Para isso, foram utilizados os extratos reunido e etéreo de *C. substellata*, os quais foram obtidos através de extrações sucessivas por esgotamento do talo liquênico. Os extratos foram testados, separadamente, nas doses de 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL sobre os grãos de feijão *Vigna* sp, para *C. maculatus*, e nas doses de 0,02 e 0,002 mg/mL sobre os grãos de feijão *Phaseolus* sp, para *Z. subfasciatus*. A análise de cromatografia de camada delgada (CCD) confirmou a presença do ácido úsnico como composto majoritário. Os extratos reunido e etéreo de *C. substellata* mostraram efeito repelente e ocasionaram mortalidades com o aumento das dosagens utilizadas nos dois insetos. Estes resultados indicam que os extratos de *C. substellata* atuam sobre as fases imaturas de *C. maculatus* e de *Z. subfasciatus*, sendo o ácido úsnico presente nesses extratos, provavelmente, o responsável pelo efeito ovicida/larvicida observado. Novos estudos com os extratos do líquen *C. substellata* devem ser realizados com outras concentrações, para se avaliar a seletividade e possíveis efeitos sobre o poder germinativo e a viabilidade de sementes de feijão.

Palavras-chave: Ácido úsnico, Bruchinae, Controle alternativo, Substâncias liquênicas, Repelência.

ABSTRACT

During storage, grains, seeds and byproducts are subject to attack by pests, which cause qualitative and quantitative losses as reduces the nutritional value of the product and business. To avoid losses chemicals are used, many of which are showing failures in control, which has led to its widespread use. In search of new alternatives, research is being conducted with the goal of developing natural products. Given the diversity of substances extracted from lichens and knowledge about their biological activity, in this work the insecticidal potential of extracts of the lichen *Cladonia substellata* on beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* to evaluate the toxicity (repellent effect) and bioactivity on mortality, oviposition and emergence of insects in stored beans. For this, we used the meeting and ethereal extracts of *C. substellata*, which were obtained by successive extractions of exhaustion of the stem liquênico. The extracts were tested separately at rates of 0,02, 0,006 and 0,002 mg / mL on beans *Vigna* sp, to *C. maculatus*, and at doses of 0,02 and 0,002 mg / ml on *Phaseolus* sp beans to *Z. subfasciatus*. Analysis of thin layer chromatography (TLC) confirmed the presence of usnic acid as major compound. The extracts and ethereal meeting of *C. substellata* showed repellent effect and caused mortality with increasing dosages utilized in both insects. These results indicate that extracts of *C. substellata* act on the immature stages of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*, usnic acid being present in these extracts probably responsible for the effect ovicidal / larvicidal observed. Further studies with extracts of the lichen *C. substellata* should be conducted with other concentrations, to evaluate the selectivity and possible effects on the viability and germination of bean seeds.

Keywords: usnic acid, Bruchinae, Alternative Control, Substance liquênicas, Repellency.

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar da população brasileira e de outros países da América Latina, devido principalmente ao seu teor de proteínas e minerais e seu elevado conteúdo nutricional (Guzmán-Maldonado et al., 1996). A fonte de proteína do feijão varia de cultivar para cultivar variando entre 15% a 33%. Essa leguminosa também é fonte de carboidratos, vitaminas, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante (Ferreira et al, 2006).

O feijão caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., tem grande importância agrônômica e econômica porque é um dos grãos mais consumidos no Brasil. Essa espécie apresenta algumas características técnicas, como: ciclo curto, resistência a estresse hídrico, baixa exigência nutricional e elevada adaptabilidade a solos arenosos. O Brasil é um dos maiores produtores dessa leguminosa, com áreas cultivadas exclusivamente no Semiárido do Nordeste e em algumas regiões da Amazônia (Andrade Junior et al., 2003).

Já o feijão comum, (*Phaseolus vulgaris* L.), destaca-se pela sua importância nutricional e socioeconômica, devido à mão-de-obra empregada durante o seu ciclo, estimada em 7 milhões de homens/dia-ciclo de produção (Borém & Carneiro, 2006).

As perdas no feijoeiro variam de 30 a 90% da produção devido à ocorrência de pragas, de acordo com o período do ano e da idade da cultura (Vieira, 1988; Júnior & Venzon, 2001). A redução da qualidade dos grãos durante o armazenamento está associada, principalmente, ao grau de infestação dos grãos e às condições ambientais em que se encontra a massa de grãos (Faroni & Souza, 2005).

Os insetos quando não controlados reduzem a quantidade de reservas nutritivas do grão (Pacheco & Paula, 1995), podendo muitas vezes promover a elevação da umidade e da temperatura da massa de grãos, tornando as condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos (Vieira et al., 1994). Neste sentido, é necessário que o armazenamento seja realizado com eficiência para que a qualidade seja mantida, evitando-se, assim, a escassez na entressafra, a oscilação de preços no mercado e os danos causados por insetos-praga (Brackmann et al., 2002).

Os insetos *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) e *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) constituem as principais pragas primárias do feijão comum e caupi armazenados, e destacam-se por reduzirem a qualidade fisiológica e o valor comercial do produto (Sousa et al., 2005), sendo responsáveis por perdas quantitativas e qualitativas durante o armazenamento dos grãos.

O controle destas pragas vem sendo realizado por meio da fumigação ou pulverização dos grãos por produtos químicos. Depois de colhidos, os grãos de feijão recebem um tratamento preventivo com inseticidas para posterior armazenagem. Segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012), estão registrados quatro inseticidas para o controle de *Z. subfasciatus*: Fermaq (Fosfeto de Magnésio), Fertox (Fosfeto de Alumínio) e Phostoxin (Fosfeto de Alumínio), que são pastilhas fumigantes, e K-Obiol 2P (Deltametrina), que é um pó seco. Já para o controle do coleóptero *C. maculatus* está indicado o Degesch Fumicel (Fosfeto de Magnésio), que é um fumigante na forma de tablete.

Por outro lado, sabe-se que as aplicações destes produtos tem ocorrido de maneira excessiva, o que pode ocasionar problemas secundários como o desenvolvimento de resistência dos insetos a estes produtos.

Diversas pesquisas têm demonstrado a viabilidade do uso de compostos bioativos obtidos de plantas no controle de pragas de grãos armazenados, principalmente por sua fácil aquisição, baixo custo, eficiência e segurança para os aplicadores e consumidores (Shaaya et al 1997). Geralmente esses compostos podem ser utilizados na forma de pó, extrato aquoso ou orgânico, óleos essenciais e óleos emulsionáveis.

A flora brasileira, rica e diversificada, oferece opções para a descoberta de novas substâncias ou compostos com atividade inseticida, o que pode significar alternativas de controle de pragas ao produtor e uma contribuição significativa para o manejo de pragas de grãos armazenados, sem poluir o ambiente e oferecendo alimentos saudáveis aos consumidores (Roel, 2001).

Neste sentido, as plantas e os líquens com atividade inseticida podem ser utilizados associadas com outras táticas de controle, como o controle biológico e cultivares resistentes, por exemplo, em programas de manejo integrado de pragas.

Os líquens são organismos resultantes da associação simbiótica entre fungo (micobionte) e algas (fotobionte), onde o micobionte pode satisfazer sua necessidade de carboidratos para respiração e crescimento, e o fotobionte em contrapartida pode receber benefícios, como proteção contra a dessecação (Honda & Vilegas, 1999).

Esses organismos desempenham diversos papéis ecológicos e seus compostos secundários possuem atividade antimicrobiana, efeitos alelopáticos, agentes bloqueadores de radiação solar, por exemplo (Lawrey, 1986; Fahselt, 1994; Huneck, 1999).

São encontrados em diferentes tipos de ambientes, desertos, montanhas e regiões polares, porém, são raramente encontrados em matas com baixa luminosidade. Podem ser encontrados, ainda, sobre diferentes tipos de substratos sendo eles: córtex de árvores, folhas, rochas ácidas ou alcalinas, muros e outros. Seu crescimento sobre um determinado substrato depende de suas características físicas, como rugosidade, dureza, exposição à luz, pH, umidade e temperatura. (Nash, 1996).

As substâncias liquênicas são agrupadas de acordo com sua localização no talo, chamadas de intracelulares e extracelulares. Os produtos intracelulares, denominados metabólitos primários, estão ligados à parede celular e podem ser carotenóides, aminoácidos, proteínas, glicolípídeos e carboidratos (Honda; Vilegas, 1999). Os produtos extracelulares, denominados metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex do talo liquênico. Estes fazem parte de uma gama de ácidos alifáticos e aromáticos, meta- e para- depsídeos, depsídonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico (Nash, 1996; Honda; Vilegas, 1999).

Tendo em vista a diversidade de substâncias liquênicas e o conhecimento acerca da eficiência comprovada de sua atividade biológica em diversas áreas, a presente pesquisa teve como objetivo estudar o efeito inseticida (bioatividade) de extratos obtidos do líquen *C. substellata* sobre os coleópteros *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, avaliando a mortalidade, a emergência e a oviposição dos insetos em feijão armazenado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE JÚNIOR, A. S. de et al. **Sistemas de produção 2: Cultivo do feijão caupi**. Versão eletrônica, julho, 2003. ISSN 16788818.
- BORÉM, A. & CARNEIRO, J.E.S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; DE PAULA, T.J.JR.; BORÉM, A. **Feijão**. 2ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2006, p.13-18. (Boletim Viçosa: UFV, cap. 1).
- BRACKMANN, A.; NEUWALD, D.A.; RIBEIRO, N.D.; FREITAS, S.T. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo comercial carioca em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria. 32: .911-915. 2002.
- FAHSELT, D. **Secondary biochemistry of lichens**. Symbiosis, 1994, p. 117–165.
- FARONI, C. M.; SOUZA, M. J. **Feijão na economia nacional**. Embrapa, Santo Antônio de Goiás, Goiás, 2005.
- FERREIRA NETO, J. R. C.; ROCHA, M. de M.; Freire Filho, F.R.; SILVA, S.M. de S.; LOPES, A.C. de. A.; FRANCO, L.J.D. **Composição química dos grãos secos em genótipos de feijão-caupi**. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJAO-CAUPI, 1.; REUNIAO NACIONAL DE FEIJAO-CAUPI, Teresina. Tecnologias para o agronegócio. 2006. (Anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte).
- GUSMÀN MALDONADO, S.H.; MARÍN-JARILLO, A.; CASTELLANOS, J.Z.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. & ACOSTAGALLES GOSC, J.A. Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say.) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **Journal of Stored Products Research**. 32: 53-58. 1996.

- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. **A química de líquens**. Química Nova. v. 22 (1). 1999. p. 25-55.
- HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Natur wissenschaften**. p. 559–570, 1999.
- PACHECO, I.A.; PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados- identificação e biologia**. 1ª ed. Campinas, Fundação Cargill, 1995. 228 p.
- ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, p.43-50. 2001.
- VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. 2ª ed, Imprensa Universitária, Viçosa. 1988, p. 231.
- VIEIRA, C.; VIEIRA, R. F. Épocas de plantio do feijão e proposta de nomenclatura para designá-las. **Revista Ceres** 42 (244): p.685-688. 1994.

CAPÍTULO I

POTENCIAL BIOINSETICIDA DE *Cladonia substellata* Vainio NO CONTROLE DE *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera, Chrysomelidae) EM FEIJÃO ARMAZENADO.

RESUMO

Para o controle de pragas de grãos armazenados vem se desenvolvendo pesquisas com o uso de produtos alternativos visando uma redução no uso de inseticidas sintéticos. Tendo em vista a diversidade de substâncias liquênicas e o conhecimento a cerca de sua atividade biológica, o presente trabalho teve como objetivo estudar a bioatividade de extratos do líquen *Cladonia substellata* sobre *Callosobruchus maculatus*, avaliando a mortalidade, a emergência e a oviposição dos insetos. Para isso, foram utilizados os extratos reunido e etéreo de *C. substellata*, os quais foram obtidos através de extrações sucessivas por esgotamento do talo liquênico. Os extratos foram testados separadamente nas concentrações de 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL sobre os grãos de feijão. Dez grãos de feijão foram colocados em placas de Petri, adicionando-se 5mL da concentração, em três repetições, com posterior liberação de 10 insetos adultos de *C. maculatus*. Estas placas foram colocadas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de 25+3 °C. A análise de cromatografia de camada delgada (CCD) confirmou a presença do ácido úsnico como composto majoritário e na mesma proporção nos dois extratos utilizados. Os dois tipos de extratos de *C. substellata* mostraram efeito repelente e provocaram mortalidade que aumentou com o aumento da dose. Tanto o extrato etéreo quanto o reunido resultaram numa diminuição da oviposição e da emergência de *C. maculatus*. Provavelmente o ácido úsnico presente em *C. substellata* atuou sobre as fases imaturas de *C. maculatus* sendo o responsável pelo efeito ovicida/larvicida. Novos estudos com os extratos do líquen *C. substellata* devem ser realizados com outras concentrações, para se avaliar a seletividade e possíveis efeitos sobre o poder germinativo e a viabilidade de sementes de feijão, e fornecer subsídios para sua futura utilização no manejo de *C. maculatus* em feijão armazenado.

Palavras-chave: Ácido úsnico, Bruchinae, Controle alternativo, Extratos liquênicos, Repelência.

ABSTRACT

To control pests of stored grain has been developing research on the use of alternative products targeting a reduction in the use of synthetic insecticides. Given the diversity of substances liquênicas and knowledge about its biological activity, the present work was to study the bioactivity of extracts of the lichen *Cladonia substellata* on *Callosobruchus maculatus*, evaluating mortality, emergence and oviposition of insects. For this, we used the meeting and ethereal extracts of *C. substellata*, which were obtained by successive extractions of exhaustion of the stem liquênico. The extracts were tested separately at concentrations of 0,02, 0006 and 0,002 mg / mL on the beans. Ten beans were placed in Petri dishes by adding 5 mL concentration in three replicates, with subsequent release of 10 adult insects of *C. maculatus*. These plates were placed in a climatic chamber of BOD, a temperature of 25 +3 ° C. Analysis of thin layer chromatography (TLC) confirmed the presence of usnic acid as a major compound and in the same proportion in both extracts used. Both types of extracts of *C. substellata* showed repellent effect and caused mortality increased with the increasing dose. Both the ether extract and the meeting resulted in decreased oviposition and emergence of *C. maculatus*. Probably the usnic acid present in *C. substellata* served on the immature stages of *C. maculatus* being responsible for the effect ovicidal / larvicidal. Further studies with extracts of the lichen *C. substellata* should be conducted with other concentrations, to evaluate the selectivity and possible effects on the viability and germination of bean seeds, and provide subsidies for their future use in the management of *C. maculatus* in stored beans.

Keywords: usnic acid, Bruchinae, Alternative control, extracts liquênicos, Repellency.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda, macassar ou caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma planta herbácea, pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoidea, originada do continente Americano (Almeida et al, 2005). Apresenta grande importância nutricional, econômica e social na região Nordeste. Por ser excelente fonte de proteína e carboidratos, é alimento básico da população mais pobre e de pequenos agricultores, pois supre as necessidades nutricionais dessa camada da população. É um dos grãos mais consumidos no Brasil e possui algumas características técnicas, como ciclo curto, resistência ao estresse hídrico, baixa exigência nutricional e elevada adaptabilidade a solos arenosos (Andrade Junior, 2003).

O Brasil é um dos maiores produtores dessa leguminosa, com áreas cultivadas exclusivamente no Semiárido do Nordeste e em algumas regiões da Amazônia (Andrade Junior, 2003). Entretanto, a região Centro-Oeste apresenta grande avanço no cultivo, onde é crescente a demanda por cultivares de porte ereto devido ao uso de máquinas agrícolas. (Rocha, 2006). Nos últimos anos tem aumentado o consumo na forma de grãos secos e grãos verdes como hortaliças, com 60 a 70% de umidade, tornando-se uma nova forma de comercialização para os agricultores (Oliveira et al., 2001).

A redução da qualidade dos grãos durante o armazenamento está associada, principalmente, ao grau de infestação dos grãos e às condições ambientais em que se encontra a massa de grãos (Faroni & Sousa, 2005).

Dentre as pragas que atacam o feijão *V. unguiculata* quando armazenado, destaca-se o coleóptero *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Chrysomelidae, Bruchinae). Este inseto apresenta infestação cruzada, podendo infestar feijões maduros no campo, continuando o desenvolvimento durante o armazenamento (Santos, 1971). O ataque deste inseto resulta em perda de peso do grão, na redução da germinação e do valor nutritivo e na desvalorização comercial do produto (Gallo et al., 2002; Sousa et al., 2005). Neste sentido, é necessário que o armazenamento seja realizado com eficiência para que a qualidade seja mantida, evitando-se, assim, a escassez na entressafra, a oscilação de preços no mercado e os danos causados por insetos-praga (Brackmann et al., 2002).

O controle de pragas de feijão armazenado tem sido realizado por meio da fumigação ou pulverização dos grãos por produtos químicos. Entretanto, há inúmeros relatos de problemas ocasionados pelo uso constante e indiscriminado destes produtos. Diante disso, métodos alternativos para o controle de diversas pragas de grãos armazenados, que sejam seguros ao homem e não causem danos ao meio ambiente, vem sendo desenvolvidos, como o uso de produtos de origem vegetal (Shaaya et al, 1997; Tavares & Vendramim, 2005), por exemplo.

Os líquens são associações simbióticas entre fungos e algas. São organismos que na maioria dos casos, são conhecidos por possuírem inúmeras utilidades medicinais e econômicas (Pereira et al., 2001). Desempenham diversos papéis ecológicos e seus compostos secundários possuem atividade antimicrobiana e efeitos alelopáticos, entre outros (Lawrey, 1986). São conhecidos desde a antiguidade, tendo sido utilizados como plantas medicinais, inclusive citados por Dioscorides, cirurgião do exército de Nero (Ahmadjian, 1993).

Os compostos obtidos a partir de líquens tem diversos usos na indústria de cosméticos (principalmente perfumes), na produção de medicamentos (com atividades antibiótica e antitumorais), na datação de determinados substratos (liquenometria) e no monitoramento do aquecimento global (Van Herk; Aptroot; Van Dobben, 2002). Apresentam, ainda, efeito alelopático (Lawrey, 1986; Yano, 1994) e são eficientes no controle biológico de insetos (Costa-Filho et al., 1991).

Diante da eficiência comprovada das substâncias liquênicas em diversas áreas, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a bioatividade de extratos obtidos do líquen *Cladonia substellata* sobre o coleóptero *C. maculatus* em feijão armazenado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia/Ecologia, da Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.1. Coleta e armazenamento do material liquênico.

As amostras de *Cladonia substellata* Vainio (**Figura 1**) foram coletadas no município de Alhandra, na Paraíba. Uma parte do material coletado foi acondicionado em caixa de papelão à temperatura ambiente, e outra parte foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os líquens foram identificados através de caracteres morfológicos e químicos do talo, segundo Pereira et al. (1996).



Figura 1: Detalhe do líquen *Cladonia substellata* Vainio.

2.2. Obtenção dos extratos

Os líquens passaram por um processo de limpeza manual utilizando-se pinças para retirada de contaminantes como sementes, areia, resíduos vegetais, dentre outros, que pudessem de alguma maneira interferir na obtenção dos extratos (**Figura 2A**). Posteriormente, o material foi submetido à extrações sucessivas por esgotamento, à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$).

Para obtenção do **extrato etéreo** foi utilizado 8g do talo *in natura*, sendo o material colocado em um Beker contendo 100 mL do solvente éter etílico. Posteriormente, essa

amostra foi submetida à agitação mecânica por uma hora (**Figura 2B**) e, em seguida, filtrada em papel filtro (**Figura 2C**). O extrato obtido foi concentrado até secagem em banho-maria (40°C) acoplado a rotaevaporador (**Figura 2D**). Este processo foi repetido até o esgotamento do talo.

Para o **extrato reunido**, a partir de 8g do talo *in natura* foram utilizados os solventes: éter, clorofórmio e acetona sendo repetido o processo citado acima até o esgotamento do talo.



Figura 2: Etapas e processos para a obtenção dos extratos, etéreo e reunido, provenientes de *C. substellata*. A) Separação de resíduos; B) Agitação mecânica; C) Filtragem; D) Secagem em banho-maria acoplado a rotaevaporador.

2.3. Armazenamento e criação dos insetos

Os insetos adultos foram criados em grãos de feijão, acondicionados em recipientes plásticos fechados com tampa perfurada e revestida com tecido fino para permitir as trocas gasosas (**Figura 3A**). Foram confinados durante sete dias para efetuarem a postura, em seguida retirados e os recipientes contendo os ovos foram estocados até a emergência da geração F1. Este procedimento foi efetuado por sucessivas gerações, de modo a assegurar a quantidade de adultos necessários para a execução dos experimentos. As criações foram mantidas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de 25 ± 3 °C (**Figura 3B**), e à temperatura ambiente.



Figura 3: Arenas de criação dos insetos. A) Em condições de laboratório, à temperatura ambiente; B) Em condições controladas, à temperatura de 25 ± 3 °C.

2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Amostras do **extrato etéreo** e do **extrato reunido** de *C. substellata*, e do ácido úsnico (Merck), foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica Gel F₂₅₄₊₃₆₆ e desenvolvidas no sistema de solventes tolueno, dioxano e ácido acético (90: 25: 4, v/v, respectivamente). Após evaporação do solvente as bandas foram visualizadas sob luz UV curta e longa (254 e 366 nm, respectivamente). Posteriormente, as placas foram borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, sendo aquecidas a 100°C por 20 minutos para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração (Culberson, 1972). Os resultados foram avaliados mediante cálculos dos valores de R_f que é a distância percorrida por cada composto em uma amostra,

dividindo pela distância percorrida pelo solvente. Comparações do valor de Rf da amostra com o de um padrão é um método qualitativo usado na identificação de um composto.

2.5. Ensaios biológicos para *Callosobruchus maculatus*

Os extratos do líquen *C. substellata* foram dissolvidos em clorofórmio e obtidas as concentrações de 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL. Para a testemunha foi utilizado apenas clorofórmio.

Estas concentrações foram utilizadas para avaliar o potencial inseticida (efeito sobre a mortalidade e a oviposição) e, ainda, para avaliar o efeito repelente (teste com chance de escolha) sobre o coleóptero *C. maculatus*.

2.5.1 Potencial inseticida de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Callosobruchus maculatus*: Teste sem chance de escolha.

Os extratos testados nesse experimento foram: extrato etéreo e extrato reunido. Os extratos foram testados, separadamente, nas doses de 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL sobre os grãos de feijão. Dez grãos de feijão foram colocados em placas de Petri, adicionando-se 5mL da concentração, onde posteriormente, foram colocados 10 insetos adultos de *C. maculatus*. As placas de Petri foram cobertas com filme PVC onde foram feitos pequenos orifícios com alfinete para permitir as trocas gasosas com o exterior. Estas placas foram acondicionadas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ (**Figura 4**).

Durante sete dias foram efetuadas contagens dos insetos adultos para avaliar a mortalidade, sendo em seguida efetuada a contagem de ovos nos grãos. Após esta avaliação, estes grãos foram acondicionados em recipientes plásticos e após 30 dias de confinamento foram quantificados os adultos emergidos para avaliar a persistência dos extratos liquênicos sobre os insetos. O experimento foi feito no delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (3 doses e testemunha). Os resultados foram submetidos à análise de regressão e teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 4: Arenas utilizadas para a avaliação do potencial inseticida (efeito sobre a mortalidade e a oviposição) de extratos do líquen *C. substellata* sobre *C. maculatus*. Teste sem chance de escolha, à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.5.2 Efeito repelente de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Callosobruchus maculatus*. Teste com chance de escolha.

Foram utilizados os extratos etéreo e reunido de *C. substellata*, nas doses de 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL sobre grãos de feijão.

O experimento foi conduzido em arenas compostas de dois recipientes plásticos, interligados simetricamente a uma caixa central por dois tubos plásticos (**Figura 5**). Em um dos recipientes plásticos foram colocados 10 grãos de feijão tratados com um dos extratos, e no outro recipiente a mesma quantidade de feijão sem o extrato (testemunha). Na caixa central foram liberados 10 insetos adultos de *C. maculatus*.

Cada extrato foi testado separadamente, constando cada experimento de dois tratamentos (extrato e testemunha) e três repetições. Estas unidades experimentais foram acondicionadas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Após sete dias da liberação na arena central, os insetos atraídos para cada tratamento (extrato ou testemunha) foram contabilizados para a avaliação da repelência. Em seguida, os insetos foram removidos e os grãos acondicionados em outros recipientes plásticos por 30 dias, até a emergência de novos adultos.



Figura 5: Arenas utilizadas para a avaliação do efeito repelente de extratos do líquen *C. substellata* sobre *C. maculatus*. Teste com chance de escolha, à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

O Índice de Repelência (IR) foi calculado pela fórmula: $\text{IR} = 2G / (G + P)$.

Onde:

G = % ovos e insetos emergidos no tratamento;

P = % de ovos e insetos emergidos na testemunha.

Os valores de IR variam entre zero e dois.

Onde:

IR = 1 indica repelência semelhante entre o tratamento e a testemunha (tratamento neutro);

IR > 1 indica menor repelência do tratamento em relação à testemunha (tratamento atraente);

IR < 1 corresponde à maior repelência do tratamento em relação à testemunha (tratamento repelente).

O intervalo de segurança utilizado para considerar se o extrato é ou não repelente foi obtido a partir da média dos IR (índice de repelência) e do respectivo desvio padrão (DP), ou seja, se a média dos IR for menor que $1 - DP$, o extrato é repelente; se a média for maior que $1 + DP$ o extrato é atraente e se a média estiver entre $1 - DP$ e $1 + DP$ o extrato é considerado neutro. Este índice é uma adaptação da fórmula citada por Lin et al. (1990), para o índice de consumo.

A porcentagem de repelência dos extratos foi calculada usando-se a fórmula adaptada de Obeng-Ofori (1995): $PR = [(NC - NT) / (NC + NT) \times 100]$

Onde:

PR = porcentagem de repelência;

NC = número de insetos atraídos na testemunha;

NT = número de insetos atraídos no extrato.

O percentual médio de redução de emergência foi calculado pela mesma fórmula, fazendo apenas as devidas adaptações, ou seja, trocando-se a média de insetos atraídos pela média de insetos emergidos, respectivamente, na testemunha e no tratamento com o extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise em CCD do extrato etéreo e do extrato reunido foi possível observar a presença do Ácido Úsnico (USN) com a comparação do Rf das amostras com o Rf do padrão (Merck) utilizado. No cromatograma revelado o ácido úsnico padrão apresentou um Rf de 0,76, o qual também pode ser observado na amostra do extrato etéreo e do extrato reunido (**Figura 6**). As demais bandas do extrato orgânico evidenciadas na CCD com Rfs variáveis (0,71; 0,63; 0,60; 0,56; 0,52), são provavelmente outros compostos presentes em *Cladonia substellata* que já foram descritos por AHTI et al. (1993), como os ácidos estítico, constítico e criptoestítico, os quais são compostos secundários utilizados na biossíntese da espécie.

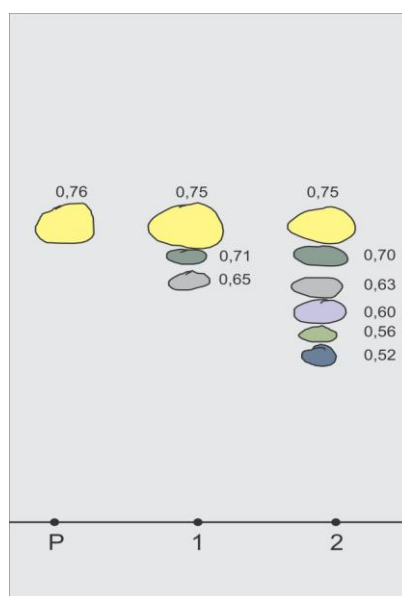


Figura 6: Cromatografia em camada delgada do extrato etéreo, extrato reunido de *Cladonia substellata* e padrão Merck. P: ácido úsnico Padrão Merck; 1: Extrato Etéreo; 2: Extrato Reunido.

Potencial inseticida de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Callosobruchus maculatus*. Teste sem chance de escolha.

Tanto o extrato reunido quanto o etéreo, obtidos de *C. substellata* causaram mortalidades em adultos de *C. maculatus* que entraram em contato direto com grãos de feijão tratados, mesmo utilizando-se dosagens extremamente baixas. Por outro lado, observou-se, ainda, que a mortalidade de adultos deste coleóptero foi maior à medida que se aumentou a dosagem (**Figura 7**).

Alguns pesquisadores de outros países têm voltado seu interesse para estudos com metabólitos secundários dos líquens, os quais vêm demonstrando efeitos inseticidas (Bombuwala, 2001; Kathirgamanathar et al., 2006; Balaji *et al.*, 2007; Cetin et al., 2008; Sahib et al., 2008). Estudos utilizando o ácido úsnico sobre larvas do mosquito *Culex pipiens* L. relatam que ocorreu 100% de mortalidade deste inseto (Cetin et al., 2008). Por outro lado, Yildirim et al (2012) avaliaram o efeito inseticida de extratos (ácido difractáico e úsnico) do líquen *Usnea longíssima* sobre o coleóptero *Sitophilus granarius* e observaram que a atividade inseticida aumentou com a concentração e com o período de exposição, causando alta mortalidade nos coleópteros.

No Brasil essas pesquisas são escassas e iniciais, e os estudos estão voltados para poucos grupos de insetos, como cupins, percevejos predadores e pragas de produtos armazenados. Coelho et al (2007) avaliaram a atividade inseticida da lectina da *Annona coriacea* sobre *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*, dois lepidópteros que atacam produtos armazenados, e observaram efeitos sobre o crescimento larval, a mortalidade e a perda de peso de *A. kuehniella*, com consequentes efeitos comportamentais e fisiológicos. Silva et al. (2009) relatam que houve atividade da lectina, uma proteína isolada do líquen *Cladonia veticillares*, na indução da mortalidade no cupim *Nasutitermes corniger*. Já Silva (2010) relata que a mortalidade observada para o percevejo predador *Podisus nigrispinus* não ultrapassou os 35% mesmo tendo sido utilizadas concentrações superiores às do presente estudo (0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL). A autora constatou que não houve diferenças significativas para os percentuais de mortalidade de *P. nigrispinus* submetidos à ação do ácido úsnico presente no líquen *C. substellata* em relação à testemunha.

Com relação à oviposição, pode-se observar que o aumento das dosagens utilizadas implicou em uma diminuição no número de ovos postos por fêmeas de *C. maculatus* em grãos de feijão *Vigna* submetidos aos extratos de *C. substellata* (**Figura 8**). Também foi observado que o aumento das dosagens utilizadas ocasionou uma diminuição no número de insetos emergidos em grãos de feijão tratados com os extratos de *C. substellata* (**Figura 9**).

Os resultados obtidos demonstram que o extrato reunido de *C. substellata*, para as concentrações utilizadas, resultou numa diminuição da oviposição de *C. maculatus* e, conseqüentemente, no número de adultos emergidos, em relação à testemunha (**Figura 10**). O extrato etéreo, por sua vez, também apresentou o mesmo comportamento, ou seja, ocasionou uma redução na oviposição e na emergência de *C. maculatus* quando comparado à testemunha (**Figura 11**). Entretanto, observou-se que na concentração de 0,002 mg/mL deste extrato, houve uma maior oviposição em relação às outras concentrações utilizadas. De maneira geral, observou-se que tanto o extrato reunido quanto o extrato etéreo demonstraram efeito significativo na diminuição da emergência de adultos em relação à oviposição (**Figuras 10 e 11**).

Isto indica, provavelmente, que os extratos obtidos de *C. substellata* estão atuando sobre as fases imaturas dos insetos, ou seja, apresentando efeito ovicida e larvicida. Também podem estar atuando como fago-inibidores ou reduzindo a fecundidade dos insetos. Tais indícios são importantes uma vez que as substâncias liquênicas podem estar ocasionando mudanças fisiológicas, como prolongamento das fases deste inseto, com provável interferência no crescimento, reprodução e metamorfose.

Sabe-se que, em geral, os principais efeitos causados por produtos alternativos, como óleos ou pós de origem vegetal, sobre as pragas de grãos armazenados são a mortalidade, deterrência na alimentação, repelência, inibição na oviposição, reduções na fecundidade e na fertilidade dos adultos. Além disso, também podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos (Huang et al., 1999; Weaver et al., 1994; Pascual-Villalobos & Ballestra-Costa, 2003).

De fato, Souza et al. (2005) observaram que o uso de pós provenientes de sementes de *Piper nigrum*, botões florais de *Eugenia caryophyllata* e folhas de *Cinnamomum zeylanicum* causaram uma redução significativa na taxa de oviposição de adultos de *C.*

maculatus. Da mesma forma, Boff et al (2006) constataram, em estudos envolvendo o uso de extratos de *P. nigrum* sobre *Acanthoscelides obtectus*, que a emergência dos insetos diminuiu com o aumento da concentração. Silva (2010), estudando o efeito de óleos essenciais sobre *C. maculatus*, verificou que o número de ovos postos na testemunha foi maior que nos óleos de *Schinus aromaticum* e de *Piper aduncum*, os quais reduziram a postura deste inseto em 74,16% e 66,06%, respectivamente.

Várias pesquisas também demonstraram os efeitos de substâncias extraídas de líquens sobre a alimentação, retardo no crescimento, interrupção da pupação e alta mortalidade em insetos, como nos lepidópteros *Lymantria dispar* (Bleweet & Cooper-Driver, 1990), *Spodoptera littoralis* (Giez et al., 1998) e *Helicoverpa armigera* (Balaji et al., 2007) e no díptero *Culex pipiens* (Cetin et al., 2008), por exemplo. Bleweet & Cooper-Driver (1990) observaram um retardo no crescimento e alimentação das lagartas de *L. dispar*, ao avaliarem o efeito de extratos de líquens sobre a alimentação deste inseto. Balaji et al. (2007) constataram que houve efeito dos extratos do líquen *Roccella montagnei* sobre *H. armigera*, que ocasionaram uma interrupção na formação de pupas deste lepidóptero. Sahib et al. (2008) comentam que o ácido úsnico extraído do líquen *Usnea* exerceu papel fundamental no retardo do crescimento do coleóptero *Xyleborus fornicates*, já que o desenvolvimento deste inseto foi afetado adversamente pela presença deste metabólito secundário em sua dieta artificial. Já Silva (2010), ao avaliar o efeito do ácido úsnico de *C. substellata* sobre o percevejo *P. nigrispinus*, observou que aqueles insetos que não atingiram a fase adulta morreram durante a ecdise, ao contrário do grupo testemunha, atribuindo tal efeito à atividade do ácido úsnico.

Diante do exposto, fica demonstrado que tanto o extrato etéreo quanto o reunido do líquen *C. substellata*, provocaram redução significativa da progênie de *C. maculatus*, independente da dosagem utilizada e que, neste caso, foram extremamente baixas. Isto se deve, provavelmente, devido a ação do ácido úsnico presente neste líquen, confirmado pela análise de cromatografia em camada delgada (CCD), o qual não diferiu significativamente em quantidade entre os dois extratos.

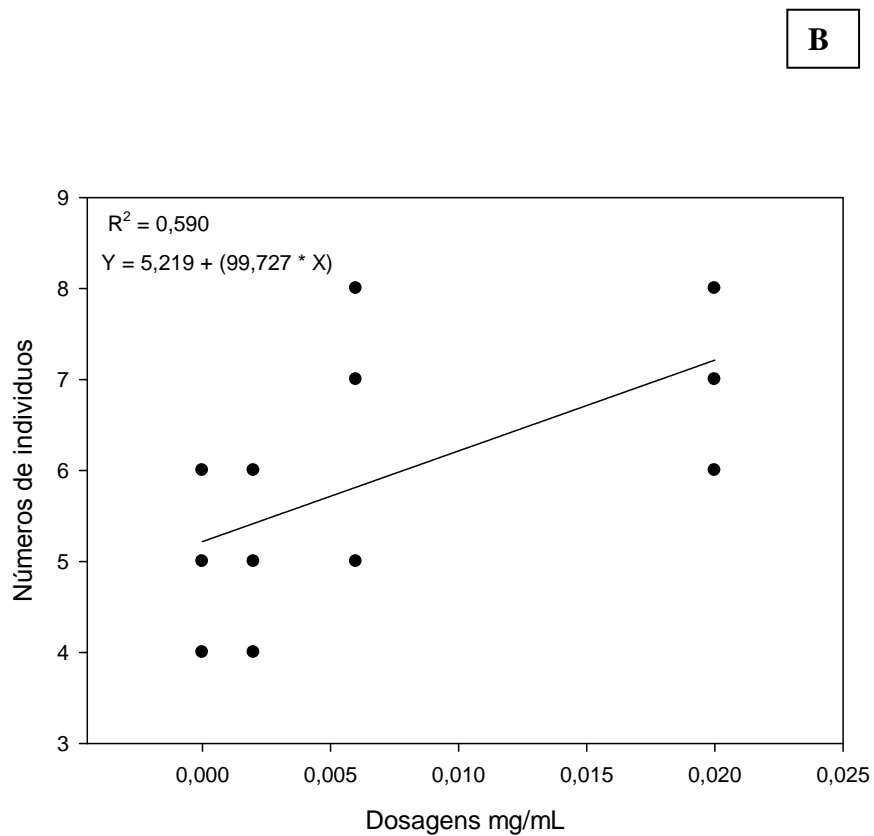
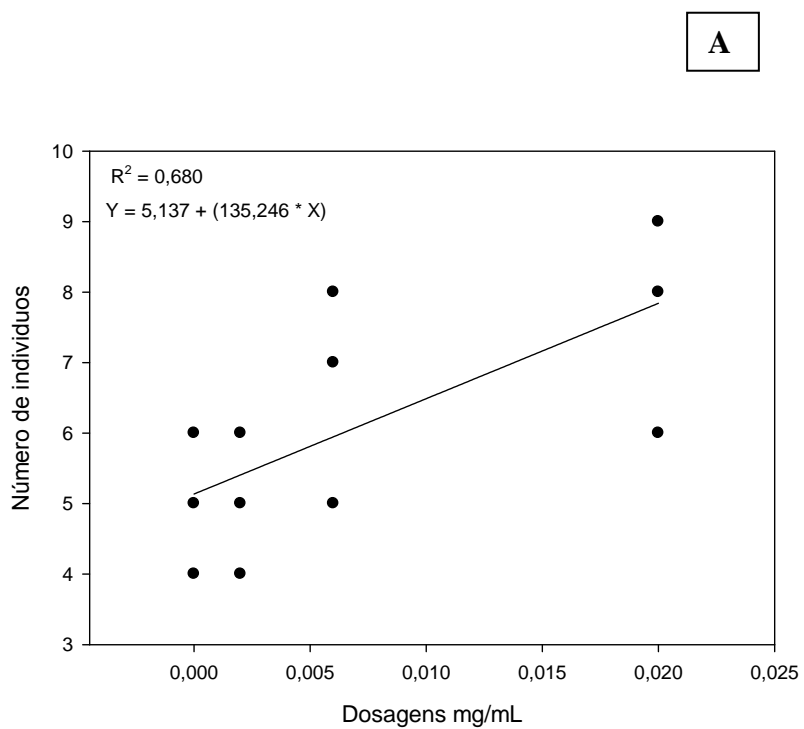


Figura 7: Mortalidade de adultos de *Callosobruchus maculatus* após 7 dias de contato direto com grãos de feijão *Vigna* sp. tratados com extratos de *Cladonia substellata*, nas dosagens de 0.006, 0.002 e 0.02 mg/mL: **A) Extrato etéreo** ($y=5,137 + 135,246x$; $F=8,62$; $p<0,05$; $r^2=0,68$); **B) Extrato reunido** ($y=5,590 + 99,727x$; $F=5,34$; $p<0,05$; $r^2=0,59$).

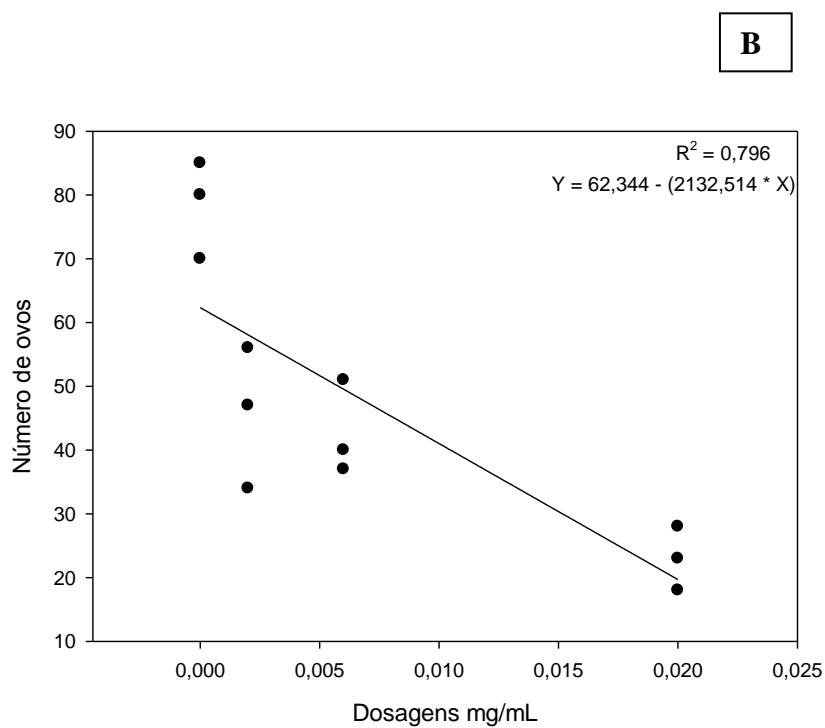
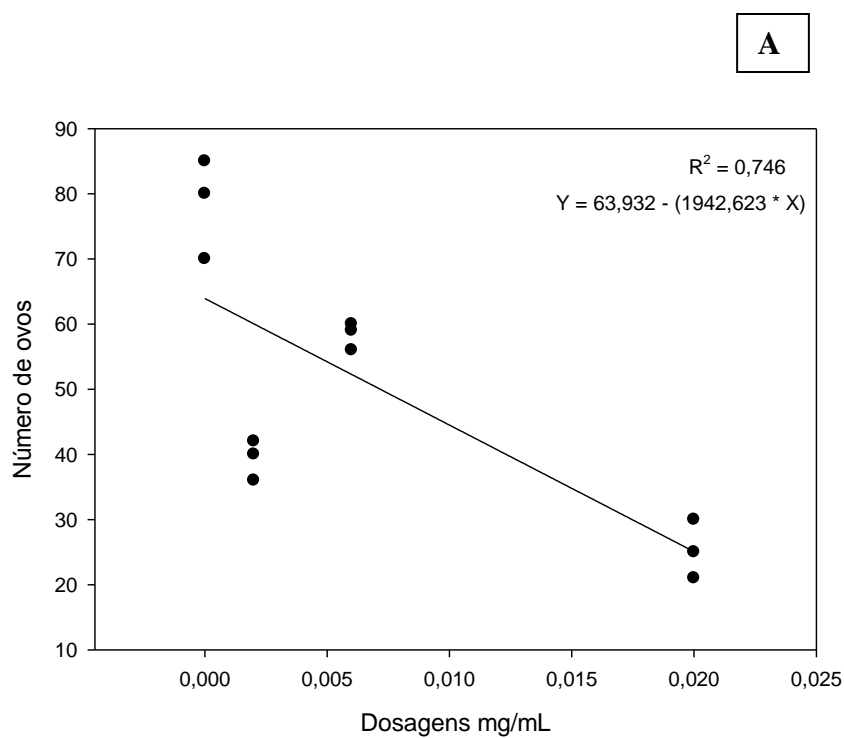


Figura 8: Oviposição de adultos de *Callosobruchus maculatus* após 7 dias de contato direto com grãos de feijão *Vigna* sp. tratados com extratos de *Cladonia substellata*, nas dosagens de 0.006, 0.002 e 0.02 mg/mL: **A) Extrato etéreo** ($y=63,932 - 1942,623x$; $F=12,53$; $p<0,05$; $r^2=0,746$); **B) Extrato reunido** ($y=62,344 - 2132,514x$; $F=17,30$; $p<0,05$; $r^2=0,796$).

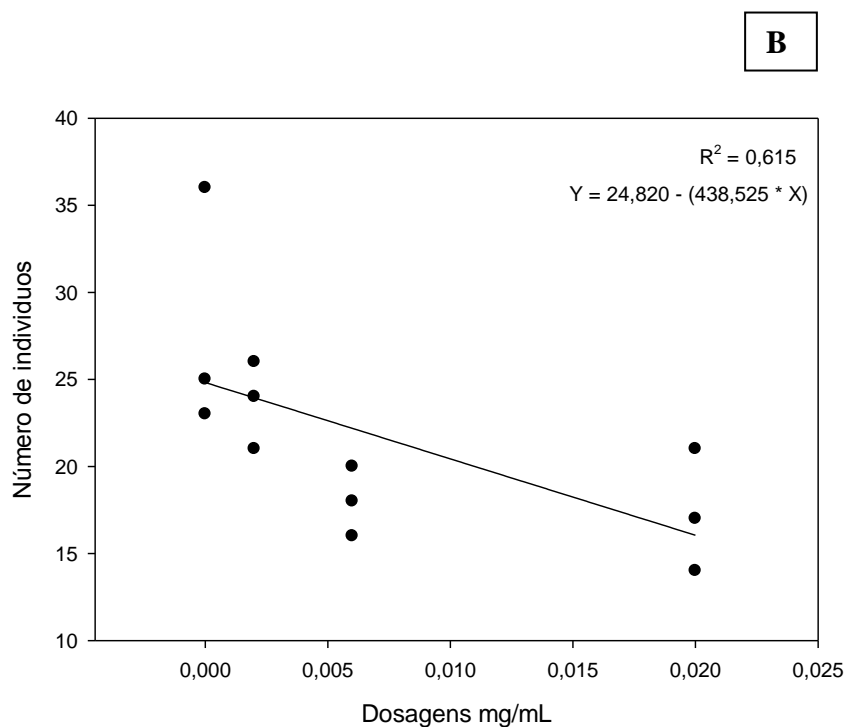
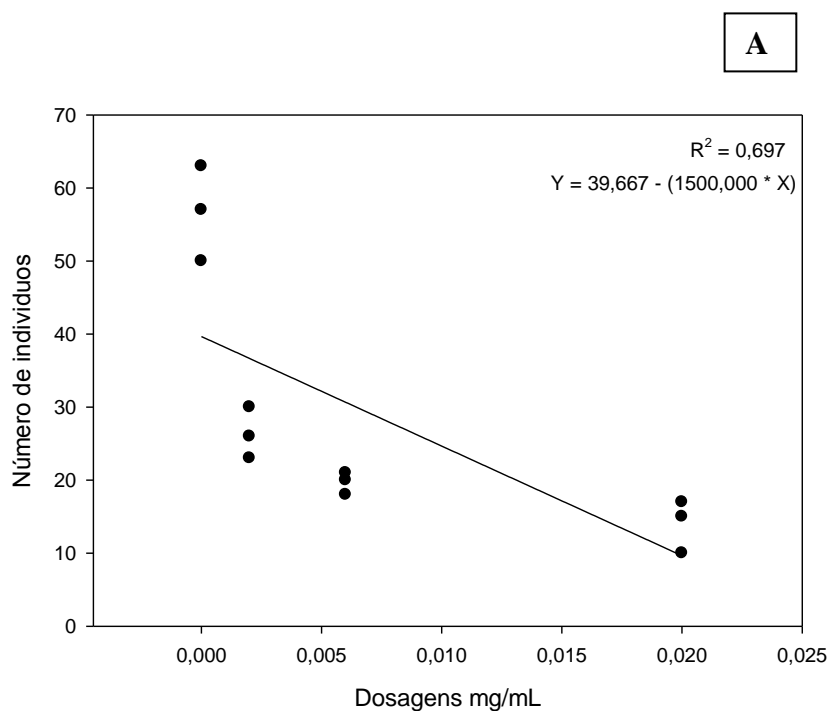


Figura 9: Emergência de *Callosobruchus maculatus* após 7 dias de contato direto com grãos de feijão *Vigna* sp. tratados com extratos de *Cladonia substellata*, nas dosagens de 0.006, 0.002 e 0.02 mg/mL: **A) Extrato etéreo** ($y=39,667 - 1500,00x$; $F=9,43$; $p<0,05$; $r^2=0,697$); **B) Extrato reunido** ($y=24,820 - 438,525x$; $F=6,08$; $p<0,05$; $r^2=0,615$).

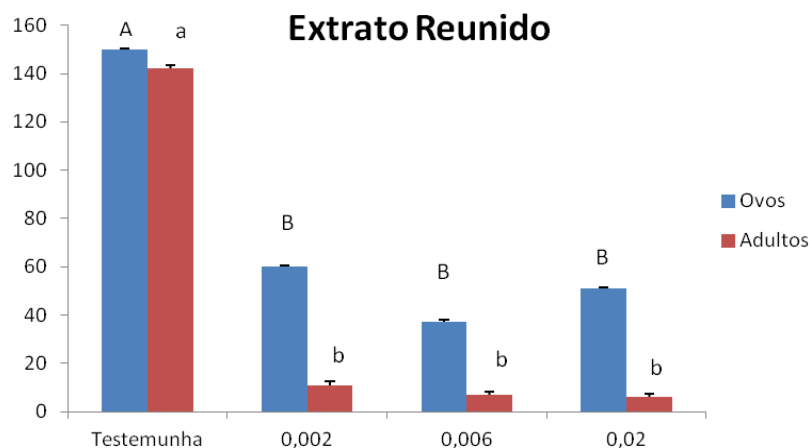


Figura 10: Oviposição de adultos de *Callosobruchus maculatus* após 7 dias de contato direto com o **extrato reunido** de *Cladonia substellata* e emergência de adultos nas dosagens de 0,002, 0,006 e 0,02mg/mL em grãos de feijão *Vigna* sp. **Teste sem chance de escolha** (Temp.: $25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$).

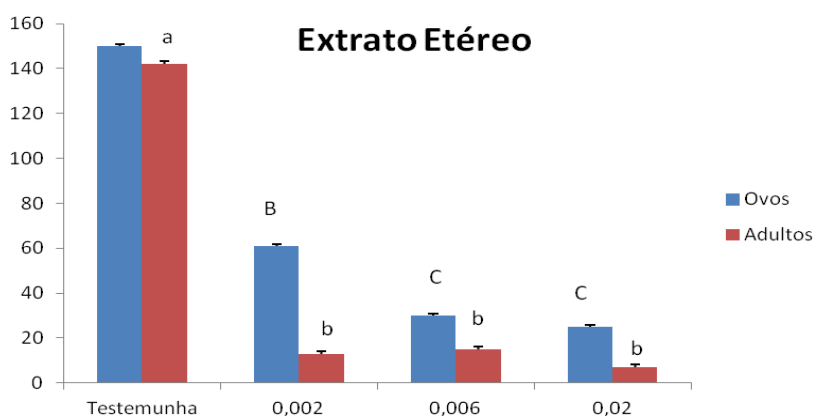


Figura 11: Oviposição de adultos de *Callosobruchus maculatus* após 7 dias de contato direto com o **extrato etéreo** de *Cladonia substellata* e emergência de adultos nas dosagens de 0,002, 0,006 e 0,02mg/mL em grãos de feijão *Vigna* sp. **Teste sem chance de escolha** (Temp.: $25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$).

**Efeito repelente de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Callosobruchus maculatus*.
Teste com chance de escolha.**

Foi observado que os grãos de feijão tratados com os extratos de *Cladonia substellata*, nas doses de 0,02 e de 0,006 mg/mL, atraíram menos adultos de *C. maculatus* que a testemunha, independentemente do extrato utilizado. Neste sentido, foram considerados repelentes, enquanto que na dose de 0,002 mg/mL, os dois tipos de extratos mostraram ser atraentes (Tabela 1).

Em relação ao índice de repelência, o extrato reunido mostrou-se repelente nas doses de 0,02 e de 0,006 mg/mL, e neutro na dose de 0,002 mg/mL, o que foi confirmado pelo índice de segurança. Por outro lado, o extrato etéreo apresentou comportamentos diferentes de acordo com a dosagem utilizada, sendo considerado repelente, neutro e atraente, respectivamente (**Tabela 1**).

Os extratos de *C. substellata* testados mostraram comportamentos diferentes em relação à porcentagem de repelência e à redução da emergência de adultos. O extrato reunido mostrou-se o mais eficiente apresentando um percentual de repelência de 60%, na maior dosagem utilizada. A menor repelência foi observada na dose de 0,002 mg/mL para o extrato etéreo, quando o mesmo foi considerado neutro pelo índice de segurança (**Tabela 1**).

A ação repelente é uma propriedade importante que deve ser considerada no controle de pragas de grãos armazenados, já que existe uma tendência de que quanto maior for a repelência menor será a infestação por os insetos. Isto tem implicações na redução ou supressão da postura dos insetos e, conseqüentemente, afeta o número de insetos emergidos (Coitinho, 2006). Alguns resultados semelhantes de repelência foram observados para diversos tipos de pós (*Chenopodium ambrosioides*, *Piper nigrum* e *Cymbopogon* sp.) por Araújo (2010) e de óleos essenciais (*Myrocarpus frondosus*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon winterianus*, *Copaifera landesdorffi* e *Pimpinella anisum*) sobre *Z. subfasciatus*, por Brito (2011) e sobre *C. maculatus* (*Pipiper hispidinervum*, *Pipiper aducum* e *C. winterianus*), por Xavier (2011).

No presente, estudo foi constatado que tanto o extrato etéreo quanto o reunido, obtidos do líquen *C. substellata*, também apresentam propriedade repelente para *C. maculatus*. Essas informações são importantes e novos estudos com as substâncias liquênicas podem fornecer subsídios para que possam ser usadas de maneira estratégica e incluídas em Programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), especialmente em ambiente de armazenamento de grãos. Neste sentido, se faz necessária a continuidade dos estudos, utilizando-se concentrações mais altas, diferentes períodos de exposição dos insetos aos extratos e acompanhamento dos possíveis efeitos sobre os insetos que emergiram sob influência dos grãos tratados, por exemplo.

TABELA 1- Porcentagem de insetos atraídos, Índice de repelência, Porcentagem de repelência de extratos do líquen *Cladonia substellata*, nas doses 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL, e Redução da emergência de adultos de *Calosobruchus maculatus*. Teste com chance de escolha (Temp.: 25±3°C).

Tratamento	Adultos Atraídos (%)		IR±DP ¹	C ²	IS ³	Repelência (%)	Redução da Emergência (%)
	Testemunha	Liquen					
0.02mg/mL							
Extrato Reunido	47	30	0,7028±0,0355	R	R	18,6	60
Extrato Etéreo	30	27	0,8764±0,1526	R	R	13,2	38,8
0.006mg/ mL							
Extrato Reunido	37	28	0,4307±0,5498	R	R	15,4	33,3
Extrato Etéreo	33	20	0,6769±0,5847	R	N	9,4	8,7
0.002mg/ mL							
Extrato Reunido	37	37	1,4181±0,4863	A	N	8	14,2
Extrato Etéreo	33	33	1,5172±0,3614	A	A	7,2	12

¹ Índice de Repelência e Desvio Padrão.

²C= Classificação: A= Atraente; R= Repelente e N= Neutro

³ Intervalo de Segurança, onde R= Repelente, N= Neutro e A= Atraente.

4 CONCLUSÕES

O ácido úsnico, substância majoritária do líquen *Cladonia substellata*, não diferiu entre os extratos etéreo e reunido utilizados no presente estudo, e provavelmente o ácido úsnico foi o responsável pelo efeito ovicida/larvicida sobre *C. maculatus*.

Os extratos etéreo e reunido obtidos do líquen *C. substellata*, aplicados nas doses de 0,02, 0,006 e 0,002 mg/mL, reduziram a oviposição de fêmeas de *Callosobruchus maculatus* e a emergência de adultos deste inseto em feijão *Vigna* sp. armazenado.

Tanto o extrato etéreo quanto o reunido provocaram mortalidade em *C. maculatus*, e a mortalidade aumentou com o aumento das dosagens.

Os dois tipos de extratos, etéreo e reunido, apresentaram efeito repelente para o coleóptero *C. maculatus*, mas na menor dose utilizada (0,002 mg/mL) mostraram-se atraente e neutro, respectivamente.

Novos estudos devem ser realizados com outras dosagens para avaliar possíveis efeitos sobre a germinação e a viabilidade de sementes de feijão, sua persistência em diferentes períodos de armazenamento e efeitos deletérios em outras fases de desenvolvimento de *C. maculatus*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADJIAN, V. **The lichen Symbiosis**. 2ª edição. New York, 1993. P. 107-115.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER- FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brazil. **Tropical Biology**. V. 7 (1), p. 55-70, 1993.
- ALMEIDA, F. A. C., SANTOS, N. R., GOMES, J. P., ARAÚJO, M. E. R. Efeito de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão *Vigna* (*Callosobruchus maculatus*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 9, p. 585-590. 2005.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S. Sistemas de produção 2. **Cultivo do feijão**. 2003 (Boletim versão eletrônica. ISS 16788818).
- ARAÚJO, A.M.N. de. **Bioatividade de espécies vegetais em relação a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1983) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em feijão (*Phaseolus vulgaris* L., 1753)**. Universidade Federal de Alagoas. 2010. Dissertação de Mestrado.
- BALAJI, P.; MALARVANNAM, S.; HARIHARAN, G.N. Efficacy of *Roccella montagnei* extracts on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology**, v. 4, p. 248-252. 2007.
- BLEWITT, M.R. ; COOPER-DRIVER, G. The effects of lichen extracts on feeding by gypsy moths (*Lymantria dispar*). **The Bryologist**. 93(3), p.220-221. 1990.
- BOFF, M.I.C.; SARTORI, D.V.; BOGO, A. Efeito de extratos de *Piper nigrum* L. sobre o caruncho-do-feijão, *Acanthoscelides obtectus* (SAY). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 31, p.17-22. 2006.
- BOMBUWALA, B.D.K. **Isolation and bio activity studies of lichen substances from Sri Lankan lichens**. News Internet Edition. Department of Chemistry. University of Peradeniya, Sri Lanka. 2001, Ph.D Thesis.
- BRACKMANN, A.; NEUWALD, D.A.; RIBEIRO, N.D.; FREITAS, S.T. Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo comercial carioca em

- armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. **Ciência Rural**. Santa Maria. 32: p. 911-915. 2002.
- BRITO, S.S.S. **Avaliação do potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) em feijão armazenado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2011, p. 45. Monografia.
- CETIN, H., TUFAN-CETIN, O., TURK, A.O., TAY, T., CANDAN, M., YANIGOKLU, A., SUMBUL, H. Insecticidal activity of major lichen compounds, (–)- and (p)-usnic acid, against the larvae of the house mosquito, *Culex pipiens* L. **Parasitology Research** v. 102, p. 1277–1279. 2008.
- COELHO, M.B., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology C** 146, 406–414. 2007.
- COITINHO, R. L. B.; OLIVEIRA, J. V.; JUNIOR, M. G. C. G.; CÂMARA, C. A. G. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 176-182. 2006.
- COSTA-FILHO, L. **Atividade antimicrobiana de substâncias liquênicas**. Universidade Federal de Pernambuco. 1991, p. 1-61. Monografia.
- CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L. JOHNSON, A. Second Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichen Products. St. Louis. **The Bryologist**, Inc, p. 400. 1972.
- FARONI, C. M.; SOUZA, M. J. Feijão na economia nacional. Embrapa, Santo Antônio de Goiás, Goiás, 2005.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BAPTISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B, VENDRAMIM, J. D, MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920. 2002.
- GIEZ, I., LANGE, O.L., PROKSCH, P. Growth retarding activity of lichen substances against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 22, p. 113–120. 1998.

- HUANG, Y. & S. H. HO. Bioactivitis of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Corculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) **Journal of Economic Entomology**. v. 92, p. 676-683. 1999.
- KATHIRGAMANATHAR, S., W.D. RATNASOORIYA, P. BAEKSTROM, R.J. ANDERSEN AND V KARUNARATNE. Chemistry and bioactivity of Physciaceae lichens *Pyxine consocians* and *Geterodermia leucomelos*, **Pharm. Biol.**, 44, p. 217–220. 2006.
- LIN, H., KOGAN, M., FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparisons of inducing factors. **Enviromental Entomology**. v. 19, p. 1852 – 1857. 1990.
- LAWREY, J. D. Biological role of lichen substances. **The Bryologist**. p. 111–122. 1986.
- OLIVEIRA, M. S. de. Efeito do déficit hídrico aplicado em diferentes fases do ciclo fenológico do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). cv. Eriparsa. 2001. 60 f. Universidade Federal de Lavras. Mestrado.
- PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; BALLESTA-ACOSTA, M. C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 673-679. 2003.
- PEREIRA, E. C. **Biologia de liquens**. Depto. de Ciências Gergráficas. Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Universidade Federal de Pernambuco. 2001. (Série textos didáticos).
- ROCHA, M. de M.; CARVALHO, K.J.M. de; FREIRE FILHO, F.R.; LOPES, A.C de A.; Gomes, R.L.F.; SOUSA, I. da S. Controle genético do comprimento do pedúnculo em feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.3, p.270-275, 2009.
- SANTOS, J. H. R., VIEIRA, F. V. Ataque do *Callosobruchus maculatus* (F.) a *Vigna sinensis* Endl. I. Influência sobre o poder germinativo de sementes da cv. Seridó. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 1, n. 2, p. 71-74. 1971.

- SAHIB, K., S. KULARATE, S. KUMAR and V. KARUNARATE. Effect of (+)- usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. **Journal of Stored Products Research.**, v. 36, p. 335–336. 2008.
- SHAAYA, E.; KOSTJUKOVSKI, M.; EILBERG, J.; SUKPRAKARN, C. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 7-15. 1997.
- SILVA, G.N., R.A. SA, T.H. NAPOLEAO, F.S. GOMES, N.D.L. SANTOS, A.C. ALBUQUERQUE, H.S. XAVIER, P.M.G. PAIVA AND M.T.S. CORREIA. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Inter. biodeterioration & Biodegradation.**, v. 63, p. 334–340. 2009.
- SILVA, R.C.S. **Efeito do ácido úsnico de *Cladonia substellata* VAINIO sobre o desenvolvimento pós-embrionário do *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae).** Universidade Federal de Pernambuco, 2010. Monografia.
- SOUSA, A. H.; MARACAJÁ, P. B.; SILVA, R. M, ALVES; MOURA. A. M. N; ANDRADE. W. G. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2. 2005.
- TAVARES, M. A. G. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology.** v. 34, p. 319-323. 2005.
- VAN HERCK, C. M.; APTROOT, A.; VAN DOBBEN, H. F. Long-term Monitoring in the Netherlands Suggests that lichens respond to global warming. **The lichenologist**, v. 34, n. 2, p. 141-154, 2002.
- XAVIER, M.V.A. **Óleos essenciais no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabr.,1775) (Coleoptera,Chrysomelidae, Bruchinae) em caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., armazenado e viabilidade de sementes tratadas.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2011, p. 64. Monografia.
- WEAVER, D. K., C. D. WELLS, F. V. DUNKELL, W. BERTSCH, S. E. SING & S. SHIHARAN. Insecticidal activity of floral, foliar, and root extracts of *Tagetes minuta*

(Asterales: Asteraceae) against adult Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 87, p.1718-1725. 1994.

YANO, A. M. Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula de *Allium cepa*. Universidade Federal de Pernambuco. 1994. 126p. Dissertação- Mestrado.

YILDIRIM, E., A. ASLAN, B. EMSEN, A. CAKIR AND S. ERCISLI. Insecticidal effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, p. 303–306. 2012.

CAPÍTULO II

BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Cladonia substellata* Vainio SOBRE *Zabrotes subfasciatus* (BOH) (Coleoptera, Chrysomelidae) EM FEIJÃO ARMAZENADO.

RESUMO

O coleóptero *Zabrotes subfasciatus* é considerado a principal praga do feijão *Phaseolus vulgaris* armazenado, reduzindo o peso e a qualidade dos grãos, bem como o poder germinativo das sementes. A procura por métodos de controle alternativos para o manejo desses insetos vem sendo cada vez mais utilizada devido à contaminação causada pelos inseticidas sintéticos. Sabendo-se da diversidade das substâncias liquênicas e do conhecimento de sua atividade biológica, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a bioatividade de extratos do líquen *Cladonia substellata* em *Z. subfasciatus*, avaliando a mortalidade, a emergência e a oviposição dos insetos. Para isso, foram utilizados os extratos reunido e etéreo de *C. substellata*, os quais foram obtidos através de extrações sucessivas por esgotamento do talo liquênico. Os extratos foram testados separadamente nas concentrações de 0,02 e 0,002 mg/mL sobre os grãos de feijão. Dez grãos de feijão foram colocados em placas de Petri, adicionando-se 5mL da concentração, em três repetições, com posterior liberação de 10 insetos adultos de *Z. subfasciatus*. Estas placas foram colocadas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de 25+3 °C. Os dois tipos de extratos resultaram numa diminuição da oviposição e da emergência de *Z. subfasciatus*, independentemente da dosagem utilizada. Estes resultados indicam que os extratos de *C. substellata* atuaram sobre as fases imaturas de *Z. subfasciatus*, ou seja, apresentando efeito ovicida e larvicida. Novas pesquisas com os extratos obtidos do líquen *C. substellata* devem ser realizadas para fornecer subsídios para sua futura utilização no manejo de *Z. subfasciatus*.

Palavras-chave: Líquen, Ácido úsnico, Repelência, Bruchinae, Controle alternativo.

ABSTRACT

The beetle *Zabrotes subfasciatus* is considered a major pest of stored beans *Phaseolus vulgaris*, reducing weight and grain quality as well as the germination of seeds. The search for alternative control methods for handling these insects is being increasingly used due to contamination caused by synthetic insecticides. Knowing the diversity of substances liquênicas and knowledge of its biological activity, the present work was to study the bioactivity of extracts of the lichen *Cladonia substellata* in *Z. subfasciatus*, evaluating mortality, emergence and oviposition of insects. For this, we used the meeting and ethereal extracts of *C. substellata*, which were obtained by successive extractions of exhaustion of the stem liquênico. The extracts were tested separately at concentrations of 0,02 and 0,002 mg / mL on the beans. Ten beans were placed in Petri dishes by adding 5 mL concentration in three replicates, with subsequent release of 10 adult insects of *Z. subfasciatus*. These plates were placed in a climatic chamber of BOD, a temperature of 25 +3 ° C. Both types of extracts resulted in decreased oviposition and emergence of *Z. subfasciatus*, regardless of the dose used. These results indicate that extracts of *C. substellata* acted on the immature stages of *Z. subfasciatus*, ie having ovicidal and larvicidal effect. New research with extracts of the lichen *C. substellata* should be taken to provide subsidies for their future use in the management of *Z. subfasciatus*.

Keywords: lichen, usnic acid, repellency, bruchinae, alternative control.

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum *Phaseolus vulgaris* L., pertence à classe Dicotyledoneae, família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, e vem sendo intensamente estudado na América Latina por ser considerada fonte principal de proteína e por fazer parte da alimentação da população. Sua importância alimentícia se deve, em parte, ao menor custo de produção em relação aos da proteína de origem animal (Quintana et al., 2002). Das 55 espécies de feijão comum, *Phaseolus* spp., atualmente existem apenas 5 que são cultivadas: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, *P. acutifolius* var. *latifolius* e *P. polyanthus* (Vieira et al., 1999). Entretanto, *P. vulgaris* é a espécie com a maior expressão econômica.

Dentre as pragas que atacam o feijão armazenado merece destaque o coleóptero *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Chrysomelidae: Bruchinae). Este inseto é originário da América Central e espalhou-se para regiões tropicais e subtropicais através da comercialização de sementes, provocando injúrias nos grãos. Considerado praga primária, pois consegue penetrar no interior do grão, onde completa seu ciclo de desenvolvimento, este coleóptero pode danificar o grão reduzindo sua qualidade nutritiva, elevar a umidade e a temperatura da massa de grãos, favorece a entrada de outras pragas e a ocorrência de doenças e, ainda, diminuir o poder de germinação das sementes (Magalhães & Carvalho, 1988; Hill, 1990; Gonzáles-Rodríguez et al., 2002; Barbosa 2010).

O controle de pragas de feijão armazenado é realizado, em geral, através da fumigação ou pulverização dos grãos por produtos químicos antes da armazenagem. Segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012), estão registrados para o controle de *Z. subfasciatus* os inseticidas Fermaq (Fosfeto de Magnésio), Fertox (Fosfeto de Alumínio) e Phostoxin (Fosfeto de Alumínio), que são pastilhas fumigantes, e K-Obiol 2P (Deltametrina), que é um pó seco.

Formas alternativas para o uso de métodos químicos convencionais estão sendo estudadas, pressionada pela cobrança da população por métodos menos agressivos ao ambiente e que deixem menos resíduos no produto final (Lara, 1991). Neste sentido, produtos como óleos essenciais, pós e extratos de espécies vegetais estão sendo cada vez

mais utilizados. Em geral, os produtos de origem vegetal com atividade inseticida podem agir por contato, inalação ou ingestão, e podem causar mortalidade, deformações em diferentes estágios de desenvolvimento, repelência, deterrência de alimentação e oviposição, e regulação de crescimento (Don Pedro, 1989; Karr & Coats, 1988; Rice & Coats, 1994; Oliveira & Vendramim, 1999; Lee et al., 2003).

Estudos recentes também têm demonstrado que os metabólitos secundários produzidos por líquens apresentam efeitos inseticidas (Bombuwala, 2001; Balaji et al., 2007; Cetin et al., 2008; Sahib et al., 2008), o que tem despertado cada vez mais o interesse por esse grupo biológico.

Os líquens são organismos simbióticos resultantes da associação estável e duradoura entre fungos (micobionte) e algas (fotobionte). Além da reconhecida atividade inseticida, os líquens apresentam inúmeras utilidades industriais e medicinais, com ação sobre bactérias e fungos, efeitos alelopáticos e implicações na germinação de sementes (Lawrey, 1977; Costa-Filho et al., 1991; Yano, 1994).

No Nordeste do Brasil são encontradas várias espécies de líquens, cujos metabólitos possuem comprovada ação farmacológica. Diversos compostos secundários de origem líquênica são conhecidos por apresentarem atividades biológicas variadas. Ao estudar espécies encontradas em solos arenosos de tabuleiros costeiros do Estado da Paraíba, Pereira et al. (1996) detectaram ação antimicrobiana em extratos orgânicos de *Cladonia substellata* e *Cladonia crispatula*, identificando o ácido úsnico como o princípio ativo das espécies.

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inseticida de extratos provenientes do líquen *C. substellata* sobre o coleóptero *Z. subfasciatus* em feijão armazenado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia/Ecologia, da Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.1. Coleta e armazenamento do material liquênico.

As amostras do líquen *Cladonia substellata* foram coletadas no município de Alhandra-PB. Uma parte do material coletado foi acondicionado em caixa de papelão à temperatura ambiente, e outra parte foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os líquens foram identificados através de caracteres morfológicos e químicos do talo, segundo Pereira et al. (1996).

2.2. Obtenção dos extratos

Os líquens passaram por um processo de limpeza manual utilizando-se pinças para retirada de contaminantes como sementes, areia, resíduos vegetais, dentre outros, que pudessem de alguma maneira interferir na obtenção dos extratos. Posteriormente, o material foi submetido à extrações sucessivas por esgotamento, à temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$).

Para obtenção do **extrato etéreo** foi utilizado 8g do talo *in natura*, sendo o material colocado em um béquer contendo 100 mL do solvente éter etílico. Posteriormente essa amostra foi submetida à agitação mecânica por uma hora e, em seguida, filtrada em papel filtro. O extrato obtido foi concentrado até secagem em banho-maria (40°C) acoplado a rotaevaporador. Este processo foi repetido até o esgotamento do talo.

Para o **extrato reunido**, a partir de 8g do talo *in natura* foram utilizados os solventes: éter, clorofórmio e acetona sendo repetido o processo citado acima até o esgotamento do talo.

2.3. Armazenamento e criação dos insetos

Os insetos *Zabrotes subfasciatus* foram criados em grãos de feijão, acondicionados em recipientes plásticos fechados com tampa perfurada e revestida com tecido fino para permitir as trocas gasosas. Foram confinados durante sete dias para efetuarem a postura, em seguida retirados e os recipientes estocados até a emergência da geração F1. Este procedimento foi efetuado por sucessivas gerações, de modo a assegurar a quantidade de adultos necessários para a execução dos experimentos.

As criações foram mantidas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de 25 ± 3 °C, e à temperatura ambiente em condições de laboratório.

2.4. Ensaio biológico para *Zabrotes subfasciatus*

Os extratos do líquen *C. substellata* foram dissolvidos em clorofórmio e obtidas as concentrações de 0,02 e 0,002 mg/mL. Para a testemunha foi utilizado apenas clorofórmio.

Estas concentrações foram utilizadas para avaliar o potencial inseticida (efeito sobre a mortalidade e a oviposição) e, ainda, para avaliar o efeito repelente (teste com chance de escolha) sobre o coleóptero *Z. subfasciatus*.

2.4.1. Efeito inseticida de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Zabrotes subfasciatus*. Teste sem chance de escolha.

Os extratos testados nesse experimento foram: extrato etéreo e extrato reunido. Os extratos foram testados, separadamente, nas dosagens de 0,02 e 0,002 mg/mL sobre os grãos de feijão. Dez grãos de feijão foram colocados em placas de Petri, adicionando-se 5mL da concentração, em três repetições, onde posteriormente foram colocados 10 insetos adultos de *Z. subfasciatus*. As placas de Petri foram cobertas com filme PVC onde foram feitos pequenos orifícios com alfinete para permitir trocas gasosas com o exterior. Estas placas foram acondicionadas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de 25 ± 3 °C.

Durante sete dias foram efetuadas contagens dos insetos para avaliar a mortalidade, sendo em seguida efetuada a contagem de ovos nos grãos. Após esta avaliação, estes grãos foram acondicionados em recipientes plásticos e após 30 dias de confinamento foram quantificados os adultos emergidos para avaliar a persistência dos extratos liquênicos sobre os insetos. O experimento foi feito no delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (duas doses e testemunha). Os resultados foram submetidos à análise de regressão e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.4.2. Efeito repelente de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Zabrotes subfasciatus*. Teste com chance de escolha.

Também foram utilizados os extratos etéreo e reunido de *C. substellata*, nas doses de 0,02 e 0,002 mg/mL sobre grãos de feijão.

O experimento foi conduzido em arenas compostas de dois recipientes plásticos, interligados simetricamente a uma caixa central por dois tubos plásticos. Em um dos recipientes plásticos foram colocados 10 grãos de feijão tratados com um dos extratos, e no outro recipiente a mesma quantidade de feijão sem o extrato (testemunha). Na caixa central foram liberados 10 insetos adultos de *Z. subfasciatus*.

Cada extrato foi testado separadamente, constando cada experimento de dois tratamentos (extrato e testemunha) e 3 repetições. Estas unidades experimentais foram acondicionadas em câmara climática do tipo B.O.D., à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

Após sete dias da liberação na arena central, os insetos atraídos para cada tratamento (extrato ou testemunha) foram contabilizados para a avaliação da repelência. Em seguida, os insetos foram removidos e os grãos acondicionados outros recipientes plásticos por 30 dias, até a emergência de novos adultos.

O Índice de Repelência (IR) foi calculado pela fórmula: $IR = 2G / (G + P)$.

Onde:

G = % ovos e insetos emergidos no tratamento;

P = % de ovos e insetos emergidos na testemunha.

Os valores de IR variam entre zero e dois.

Onde:

IR = 1 indica repelência semelhante entre o tratamento e a testemunha (tratamento neutro);

IR > 1 indica menor repelência do tratamento em relação à testemunha (tratamento atraente);

IR < 1 corresponde à maior repelência do tratamento em relação à testemunha (tratamento repelente).

O intervalo de segurança utilizado para considerar se o extrato é ou não repelente foi obtido a partir da média dos IR (índice de repelência) e do respectivo desvio padrão (DP), ou seja, se a média dos IR for menor que $1 - DP$, o extrato é repelente; se a média for maior que $1 + DP$ o extrato é atraente e se a média estiver entre $1 - DP$ e $1 + DP$ o extrato é considerado neutro. Este índice é uma adaptação da fórmula citada por Lin et al. (1990), para o índice de consumo.

A porcentagem de repelência dos extratos foi calculada usando-se a fórmula adaptada de Obeng-Ofori (1995): $PR = [(NC - NT) / (NC + NT) \times 100]$.

Onde:

PR = porcentagem de repelência;

NC = número de insetos atraídos na testemunha;

NT = número de insetos atraídos no extrato.

O percentual médio de redução de emergência foi calculado pela mesma fórmula, fazendo apenas as devidas adaptações, ou seja, trocando-se a média de insetos atraídos pela média de insetos emergidos, respectivamente, na testemunha e no tratamento com o extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito inseticida de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Zabrotes subfasciatus*. Teste sem chance de escolha.

Não foram observadas diferenças significativas para a mortalidade de adultos de *Z. subfasciatus* entre os extratos etéreo e reunido, utilizados e a testemunha ($F= 2, 85, P>0,05$) e ($F= 1,00, P>0,05$) respectivamente para os extratos.

Recentemente, alguns pesquisadores têm relatado o efeito inseticida de metabólitos secundários obtidos de líquens. Coelho et al (2007) observaram efeitos sobre o crescimento larval e a mortalidade de *Anagasta kuehniella*, comprovando a atividade inseticida da lectina de *Annona coriacea*. Cetin et al. (2008) observaram 100% de mortalidade em larvas do mosquito *Culex pipiens* submetidos ao ácido úsnico. Silva et al. (2009) relatam que houve atividade da lectina do líquen *Cladonia veticillares*, na indução da mortalidade no cupim *Nasutitermes corniger*. Yildirim et al (2012) avaliaram o efeito inseticida de extratos (ácido difractáico e úsnico) do líquen *Usnea longissima* sobre o coleóptero *Sitophilus granarius* e observaram que a atividade inseticida aumentou com a concentração e com o período de exposição, causando alta mortalidade nos coleópteros.

Com relação à oviposição, pode-se observar que com o aumento das dosagens utilizadas houve uma diminuição no número de ovos postos por fêmeas adultas de *Z. subfasciatus* em grãos de feijão tratados com os extratos de *C. substellata* (**Figura 1**).

Também foi observado que o aumento das dosagens utilizadas ocasionou uma diminuição no número de insetos emergidos em grãos de feijão tratados com os extratos de *C. substellata* (**Figura 2**).

Este efeito apresentado pelos extratos obtidos de *C. substellata* sobre a oviposição e a emergência de *Z. subfasciatus* merece atenção e estudos mais aprofundados, pois o extrato etéreo (**Figura 4**) aparentemente proporcionou uma menor oviposição e emergência, em termos quantitativos, que o extrato reunido (**Figura 3**).

Sabe-se que os produtos alternativos de origem vegetal, como óleos e pós, causam vários efeitos sobre as pragas de grãos armazenados e que, de um modo geral, provocam mortalidade, deterrência na alimentação, repelência e redução na oviposição, afetando o

crescimento e o desenvolvimento dos insetos (Huang et al., 1999; Weaver et al., 1994; Pascual-Villalobos & Ballesta-Costa, 2003). Vários óleos se mostraram eficientes no controle de insetos de produtos armazenados. Don-Pedro (1989) observou que a morte de ovos de *Callosobruchus maculatus* em grãos de caupi se deve à falta de atividade respiratória e à acumulação de metabólitos tóxicos, como resultado de um efeito de barreira. Hall & Harman (1991) observaram que o tratamento de sementes de feijão com óleo de soja (*Glycine max*) resultou em redução da oviposição e da emergência de adultos de *Z. subfasciatus*. Os óleos vegetais de *Eucaliptus globulus*, *Lippia gracillis* e *Azadirachta indica* foram eficazes na mortalidade e na redução da emergência de *Sitophilus zeamais* em milho armazenado (Coitinho et al., 2006). Os óleos de *Cymbopogon martini* e *Piper aduncum* provocaram mortalidade de 100% e reduziram o número de ovos viáveis e de adultos emergidos de *Z. subfasciatus* (Pereira et al, 2008).

Por outro lado, essas mudanças fisiológicas e comportamentais nos insetos também foram constatadas em várias pesquisas que utilizaram substâncias extraídas de líquens. As principais alterações observadas foram retardo no crescimento e alimentação das lagartas de *Lymantria díspar* (Bleweet & Cooper-Driver, 1990) e do coleóptero *Xyleborus fornicates* (Sahib et al, 2008), interrupção na formação de pupas de *Helicoverpa armigera* (Balaji et al., 2007) e mortalidade em mosquitos, cupins, percevejos e coleópteros (Cetin et al., 2008; Silva, et al, 2009; Silva, 2010; Yildirim et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a diminuição da oviposição resultou numa diminuição da emergência dos insetos, independente do extrato utilizado. Tanto o extrato reunido quanto o etéreo, obtidos de *C. substellata*, provavelmente estão apresentando efeito ovicida e larvicida, atuando sobre as fases imaturas de *Z. subfasciatus*. Tal fato pode estar relacionado à ação do ácido úsnico presente neste líquen, confirmado na análise de cromatografia em camada delgada (CCD) (Vide capítulo anterior), o qual não diferiu significativamente em quantidade entre os dois extratos. Tais indícios são importantes uma vez que as substâncias liquênicas podem estar ocasionando mudanças fisiológicas, como prolongamento das fases deste inseto, com provável interferência no crescimento, reprodução e metamorfose.

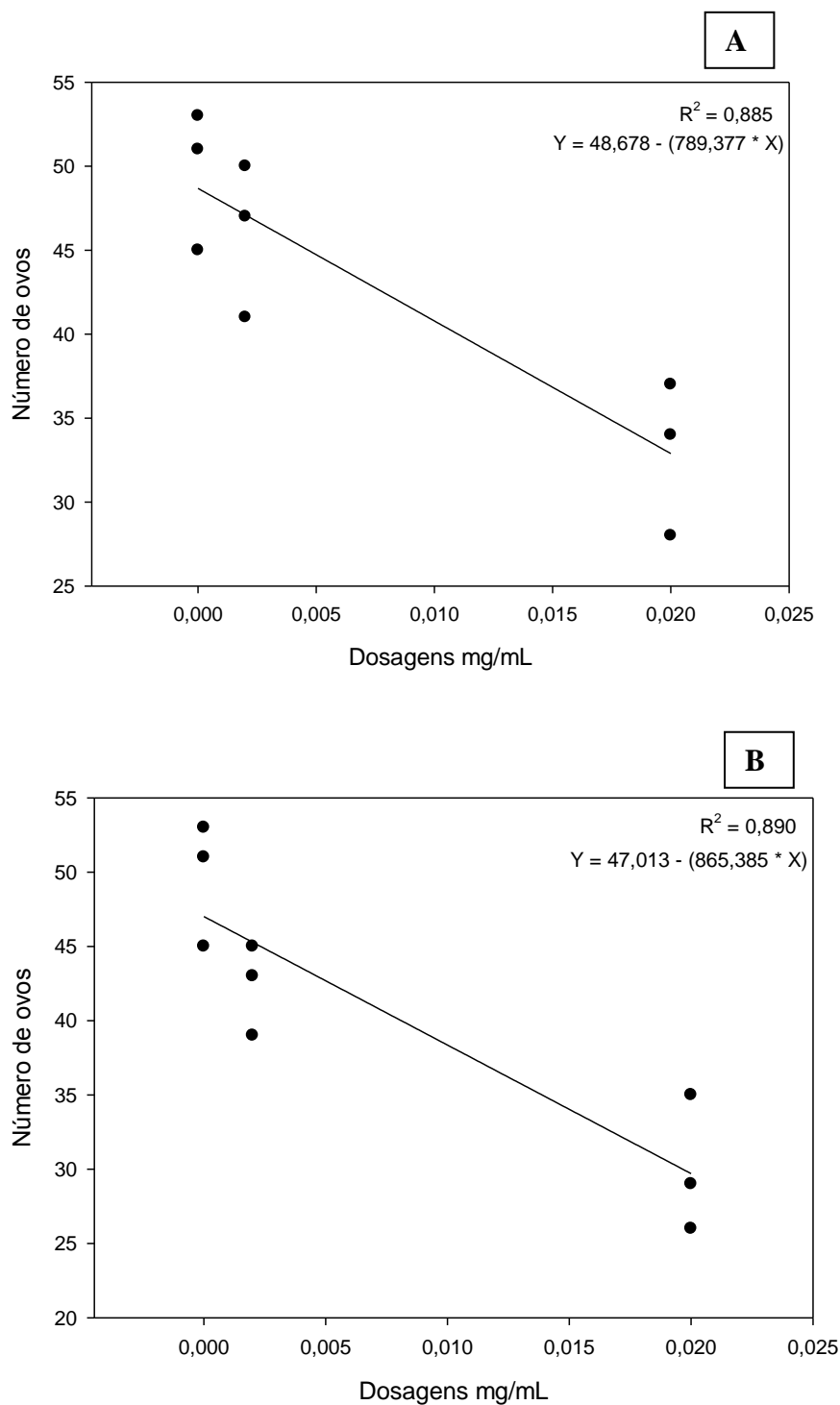


Figura 1: Oviposição de *Zabrotes subfasciatus* após 7 dias de contato direto com grãos de feijão *Phaseolus* sp. tratados com extratos de *Cladonia substellata*, nas dosagens de 0.002 e 0.02 mg/mL: **A) Extrato etéreo** ($y=48,678 - 788,377x$; $F=25,35$; $p<0,05$; $r^2=0,885$); **B) Extrato reunido** ($y=47,013 - 865,385x$; $F=26,72$; $p<0,05$; $r^2=0,890$).

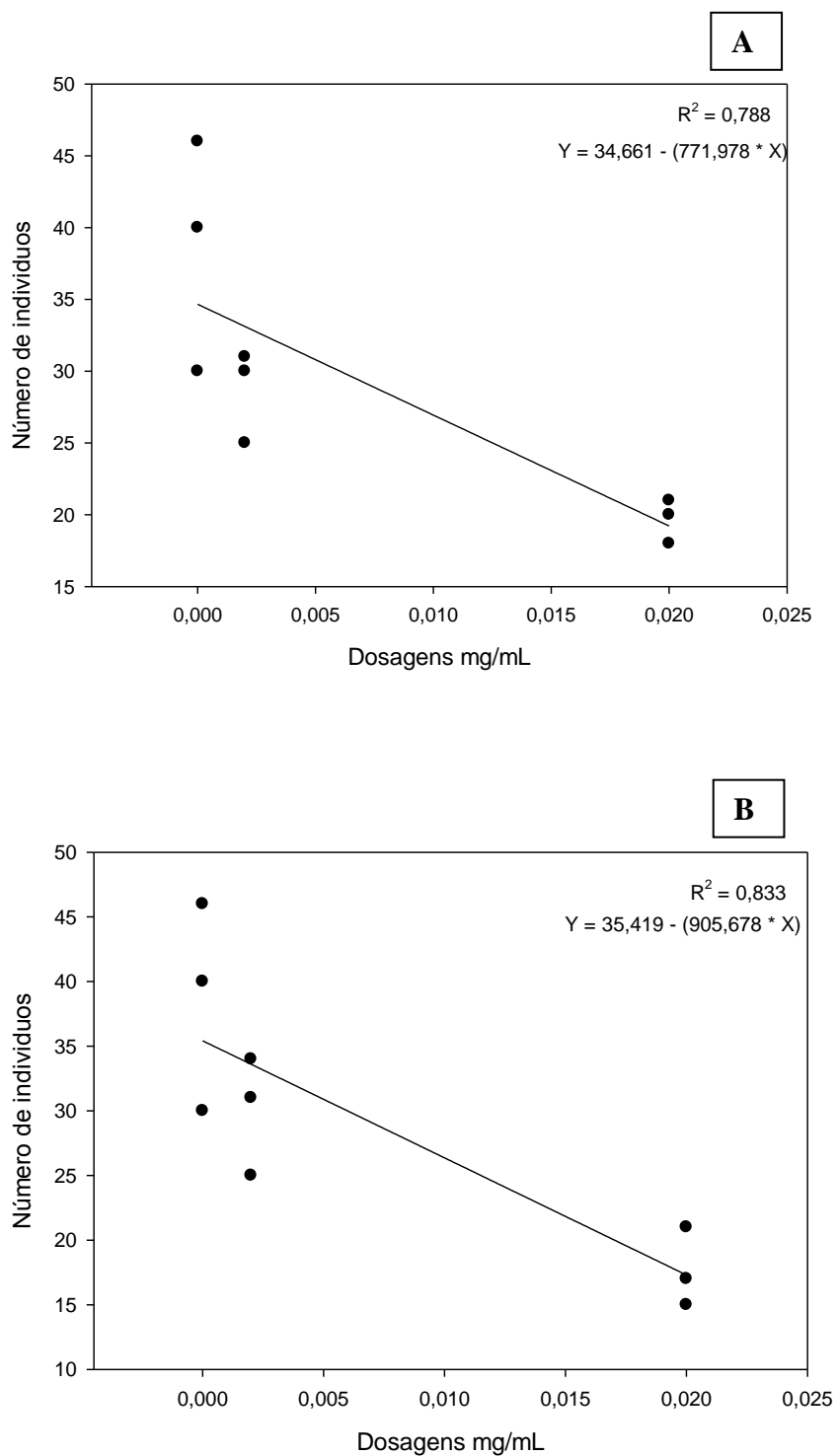


Figura 2: Emergência de *Zabrotes subfasciatus* após 7 dias de contato direto com grãos de feijão *Phaseolus* sp. tratados com extratos de *Cladonia substellata*, nas dosagens de 0.002 e 0.02 mg/mL: **A) Extrato etéreo** ($y=34,661 - 771,978x$; $F=11,49$; $p<0,05$; $r^2=0,788$); **B) Extrato reunido** ($y=35,419 - 905,678x$; $F=15,93$; $p<0,05$; $r^2=0,833$).

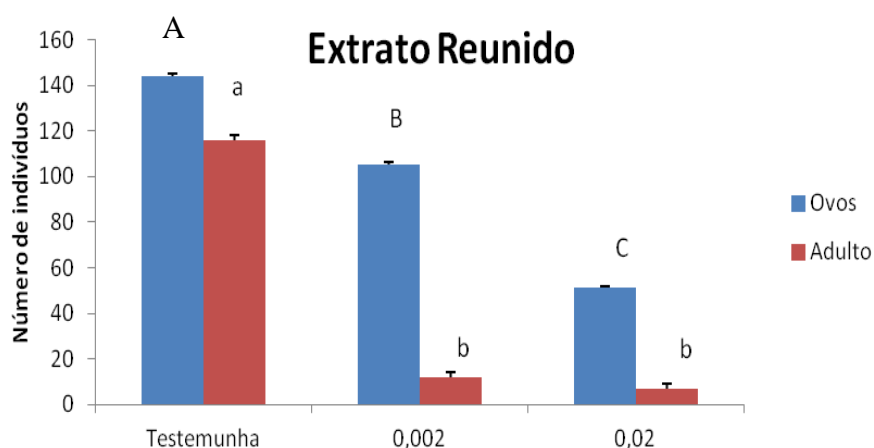


Figura 3: Oviposição de adultos de *Zabrotes subfasciatus* 7 dias de contato direto com o extrato reunido de *Cladonia substellata* e emergência de adultos nas dosagens 0,002 e 0,02 mg/mL em grãos de feijão *Phaseolus* sp. Teste sem chance de escolha. (Temp.: $25 \pm 0,3^\circ\text{C}$).

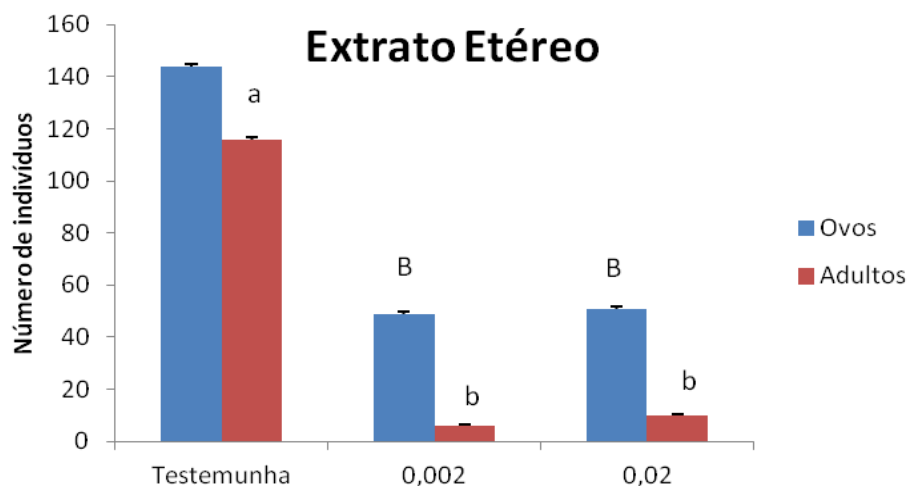


Figura 4: Oviposição de adultos de *Zabrotes subfasciatus* 7 dias de contato direto com o extrato etéreo de *Cladonia substellata* e emergência de adultos nas dosagens 0,002 e 0,02 mg/mL em grãos de feijão *Phaseolus* sp. Teste sem chance de escolha. (Temp.: $25 \pm 0,3^\circ\text{C}$).

Efeito repelente de extratos de *Cladonia substellata* sobre *Zabrotes subfasciatus*. Teste com chance de escolha.

Foi observado que menos adultos de *Zabrotes subfasciatus* foram atraídos para grãos de feijão tratados com os extratos de *Cladonia substellata*, nas doses de 0,02 e de 0,002 mg/mL, do que para grãos não tratados (testemunha) (**Tabela 1**). Assim, tanto o extrato reunido quanto o etéreo foram considerados repelentes, independentemente da dosagem utilizada.

Em relação ao índice de repelência, o extrato reunido mostrou-se repelente na dose de 0,02 mg/mL, e neutro na dose de 0,002 mg/mL, o que foi confirmado pelo índice de segurança. Por outro lado, o extrato etéreo foi repelente aos adultos de *Z. subfasciatus* nas duas dosagens utilizadas (**Tabela 1**).

Pode-se observar, ainda, que os dois extratos utilizados foram mais eficientes na dose de 0,02 mg/mL, onde apresentaram percentuais de repelência superiores a 40% e que implicaram em altas reduções na emergência de *Z. subfasciatus*. Já na menor dose (0,002 mg/mL) tanto o extrato reunido quanto o etéreo apresentaram menor repelência e proporcionaram baixa redução da emergência dos insetos (**Tabela 1**).

Resultados semelhantes de repelência foram observados para diversos tipos de pós (*Chenopodium ambrosioides*, *Piper nigrum* e *Cymbopogon* sp.) por Araújo (2010) e de óleos (*Azadirachta indica*) por Oliveira & Vendramim (1999). Da mesma forma, Brito (2011) observou que os óleos essenciais de *Myrocarpus frondosus*, *Baccharis trimera*, *Cymbopogon winterianus*, *Copaifera landesdorffi* e *Pimpinella anisum* apresentaram efeito repelente sobre *Z. subfasciatus*.

Sabe-se que a ação repelente é uma propriedade importante que deve ser considerada no controle de pragas de grãos armazenados, pois quando a repelência do óleo é alta espera-se que a infestação seja menor, pois há uma redução na postura e no número de insetos emergidos (Coitinho, 2006).

No presente estudo, foi constatado que extratos obtidos do líquen *C. substellata*, também apresentam propriedade repelente para *Z. subfasciatus*, o que pode indicar sua

futura utilização no manejo integrado deste coleóptero em feijão armazenado após estudos mais aprofundados.

TABELA 1- Porcentagem de insetos atraídos, Índice de repelência, Porcentagem de repelência de extratos do líquen *Cladonia substellata*, nas doses de 0,02 e 0,002 mg/mL, e Redução da emergência de adultos de *Zabrotes subfasciatus*. Teste com chance de escolha (Temp.: 25±3°C).

Tratamento	Adultos Atraídos (%)		IR±DP ¹	C ²	IS ³	Repelência (%)	Redução da Emergência (%)
	Testemunha	Liquen					
0.02mg/mL							
Extrato Reunido	50	38	0,8401±0,1636	R	R	42,8	40,8
Extrato Etéreo	40	33	0,7326±0,1110	R	R	33,3	50,6
0.002mg/ mL							
Extrato Reunido	47	40	0,9010±0,0372	R	N	11,11	11
Extrato Etéreo	42	38	0,8632±0,0077	R	R	14,3	29,8

¹ Índice de Repelência e Desvio Padrão.

² C= Classificação: A= Atraente; R= Repelente e N= Neutro

³ Intervalo de Segurança, onde R= Repelente, N= Neutro e A= Atraente.

4. CONCLUSÕES

Os extratos etéreo e reunido obtidos do líquen *Cladonia substellata*, aplicados nas doses de 0,002 e 0,02 mg/mL, reduziram a oviposição de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* e a emergência de adultos deste inseto em feijão *Phaseolus* sp. armazenado.

Os extratos etéreo e reunido obtidos do líquen *C. substellata* apresentaram efeito repelente para o coleóptero *Z. subfasciatus*, independentemente das dosagens utilizadas.

Provavelmente o ácido úsnico, presente nos dois tipos de extratos utilizados, apresentou efeito ovicida/larvicida sobre *Z. subfasciatus*, implicando na redução da progênie deste inseto.

Mesmo diante de resultados promissores, novos estudos devem ser realizados com os extratos utilizados, inclusive com outras dosagens, para avaliar, por exemplo, possíveis efeitos sobre a germinação e a viabilidade de sementes de feijão, sua persistência em diferentes períodos de armazenamento e fornecer subsídios para sua futura indicação para o uso por pequenos ou médios produtores.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A.M.N. **Bioatividade de espécies vegetais em relação a *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1983) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Universidade Federal de Alagoas. 2010. Dissertação de Mestrado.
- BALAJI, P.; MALARVANNAM, S.; HARIHARAN, G.N. Efficacy of *Roccella montagnei* extracts on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology**, v. 4, p.248-252. 2007.
- BARBOSA, D.R.S. **Efeitos da radiação microondas nas diferentes fases do ciclo evolutivo de *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) visando seu controle em feijão-caupi**. Universidade Federal do Piauí, 2010. Dissertação Mestrado.
- BLEWITT, M. R e COOPER-DRIVER, G. The effects of lichen extracts on feeding by gypsy moths (*Lymantria dispar*). **The Bryologist**. 93(3), p.220-221,1990.
- BOMBUWALA, B.D.K. **Isolation and bio activity studies of lichen substances from Sri Lankan lichens**. News Internet Edition. Department of Chemistry. University of Peradeniya, Sri Lanka. 2001. Ph.D. Thesis.
- BRITO, S.S.S. Avaliação do potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) em feijão armazenado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2011, p. 45. Monografia.
- CETIN, H., TUFAN-CETIN, O., TURK, A.O., TAY, T., CANDAN, M., YANIGOKLU, A., SUMBUL, H. Insecticidal activity of major lichen compounds, (α)- and (β)-usnic acid, against the larvae of the house mosquito, *Culex pipiens* L. **Parasitology Research** 102, p. 1277–1279. 2008.
- COELHO, M.B., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra*

- cephalonica (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology C** 146, p. 406–414. 2007.
- COITINHO, R.L.B. de.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, C.A.G. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Revista Caatinga** (Mossoró, Brasil), v.19, n.2, p.176-182. 2006.
- COSTA-FILHO, L. **Atividade antimicrobiana de substâncias liquênicas**. Universidade Federal de Pernambuco. 1991, págs. 1-61. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas.
- DON-PEDRO, K.N. Mode of action of fixed oils against eggs of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Pesticide Science**, v.26, p.107-116. 1989.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A., BENREY, B., CALLEJAS, A., OYAMA, K. **Inter and intraspecific genetic variation and differentiation in the sibling bean weevils *Zabrotes subfasciatus* and *Z. sylvestris* (Coleoptera: Bruchidae) from Mexico.**, v. 92, 2002, p. 185-189. (Bulletin of Entomological Research).
- HALL, J.S.; HARMAN, G.E. Efficacy of oil treatments of legume seeds for control of *Aspergillus* and *Zabrotes*. **Crop Protection**, Oxford, v. 10, p. 315-319. 1991.
- HILL, D. S. **Pests of stored products and their control**. New York: CRC Press. 1990, p. 274.
- KARR, L.L.; COATS, J.R. Insecticidal properties of d-limonene. **Journal of Pesticide Science**, v.13, p.287-289. 1988.
- LARA, F.M. **Princípios de Resistência de Plantas a Insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.
- LAWREY, J. D. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia* species. **Bulletin Torrey Botanical Club**, v. 104, n. 1, p. 49-52. 1977.

- LEE, S.; PETERSON, C.J.; COATS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.77-85. 2003.
- LIN, H., KOGAN, M., FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparisons of inducing factors. **Environmental Entomology**. v. 19, p. 1852 – 1857. 1990.
- MAGALHÃES, B.P., CARVALHO, S.M. INSETOS ASSOCIADOS À CULTURA. IN: ZIMMERMAN, M.J., YAMADA, M.R.T. (ed). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba. 1988, p. 573-589. (Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fosfato).
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 04 Dezembro. 2012.
- OLIVEIRA, J.V.; VENDRAMIM, J.D. **Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (BOH.) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro**. v. 28, n. 3, 1999, p. 549-555. (Anuais da Sociedade Entomológica Do Brasil, Londrina).
- PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; BALLESTA-ACOSTA, M. C. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 7, p. 673-679. 2003.
- PEREIRA, E. C. et al. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: *Cladoniacorallifera* e *Cladonia substellata*. Ver . UA. Série: **Ciências Biológicas**, Manaus, v.1, p. 65-77, 1996.

- PEREIRA, A.C.R.L.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, C.A.G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus Maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna Unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 717-724. 2008.
- QUINTANA, H. C. et al. Evaluación de la calidad de la proteína de 4 variedades mejoradas de frijol. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v.14, p. 22-27, 2002.
- RICE, P.J.; COATS, J.R. Insecticidal properties of several of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern maize rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.1172-1179. 1994.
- SAHIB, K., S. KULARATE, S. KUMAR AND V. KARUNARATE. Effect of (+)- usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. **Journal of the National Science Foundation**, v. 36, p. 335–336. 2008.
- SILVA, G.N., R.A. SA, T.H. NAPOLEAO, F.S. GOMES, N.D.L. SANTOS, A.C. ALBUQUERQUE, H.S. XAVIER, P.M.G. PAIVA AND M.T.S. CORREIA. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Inter. biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, 334–340. 2009.
- SILVA, R.C.S. **EFEITO DO ÁCIDO ÚSNICO DE *Cladonia substellata* VAINIO SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DO *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae)**. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2010. 35p. Monografia.
- VIEIRA, C., BORÉM, A., RAMALHO, M. A. P. **Melhoramento do feijão**. In: BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. 1999. Viçosa.

- WEAVER, D. K., C. D. WELLS, F. V. DUNKELL, W. BERTSCH, S. E. SING & S. SHIHARAN. Insecticidal activity of floral, foliar, and root extracts of *Tagetes minuta* (Asterales: Asteraceae) against adult Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 87, p.1718-1725. 1994.
- YANO, A. M. **Atividade biológica de *Cladonia verticillaris* e *Cladonia substellata* sobre a germinação e desenvolvimento da plântula de *Allium cepa***. Universidade Federal de Pernambuco. 1994. 126p. Dissertação- Mestrado.
- YILDIRIM, E., A. ASLAN, B. EMSAN, A. CAKIR AND S. ERCISLI. Insecticidal effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, p.303–306. 2012.