

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Yuri Machado

Prospecção Química de Genótipos de Milho com Resistência à *Spodoptera frugiperda*

Belo Horizonte
2010

UFMG/ICEx/DQ 823^a

D. 475^a

YURI MACHADO

**PROSPECÇÃO QUÍMICA DE GENÓTIPOS DE MILHO
COM RESISTÊNCIA A *SPODOPTERA FRUGIPERDA***

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

Belo Horizonte

2010

M149p Machado, Yuri.
2010 Prospecção química de genótipos de milho com
D resistência à spodoptera frugiperda / Yuri Machado.
2010.

xiv, 94 f.; il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Co-orientador: Paulo Afonso Viana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Flavonóides - Teses
3. Milho - Teses 4. Spodoptera frugiperda - Teses
5. Cromatografia líquida de alta eficiência I.
Takahashi, Jacqueline Aparecida, Orientadora II.
Viana, Paulo Afonso, Co-orientador III. Título.

CDU 043



"Prospecção Química de Genótipos de Milho com Resistência à *Spodoptera frugiperda*"

Yuri Machado

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

J. Takahashi

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Paulo Afonso Viana

Dr. Paulo Afonso Viana - Co-Orientador
EMBRAPA

Lucienir Pains Duarte

Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Antônio Flávio de Carvalho Alcântara

Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2010.

**Este trabalho foi desenvolvido sob orientação da
Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi e co-
orientação do Dr. Paulo Afonso Viana.**

“Não concordo com o que dizes, mas defendo até a morte o direito de o dizes.”

Voltaire

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida, saúde e sabedoria.

Aos meus pais, Maria José e Luiz Carlos, grandes incentivadores dessa caminhada.

À minha irmã Júlia, pela confiança depositada.

À Roxane, meu amor, pelo carinho, dedicação e compreensão.

À professora Jacqueline, não só pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho, mas como pela paixão à pesquisa, convivência, amizade e serenidade.

Aos amigos Leonardo Tafas, Olintos, Magno, Elton, Tatiana e Paulo pelo companheirismo e os momentos de “tantas emoções” vividas durante a graduação.

Aos professores Délio Soares Raslan e Maria Auxiliadora Fontes Prado, pela paixão à Química Orgânica.

A Fabiana pelo auxílio no desenvolvimento de alguns testes.

Aos amigos e colegas de laboratório: Adriana, Esther, Lucas, Giovanni, Silmara, Leonardo, Mariana, William, Gabriela, Jociani, Karine, Alessandra, Tiago e Eduardo (*in memoriam*), pelo companheirismo e as tantas discussões fervorosas e divertidas por quais passamos.

À Vany Ferraz, pelas valiosas aprendizagens em cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao doutor Paulo Viana e equipe, pela fonte da pesquisa e cooperação neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química: Jose Souto (Jacaré), Rogério, Anderson, Arlete, Paulete e Kátia, pelos valiosos favores.

E às demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	XI
RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Milho.....	2
1.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	6
1.3 Manejo de pragas – enfoque em <i>Spodoptera frugiperda</i>	8
1.4 A utilização de cultivares resistentes.....	16
1.5 Quimiometria.....	18
CAPÍTULO 2.....	22
2. OBJETIVOS	23
CAPÍTULO 3.....	24
3. METODOLOGIA	25
3.1 Equipamentos, reagentes e materiais.....	25
3.1.1 Equipamentos	25
3.1.2 Reagentes e materiais	25
3.1.3 Material biológico	27
3.1.4 Soluções utilizadas	27
3.1.5 Aplicativos.....	28
3.2 Experimentos	28
3.2.1 Cultivares.....	28
3.2.2 Extração das folhas	30
3.2.3 Análise preliminar	31
3.2.4 Análise em cromatógrafo líquido – desenvolvimento do método.....	32
3.2.5 Curva de calibração do ácido clorogênico.....	34
3.2.6 Espectrometria de massas	35
3.2.7 Testes biológicos	36
3.2.8 Bioautografia	38
CAPÍTULO 4.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Extração das folhas e quantificação do ácido clorogênico	42
4.2 Ensaio dos efeitos do extrato sobre a lagarta-do-cartucho	55
4.3 Resultado da Bioautografia.....	60
4.2 ACP E AAH	61
CAPÍTULO 5.....	64

5. CONCLUSÕES	65
CAPÍTULO 6.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7. ANEXOS	79

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01.	<i>Zea mays</i> (L.) A – Exemplar de milho / B – Esquema da morfologia da planta03
FIGURA 02.	Exemplares de <i>Spodoptera frugiperda</i> A – lagarta/ B – mariposa (fase adulta)07
FIGURA 03.	Estrutura do Flocoumafeno (9)12
FIGURA 04.	Estrutura do ácido clorogênico (10), maisina (11) e rutina (12)13
FIGURA 05.	Estrutura de warburganal (13), muzigadial (14) e azadiractina (15)14
FIGURA 06.	Estrutura de DIMBOA (16)14
FIGURA 07.	Estruturas das seguintes substâncias: 3 α -(2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi)-4 α -formoxi-11-hidroxi-6,7-deidroeu-desman-8-ona (17) e 3 α -(2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi)-4 α ,7 α ,11-triidroxieudesman-8-ona (18)15
FIGURA 08.	Gráfico de componentes principais, adaptado de Hartings et al. (2008). As siglas referem-se a morfologias diversas como tamanho de folha e de planta20
FIGURA 09.	Dendograma extraído, adaptado para a língua portuguesa, de Hartings et al. (2008)20
FIGURA 10.	Cultivares do milho em estufa. À esquerda, cultivares infestados com a lagarta. À direita, cultivares controle.28
FIGURA 11.	Danos da lagarta-do-cartucho em um cultivar do milho29
FIGURA 12.	Cultivar de milho “controle”29
FIGURA 13.	Cromatoplaça dos extratos dos cultivares31
FIGURA 14.	Cromatograma do padrão ácido clorogênico 100 mg/mL42
FIGURA 15.	Cromatograma do extrato EN2, evidenciando o pico referente ao ácido clorogênico (seta em azul) e o respectivo espectro (seta vermelha).43
FIGURA 16.	Ionograma de Y01-EN1-1249
FIGURA 17.	Ionograma do tempo de retenção 17,8 min de Y01-EN1-1249
FIGURA 18.	Ionograma de Y01-SP1-1249

FIGURA 19.	Espectro de massas do tempo de retenção 17,5 min de Y01-SP1-1249
FIGURA 20.	Proposta para o mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico. Obtenção do íon molecular.50
FIGURA 21.	Proposta para o aparecimento do fragmento com m/z 162,951
FIGURA 22.	Proposta para o aparecimento do fragmento com m/z 191,851
FIGURA 23.	Bandeja onde foi realizado o teste com os extratos dos cultivares52
FIGURA 24.	Detalhes das células da bandeja: lagarta e fonte de alimentação52
FIGURA 25.	Duplicatas do teste com <i>C. cladosporioides</i> 0,5 x 10 ⁶ esporos por ml57
FIGURA 26.	Duplicatas do teste com <i>C. cladosporioides</i> 3,0 x 10 ⁵ esporos por mL57
FIGURA 27.	Duplicatas do teste com <i>A. flavus</i> 0,5 x 10 ⁶ esporos por mL57
QUADRO 01.	Classes e algumas substâncias com atividade inseticida10
GRÁFICO 01.	Área dos picos cromatográficos em função da concentração de ácido clorogênico45
GRÁFICO 02.	Análise de componentes principais dos 16 extratos utilizando dois componentes: PC1 (37,48%) e PC2 (15,23%)58
GRÁFICO 03.	Dendograma da classificação das amostras59

LISTA DE TABELAS

TABELA 01.	Maiores produtores de milho do mundo em 2007 (FAO, 2010)04
TABELA 02.	Cultivo no Brasil – “Commodities” mais importantes no país (FAO, 2010)04
TABELA 03.	Cálculos utilizados para o preparo das soluções padrão de ácido clorogênico.34
TABELA 04.	Componentes do meio utilizado como dieta para a lagarta-do-cartucho35
TABELA 05.	Massa e volume utilizados para a realização do teste biológico36
TABELA 06.	Massa de folha de cultivares utilizados para a extração e respectiva massa do extrato – primeira extração40
TABELA 07.	Massa de folha de cultivares utilizados para a extração e respectiva massa do extrato – segunda extração41
TABELA 08.	Produção média de extrato por massa42
TABELA 09.	Dados de área e tempo de retenção (t_R) dos picos referentes ao ácido clorogênico de cada extrato43
TABELA 10.	Dados obtidos para a obtenção da curva de calibração44
TABELA 11.	Quantificação do ácido clorogênico46
TABELA 12.	Valor P fornecido por teste t, ao nível de significância de 5%, em comparação de extrato infestado <i>versus</i> não infestado47
TABELA 13.	Redução percentual, da quantidade de ácido clorogênico do cultivar48
TABELA 14.	Médias dos valores coletados do ensaio biológico na lagarta-do-cartucho53
TABELA 15.	Classificação, em ordem crescente, do comprimento da lagarta54
TABELA 16.	Classificação, em ordem crescente, da largura da cápsula cefálica da lagarta55

LISTA DE SIGLAS

ACP	Análise de componente principal
AHA	Análise hierárquica de agrupamentos
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
EM	Espectrometria de massas
PEG	Polietilenoglicol
RMN	Ressonância magnética nuclear
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (extração em fase sólida)

RESUMO

O milho (*Zea mays L.*) é utilizado pelo ser humano há milênios, apresentando grande importância para a economia mundial como uma das principais fontes de alimentos. A busca do aumento da produtividade passa pela análise e combate dos fatores que contribuem para a sua queda. A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é a principal praga da produção de milho nos Estados Unidos e no Brasil, causando perdas que podem alcançar 37%. Neste trabalho, foram estudados genótipos de milho com resistência à lagarta.

Assim, os genótipos foram cultivados e divididos em dois grupos. Um deles foi utilizado como controle e o outro foi infestado com a lagarta-do-cartucho. Foram obtidos os extratos dos dois grupos de genótipos e os perfis cromatográficos por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo identificado por comparação com padrão e, posteriormente, por espectrometria de massas, o ácido clorogênico, descrito na literatura como substância com atividade deterrente alimentar. Os cromatogramas obtidos foram classificados utilizando métodos quimiométricos como a análise de componentes principais e análise hierárquica de agrupamentos. Em seguida, foram avaliadas as atividades dos extratos frente a *S. frugiperda* e a dois fungos fitopatogênicos.

A maioria dos genótipos apresentou redução da concentração de ácido clorogênico quando eram infestados pelo inseto. Além disso, alguns extratos de plantas infestadas apresentaram boa atividade contra a lagarta, indicando a síntese de uma ou mais substâncias que possam apresentar atividade. Essa alteração do perfil metabólico foi percebida na análise quimiométrica, onde alguns pares infestado-controle de genótipos apresentaram-se distintos. A interação entre inseto e a planta impactou na produção de metabólitos da última.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is used by the human being for ages, presenting great importance for the worldwide economy as one of the main food sources. The search of an increased productivity focus on the analysis and combat of the factors that contribute for the losses. Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) is the main plague of maize production in the United States and Brazil, causing losses that can reach 37%. In this work, genotypes of maize with resistance to the worm were studied. The genotypes were cultivated and divided in two groups. One of them was used as a control and the other was infested with the fall armyworm. The extracts of the two groups of genotypes were prepared and their chromatographic profiles were taken by high-pressure liquid chromatography, being identified by comparison with a standard and, later, by mass spectrometry, as chlorogenic acid, described in literature as a substance with deterrent activity. The chromatograms obtained were classified using quimiometry methods like main component analysis and hierarchic analysis of groupings. After that, the activities of extracts were evaluated towards *S. frugiperda* and two phytopathogenic fungi. The majority of the genotypes presented reduction of chlorogenic acid contents when they were infested by the insect. Moreover, some extracts of infested plants had presented good activity against the worm, indicating the synthesis of one or more bioactive substances. This alteration of the metabolic profile was perceived in the quimiometric analysis, where some pairs of infested-control genotypes had been presented distinct. The interaction between insect and the plant impacted in the metabolites production of the last group.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Milho

O milho (*Zea mays L.*) é utilizado na alimentação humana há milênios. Análises arqueológicas e filogenéticas sugerem que a domesticação da espécie começou há 6000 anos. Oriunda da região mesoamericana, o milho difundiu-se pelo mundo após a descoberta do continente americano pelos europeus (*Australian Government, 2008*).

A espécie apresenta ampla importância comercial. Empregada na alimentação humana, utilizada na forma natural ou processada, derivados do preparo caseiro e/ou industrial como pamonha, angu, farofa, bolo, xarope de glicose e bebidas, dentre outros (Cimilho, 2010). Na alimentação animal é usada sob a forma de ração, sendo presente também na indústria de papéis. Nos Estados Unidos, é usada como principal matéria-prima de etanol, principal biocombustível daquele país (Kim e Dale, 2004; Kim e Dale, 2005). Mais de 10 bilhões de galões de etanol são produzidos a partir do milho e de fontes como cana-de-açúcar e beterraba (Yuan *et al.*, 2008).

O nome do gênero *Zea* vem do grego *zea* que significa cereal ou grãos. O epíteto específico *mays* é derivado da palavra *maiz* ou *mahiz*, palavra Arawak (língua dos primeiros nativos encontrados por Cristovão Colombo), usada nas Américas para descrever a planta (*Australian Government, 2008; Encyclopedia Britannica, 2010*).

Quanto a sua classificação taxonômica, origina-se da tribo Andropogoneae, subfamília Panicoideae da família Poaceae. Cinco espécies fazem parte do gênero *Zea*. A espécie *Zea mays* contém quatro subespécies descritas: *Zea mays ssp huehuetenangenses*, *Zea mays ssp mays*, *Zea mays ssp mexicana* e *Zea mays ssp parviglumis*. *Zea mays ssp mays* é a única espécie cultivada. As outras espécies são gramíneas selvagens (*Australian Government, 2008*).

Tipicamente, o milho apresenta altura entre um a quatro metros. É uma gramínea anual C₄, utilizando o dióxido de carbono de forma mais eficiente do que plantas C₃. Nas plantas C₄, a primeira substância estável é uma com quatro carbonos, enquanto nas C₃, é com três carbonos. Possui número de cromossomos equivalente a $2n = 20$ e um total de genes entre 42.000 a 56.000. Tem alta demanda por nutrientes, especialmente nitrogênio, fósforo e potássio e requer temperaturas entre 25 e 30 °C e noites frescas. A espécie pode desenvolver-se em diversos ambientes, temperado, subtropical e tropical, e

altitudes, desde o nível do mar até 3.800 m do nível do mar (Australian Government, 2008).

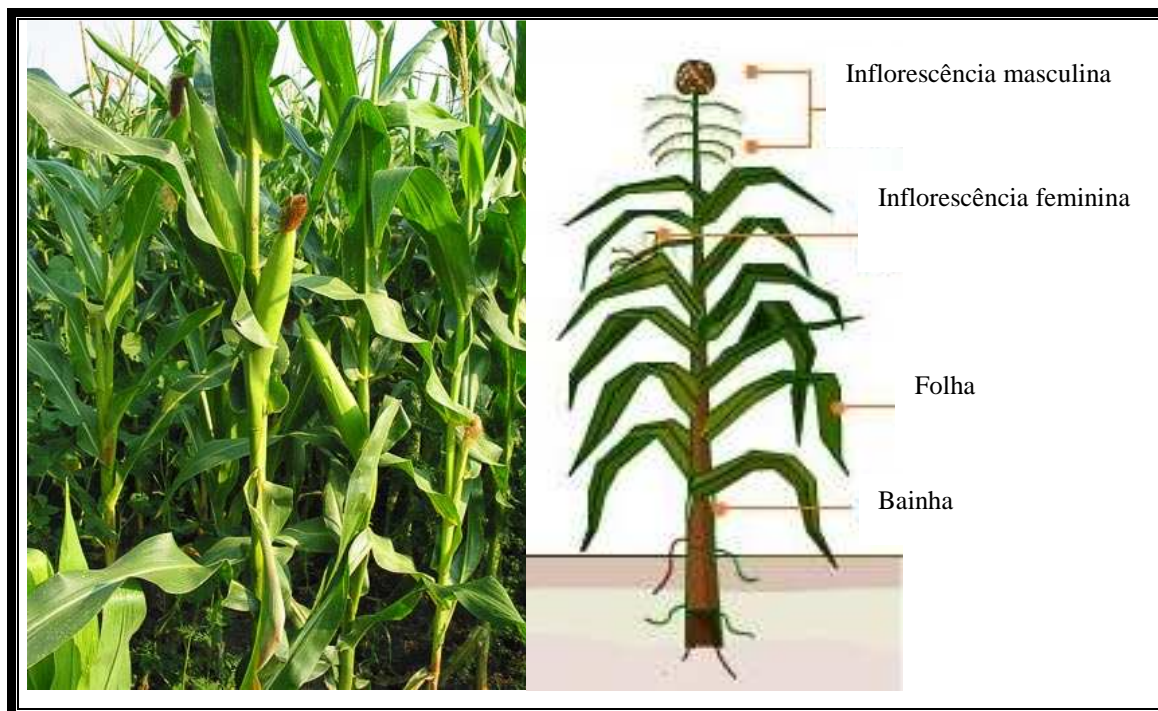


FIGURA 01 – *Zea mays* (L.)

A – Exemplar de milho / B – Esquema da morfologia da planta

Disponível em: A <http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Zea_mays_K/>

B: <<http://www.tutorvista.com/topic/science-form-5-notes>>

Segundo Lima *et al.* (2008), “a semeadura ocorre em praticamente todos os dias do ano e nas mais diferentes condições ambientais e de manejo. Dessa forma, são necessários vários cultivares para atender às necessidades dos produtores, as quais diferem em um conjunto de caracteres, dentre os quais podem ser citados: ciclo, produtividade, tolerância às pragas e doenças e adaptação a diferentes regiões”.

Segundo dados consolidados de *commodities* de 2007, os Estados Unidos são os maiores arrecadadores mundiais de milho, seguidos por China, México e Brasil. Em termos de produção, o Brasil é o terceiro, superando o México. A **TABELA 01** contém os dados dos maiores produtores de milho em 2007. *Commodity* é um termo da língua inglesa que significa mercadoria. É utilizada para referir-se a produtos de base em estado bruto ou com pequeno grau de industrialização (Wikipédia, 2010).

TABELA 01
 Maiores produtores de milho do mundo em 2007 (FAO, 2010).

Posição	País	Produção (em mil dólares)	Produção (toneladas)
1	Estados Unidos	20.891.120	331.175.072
2	China	5.818.754	152.418.870
3	México	1.624.346	23.512.752
4	Brasil	1.510.189	52.112.200
5	Argentina	1.463.934	21.755.364
6	Índia	1.318.521	18.955.400
7	França	1.061.836	14.357.300
8	Indonésia	1.044.118	13.287.527
9	Hungria	622.832	4.026.734
10	Nigéria	535.137	6.724.000

O milho tem sido cultivado em praticamente todo o território brasileiro (Lima *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2007). É uma das principais culturas da agricultura do país (López-Ovejero *et al.*, 2003), é a nona mais rentável e a segunda em produção. Essa diferença pode ser explicada pela produção do grão ser mais voltada ao abastecimento interno. A soja, por exemplo, tem maior liquidez por ter *status* de *commodity* internacional (Embrapa, 2008), sendo mais valorizada. Soma-se a isso a questão de que o preço do milho não é formado em dólar, apesar de o valor dos insumos acompanhar a variação cambial (Duete *et al.*, 2009), contribuindo também para a menor receita. A **TABELA 02** contém os dados das *commodities* mais importantes do país.

TABELA 02 (continua)
 Cultivo no Brasil – *Commodities* mais importantes no país (FAO, 2010)

Posição	Comodity	Produção (mil dólares)	Produção (toneladas)
1	Carne bovina	18.727.175	9.054.468
2	Cana-de-açúcar	13.299.034	645.300.182
3	Leite	12.360.728	59.242.480

4	Carne de frango	11.948.791	1.0243.987
5	Leite	7.261.109	2.757.9383
6	Laranja	3.257.882	1.8538.084

TABELA 02**(conclusão)**Cultivo no Brasil – *Commodities* mais importantes no país (FAO, 2010)

Posição	Comodity	Produção (mil dólares)	Produção (toneladas)
7	Carne de porco	3.053.255	3.015.114
8	Arroz	2.522.762	12.061.465
9	Café	228.6655	2796927
10	Algodão	1.953.551	1.315.984
11	Milho	1.925.338	58.933.347
12	Tabaco	1.551.665	851.058
13	Feijão	1.438.764	3.461.194
14	Ovos de galinha	1.302.133	1.844.670
15	Bananas	997.306	6.998.150
16	Cassava	962.110	2.6703.039
17	Tomates	916.363	3.867.655
18	Trigo	877.289	6.027.131
19	Uvas	659.401	1.421.431
20	Batatas	495.502	3.676.938

Segundo dados de levantamento de produção de 2009, foram plantados 13.779.065 hectares e colhidas 51.041.634 toneladas de milho. A expectativa para o ano de 2010 é o plantio de 13.209.365 hectares, redução de 4,1% da área plantada, e colheita de 52.355.976 toneladas, aumento de 2,6%. Assim, espera-se um aumento de produtividade de cerca de 7,0% (IBGE, 2010).

Segundo Giolo *et al.* (2002), as pragas ocupam um lugar de destaque na queda de produtividade de culturas. Oliveira *et al.* 2007 afirmam que “o controle de pragas é uma das atividades de importância econômica que deve ser enquadrada para a obtenção de maiores rendimentos.”

O aumento da produtividade passa pela análise e combate dos fatores que contribuem para a sua queda. Plantas daninhas como o capim-arroz (*Echinochloa*

crusgalli), o capim-colchão (*Digitaria horizontalis*) e o capim-rabo-de-raposa (*Setaria faberil*) possuem capacidade alelopática, reduzindo o desenvolvimento do milho. As principais doenças do milho são a mancha branca (*Phaeosphaeria maydis*), a cercosporiose (*Cercospora zea-maydis* e *C. sorghi f. sp. maydis*), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora* Underw.), a ferrugem tropical (*Physopella zea*), a ferrugem comum (*Puccinia sorghi*), a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) e os enfezamentos pálido e vermelho (vírus) (Embrapa, 2008).

Larvas da lagarta-do-cartucho - *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) - são as principais pragas na produção de milho nos Estados Unidos (Farias *et al.*, 2001), na Mesoamérica (Mendez *et al.*, 2002) e no Brasil (Beserra e Parra, 2005; Martinelli *et al.*, 2006; Nagoshi *et al.*, 2007). Estima-se que as perdas causadas pela lagarta na cultura variam de 15 a 37%. Em termos econômicos, podem chegar a 500 milhões de dólares anuais (Sá *et al.*, 2009). A ocorrência dessa espécie nas culturas tem um impacto significativo nos programas de manejo de pragas no Brasil (Martinelli *et al.*, 2006).

1.2 *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) (**FIG. 1**) é uma praga de importância econômica mundial (Martinelli *et al.*, 2006). Da mesma ordem das borboletas e mariposas, conhecida como lagarta-do-cartucho (Giolo *et al.*, 2002) e lagarta-militar (Fritz *et al.*, 2008), o artrópode é nativo do hemisfério oeste, ocorrendo nos Estados Unidos e em toda a América latina (Capinera, 2008; Machado *et al.*, 2008).

Esta espécie consome diferentes plantas cultivadas. É relatado que se alimenta de espécies de 23 famílias de plantas, dentre eles o milho (*Zea mays*), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), além de alfafa (*Medicago sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveia (*Avena sativa* L.), painço (*Panicum dichotomiflorum* Michx), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), beterraba sacarina (*Beta vulgaris* L.), cana de açúcar (*Saccharum* spp), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e trigo (*Triticum* spp.) (Capinera, 2008; Giolo *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2008; Martinelli *et al.*, 2006; Negrisoli *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2009; Siloto, 2002). O inseto destaca-se pelos danos e, principalmente, pela dificuldade de controle (Santos *et al.*, 2004).

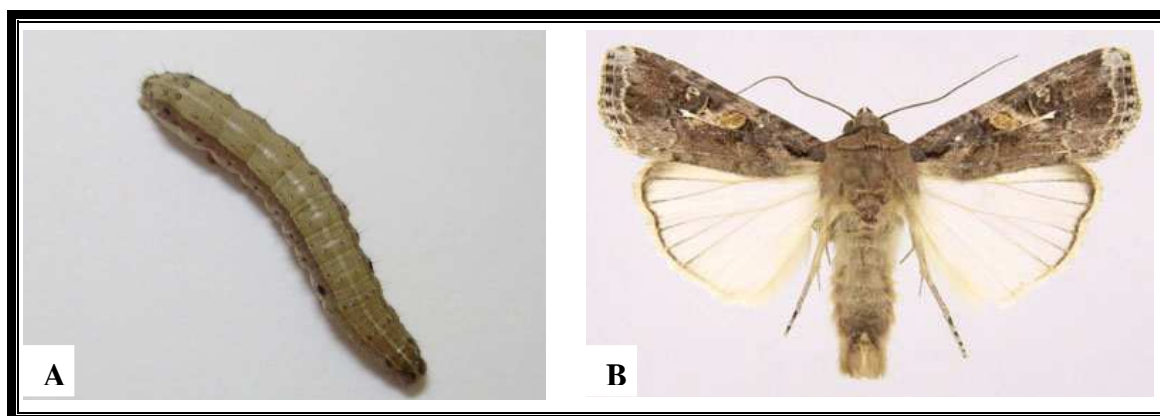


FIGURA 02 – Exemplos de *Spodoptera frugiperda*:

A – lagarta/ B – mariposa (fase adulta) (Government of Canada, 2003)

FONTE: [http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/noctuoidea/jpgs/image_e.php?image\[\]=109665.jpg,Spodoptera+exigua&image\[\]=109666.jpg,Spodoptera+frugiperda&image\[\]=109669.jpg,Spodoptera+ornithogalli&image\[\]=109667.jpg,Spodoptera+praefica](http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/noctuoidea/jpgs/image_e.php?image[]=109665.jpg,Spodoptera+exigua&image[]=109666.jpg,Spodoptera+frugiperda&image[]=109669.jpg,Spodoptera+ornithogalli&image[]=109667.jpg,Spodoptera+praefica)

A lagarta alimenta-se em todas as fases de crescimento da cultura, tendo preferência por cartuchos de plantas jovens (Giolo *et al.*, 2002). O adulto apresenta um comportamento migratório com uma capacidade de alta dispersão que permite a este organismo nocivo espalhar rapidamente ao longo de sua gama de plantas hospedeiras (Martinelli *et al.*, 2006).

A publicação de Capinera (2008) contém a descrição da biologia da praga. O ciclo de vida completo da lagarta varia de acordo com as estações do ano: trinta dias durante o verão, sessenta na primavera e de 80 a 90 dias durante o inverno. O ovo, em formato de cúpula, tem cerca de 0,4 mm de diâmetro e 0,3 mm de altura. O número de ovos por massa varia consideravelmente, contudo frequentemente varia entre 100 a 200 ovos. A produção média da fêmea é de 1500 ovos por dia, sendo o máximo de 2000 ovos. A maioria dos ovos é distribuída por uma camada única anexada à folhagem, podendo ser encontrados depositados em camadas. O ovo eclode entre dois a três dias no verão.

A lagarta apresenta seis estágios de desenvolvimento. A fase larval tem duração, em média, de cerca de 14 dias no verão e 30 dias no clima frio. Cada instar, do primeiro ao sexto tem, respectivamente, tempo médio de 3,3; 1,7; 1,5; 1,5; 2,0 e 3,7 dias quando

as larvas são criadas a 25 °C. O tamanho médio de cada instar é de 1,7; 3,5; 6,4; 10,0; 17,2 e 34,2 mm, respectivamente.

O período de pupa ocorre normalmente no solo, em uma profundidade de 2 a 8 cm. A larva constrói um casulo oval, formado por partículas do solo e seda, de 20 a 30 mm de comprimento. Tem a cor marrom-avermelhada. A pupa tem as seguintes medidas: 14 a 18 mm de comprimento e cerca de 4,5 mm de largura. A duração da fase pupal é cerca de oito a nove dias durante o verão. Atinge 20 a 30 dias durante o inverno.

As mariposas tem uma envergadura de 32 para 40 mm. São noturnas e mais ativas durante noites quentes e úmidas. Após um período de pré-ovoposição de três a quatro dias, a fêmea deposita normalmente a maioria dos seus ovos durante os primeiros quatro a cinco dias de vida. A duração da vida adulta é estimada em média de 10 dias com um intervalo de cerca de sete a 21 dias.

Capinera (2008) relata ainda que as lagartas causam danos por consumir folhagem. Dependendo da fase, começam a fazer buracos nas folhas e comê-las das bordas para dentro, provocando linhas características de perfuração. São encontradas de uma a duas lagartas por planta, devido ao comportamento canibal.

As plantas do milho ficam prejudicadas pela destruição do cartucho, reduzindo a área fotossintética e comprometendo a produção. A lagarta-do-cartucho pode atacar a base da espiga, destruindo grãos, abrindo caminho para microorganismos ou, até mesmo provocando a queda da espiga (Siloto, 2002).

São parasitas da lagarta-do-cartucho *Cotesia marginiventris* (Cresson) e *Chelonus texanus* (ambos Hymenoptera: Braconidae), *Archytas marmoratus* (Diptera: Tachinidae). Há predadores que atacam também outras lagartas como besouros (Coleoptera: Carabidae); *Labidura riparia* (Dermaptera: Labiduridae), *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae), *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae), além de vertebrados como algumas aves e roedores e agentes patogênicos como vírus e os fungos *Entomophaga aulicae*, *Nomuraea rileyi* e *Erynia radicans* (Capinera, 2008).

O controle da lagarta-do-cartucho pode ser feito, além do uso de inseticidas utilizando-se de técnicas de cultivo como antecipação do plantio ou o plantio de variedades de milho de rápida maturação, cultivares resistentes e com vários agentes de controle biológico (Capinera, 2008; Cunha *et al.*, 2008).

1.3 Manejo de pragas – enfoque em *Spodoptera frugiperda*

O controle de insetos constitui uma das grandes preocupações do ser humano, apresentando impacto na medicina, por serem agentes patogênicos ou vetores de doenças e, na agricultura, devastando culturas. Devido a esses fatores, o controle de insetos tem grande importância econômica, crescendo regularmente de 7 a 10 % por ano (Regnault-Roger, 1997).

Os “agrotóxicos”, substâncias organo-sintéticas, surgiram como uma tentativa de eliminação das pragas das culturas. Segundo Moragas e Schneider (2003), o termo “biocida” seria o mais apropriado para definir as substâncias atuantes no controle de organismos nocivos. “Pesticida” e “praguicida” seriam termos limitados, por não exprimirem a ideia de que as substâncias agem também em organismos que não são considerados pestes ou pragas. O termo “agrotóxico”, mais popular, teria surgido no início da década de 80, com os movimentos ambientalistas, para dar uma conotação pejorativa a esses produtos.

Os biocidas não ficam confinados apenas onde são aplicados. Espalham-se por meios biológicos, químicos e físicos através do ambiente. A contaminação dos recursos naturais e dos seres vivos por meio do uso indevido e até excessivo de biocidas tornou-se um grave problema para a sociedade (Moragas e Schneider, 2003). No que se refere à agricultura, as substâncias usadas no controle impactam negativamente sobre os predadores naturais, polinizadores e organismos não alvo, além de resultarem no desenvolvimento da resistência das pragas (Isman, 2002; Negrisoni *et al.*, 2010). São biocidas os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

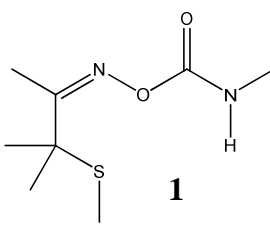
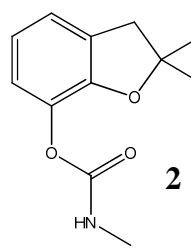
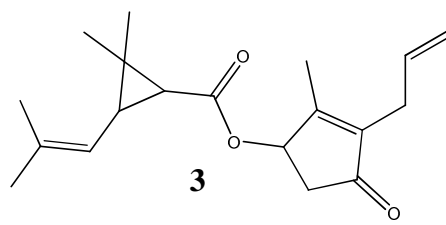
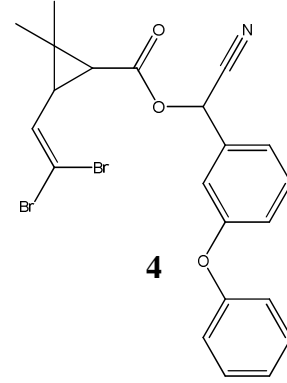
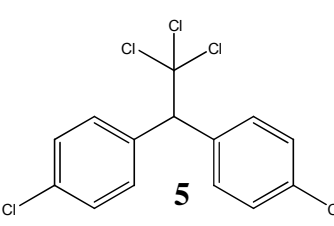
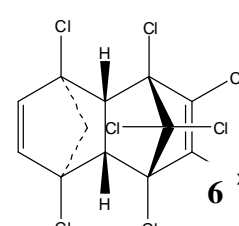
Os organoclorados são quimicamente estáveis, de degradação lenta, tendem a se acumular nos tecidos adiposos, concentram-se na teia alimentar e podem causar problemas endócrinos (Poolpak *et al.*, 2008; Tiemann, 2008). Os organofosforados podem interferir em respostas musculares e em órgãos vitais do ser humano, produzindo sintomas graves e até óbito (Mulchandani *et al.*, 2001). Os piretróides são degradados mais facilmente no ambiente do que outras classes, mas são altamente tóxicos para invertebrados aquáticos e os efeitos a humanos são ainda pouco claros (Casas *et al.*, 2007). Os carbamatos são extremamente tóxicos para o sistema nervoso central e é possível que sejam carcinogênicos e mutagênicos (Saraji e Esteki, 2008).

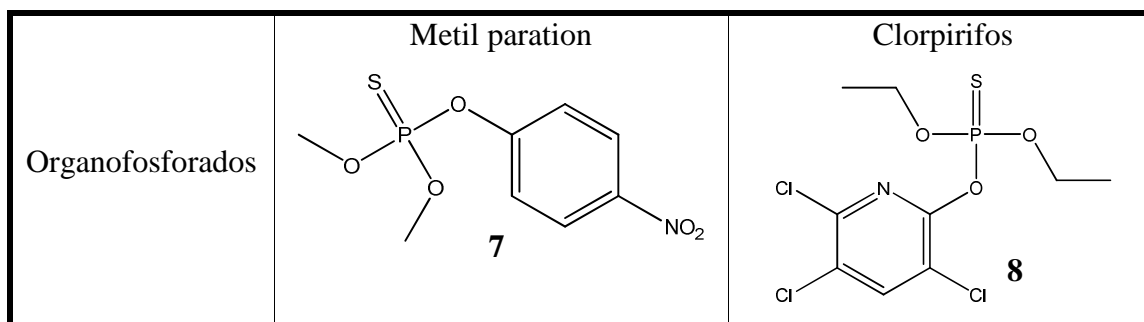
O **QUADRO 01** contém exemplos de substâncias e respectivas classes de inseticidas. Dentre todos os exemplos, deltametrina (**4**) (nome comercial Decis 25 ECTM), Metil parathion (**7**) (Folidole 600TM) e Chlorpyrifos (**8**) (Lorsban 480 BRTM e

Vexter™) são alguns dos inseticidas registrados para o combate de *S. frugiperda* (Negrisoli *et al.*, 2010).

QUADRO 01

Classes e algumas substâncias com atividade inseticida

Classe	Substância	
Carbamatos	<p>Aldicarb (Risher <i>et al.</i>, 1987)</p>  <p>1</p>	<p>Carbofurano</p>  <p>2</p>
Piretróides	<p>d-aletrina (WHO, 2002, Narendra <i>et al.</i>, 2008)</p>  <p>3</p> <p>Consiste dos isômeros [1R,trans;1R] + [1R,trans;1S] + [1R,cis;1R] + [1R,cis;1S] em uma proporção de 4:4:1:1.70</p>	<p>Deltametrina</p>  <p>4</p>
Organoclorados	<p>DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano)</p>  <p>5</p>	<p>Aldrin</p> <p>(Common chemistry, 2011)</p>  <p>6</p>



O principal método de combate à lagarta é através do uso de inseticidas (Cruz, 2002; Cunha *et al.*, 2008; Martinelli *et al.*, 2006). Contudo, Cunha *et al.* (2008) ressaltam que esse método aumenta os riscos de contaminação ambiental, além de elevar custos em decorrência dos problemas relacionados à tecnologia de aplicação – atingir a lagarta no interior do cartucho. Além disso, o inseto tem desenvolvido, ao longo do tempo, resistência às principais classes de inseticidas. A resistência de pestes a inseticidas é considerada uma ameaça mundial, reconhecida em mais de 440 espécies de insetos e ácaros (Negrisoli *et al.*, 2010).

Visando solucionar o problema da resistência, Cruz (2002) cita táticas para o manejo de resistência à lagarta do cartucho: utilização de controle cultural; utilização de controle biológico; utilização de genótipos resistentes; utilização de controle biorracional; utilização de inseticidas químicos compatíveis com agentes de controle biológico; utilização de monitoramento da praga para reduzir aplicações e doses desnecessárias de produtos químicos; ação conjunta entre empresas de insumos, produtores, extensionistas e pesquisadores; informações adicionais nos rótulos dos produtos, especialmente em relação à seletividade contra inimigos naturais.

Cruz (2002) comenta que “deve-se considerar o aumento das pressões sociais, econômicas e ecológicas visando à redução do uso de inseticidas químicos”. Assim, ressalta o autor, acaba resultando no uso de táticas de controle que não envolvam inseticidas químicos. Eles são utilizados em dose mais alta do que a realmente efetiva, rompendo o equilíbrio com os predadores naturais, necessitando de doses mais altas dos inseticidas, induzindo à resistência. No final, conclui a importância das táticas de manejo integrado de pragas e “sempre se deve manter o pensamento de que produtos químicos só poderão ser utilizados de maneira precisa (dose, época, etc.) e seletiva (sem romper o equilíbrio com os inimigos naturais)”.

Uma outra abordagem, o controle ecoquímico – baseado na interação inseto-planta – é um dos métodos mais promissores, aproveitando-se da evolução

interdependente de ambos. Baseia-se na utilização de alomônios ou substâncias aleloquímicas. Alomônios são definidos como substâncias produzidas ou adquiridas por um organismo que, quando entra em contato com um indivíduo de outra espécie, induz uma resposta fisiológica ou comportamental no receptor que é favorável ao emissor, mas não ao receptor (Koul, 2008). Substâncias aleloquímicas exercem diversas influências sobre os insetos e pouca sobre mamíferos: apresentam ação deterrente, repelente e reforçam a polinização, podendo aumentar ou diminuir a ovoposição. (Regnault-Roger, 1997).

Os quimiorreceptores, presentes nos órgãos sensoriais dos insetos, seriam um dos mecanismos desenvolvidos para reduzir ou prevenir efeitos prejudiciais das substâncias do metabolismo secundário de plantas. Por exemplo, larvas da ordem Lepidoptera possuem um par de palpos maxilares que tocam na superfície do alimento durante a alimentação (Koul 2008), podendo aceitar ou rejeitar a fonte. Baseando-se nesse aspecto, surge a atividade antialimentar.

Para Isman (2002), a atividade antialimentar ou deterrente alimentar refere-se a qualquer substância que reduza a alimentação de um inseto. Também é definida como uma substância que detenha a alimentação por meio de uma ação direta nos órgãos do paladar. Spurr e McGregor (2003) tratam dos termos antialimentar, inibidor, repelente, supressor e deterrente. Repelentes afastam os invertebrados antes que tenham contato com o alvo. Supressores suprimem o início do consumo após o contato. Deterrentes dissuadem os invertebrados a continuar o consumo após o mesmo ter sido iniciado. Já os termos antialimentar e inibidor são utilizados quando não é possível determinar o modo de ação de uma substância.

Invertebrados podem consumir iscas utilizadas para o combate de roedores, propagando agentes tóxicos para toda a cadeia alimentar. Deterrentes podem ser utilizados nesse caso, tornando as iscas impalatáveis somente aos invertebrados. Por exemplo, no Storm® (American Cyanamid Co.), contendo o anticoagulante flocoumafeno (9), um piretróide é adicionado para prevenção de ataque por insetos (Spurr e McGregor, 2003).

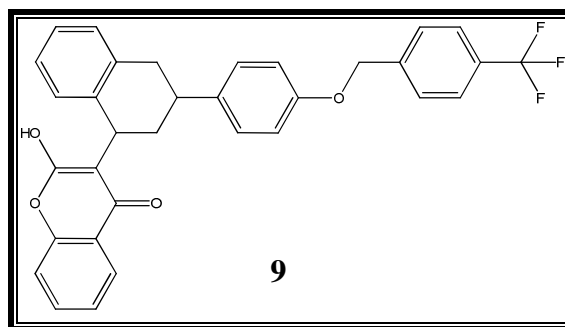


FIGURA 03 – Estrutura do Flocoumafeno (**9**) (PubChem Compound, 2011)

Produtos naturais são mais aceitos para o controle de pragas do que os sintéticos (Spurr e McGregor, 2003). Várias substâncias das classes de flavonóides, terpenos, alcalóides e hidrocarbonetos são utilizadas como deterrente alimentar contra insetos nocivos (Iwashina, 2003; Jain e Tripathi, 1993). É relatada que a resistência a *S. frugiperda* é devida à maisina, ácido clorogênico e outras luteolinas (Gueldner *et al.*, 1992, Snook *et al.*, 1994).

Substâncias fenólicas são descritas pela capacidade de inibição de aflatoxinas (Samapundo *et al.*, 2007).

A atividade do ácido clorogênico (**10**) é descrita em diversos trabalhos. A atividade oxidante é citada em alguns trabalhos (Rice-Evans *et al.*, 1996; Simmonds, 2003). Altos níveis de ácido clorogênico juntamente com maisina (**11**) são importantes na toxicidade de algumas gramíneas à lagarta-do-cartucho (Johnson *et al.*, 2002). O ácido clorogênico pode modular a alimentação de insetos em algumas espécies de plantas, afastando insetos polívoros (Simmonds, 2003). Simmonds cita também que larvas expostas ao material crescem lentamente e consomem menos material.

O flavonóide maisina (**11**), presente no estigma do milho, é efetivo em suprimir o crescimento de *Helicoverpa zea* (Boddie) quando adicionada em dieta artificial (Ni *et al.*, 2008). Também é comparável com o ácido clorogênico em atividade contra tal lagarta (Snook *et al.*, 1994). O flavonóide rutina (**12**) desempenha um importante papel na defesa da soja contra insetos como *Heliopsis virescens* (F.), *Trichoplusia ni* (Hübner) (Hoffmann-Campo *et al.* 2001) e *Anticarsia gemmatilis* (Hoffmann-Campo *et al.* 2006), agindo como deterrente assim como o ácido clorogênico. O aumento da concentração dessas substâncias (FIGURA 4) nas plantas seria uma boa abordagem para o melhoramento da resistência (Piubeli *et al.*, 2009).

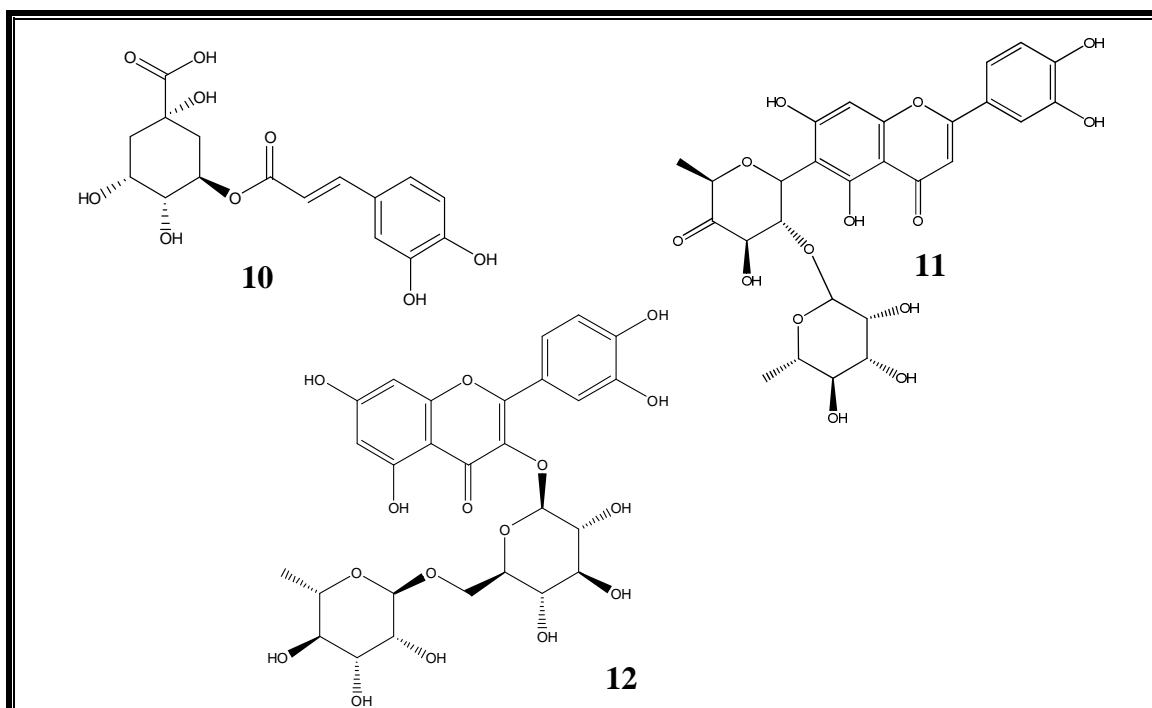


FIGURA 04 – Estruturas do ácido clorogênico (10), maisina (11) e rutina (12)

Substâncias como warburganal (13) e muzigadial (14), ambos isolados de vegetais de *Warburgia spp*, e azadiractina (15) (FIGURA 05), isolada de frutos de *Azadirachta indica* A. Juss, são potentes deterrentes alimentares de invertebrados. Os dois primeiros tem atividade de 0,1 ppm contra *Spodoptera spp*, enquanto que o último age em concentrações abaixo de 0,35 ppm contra a lagarta-do-cartucho (Spurr e McGregor, 2003; Viana *et al.*, 2007).

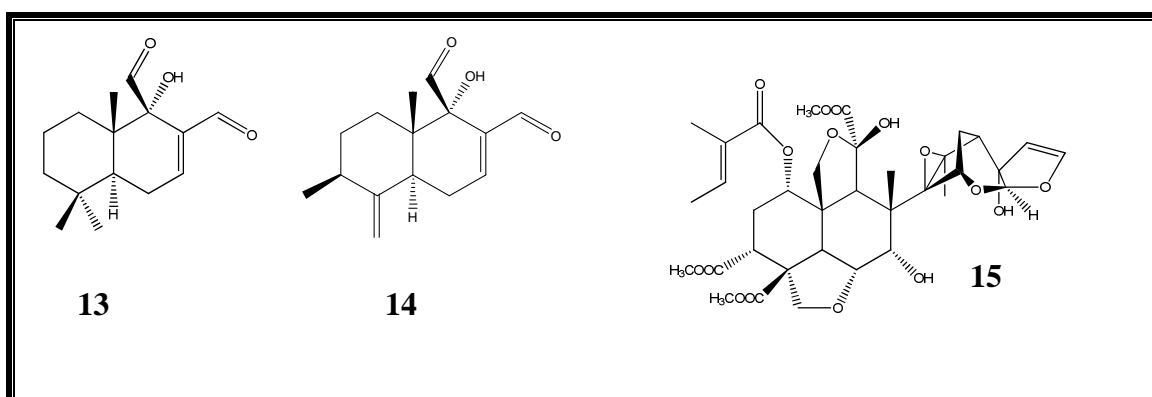


FIGURA 05 – Estruturas de warburganal (13), muzigadial (14) e azadiractina (15)

DIMBOA (**16**) (**FIGURA 06**) é um antimicrobiano isolado do milho (Escobar *et al.*, 1999, Dixon, 2001). Essa substância age como deterrente alimentar para vários insetos, inibindo proteases digestivas e enzimas detoxificantes (Kojima *et al.*, 2010). É considerado um deterrente alimentar para insetos herbívoros. Contudo, Rostás (2001) sugere que essa substância age como um estimulante alimentar para *S. frugiperda*, ao contrário da ação deterrente a outros lepidópteros.

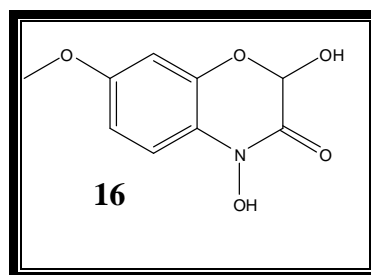


FIGURA 06 – Estrutura de DIMBOA (**16**)

A atividade de extratos vegetais vem sendo estudada graças à sua demanda por alimentos orgânicos e pela sua seletividade para com inimigos naturais (Tavares *et al.*, 2009). Em estudo promovido por Saito *et al.* (2004), observou-se o potencial de extrato de plantas no combate à lagarta, indicando atividade em alguns extratos. Oliveira *et al.* (2007) conduziram um estudo com diversos extratos aquosos de plantas com alguma atividade inseticida e/ou especificamente a lagarta-do-cartucho. Nesse estudo, aplicaram-se por meio de pulverização, extratos aquosos sobre um cultivar do milho. Os extratos não possuíam eficiência necessária como único método de controle da lagarta. O autor propôs que a baixa eficiência foi devida à localização da lagarta no interior do cartucho, ficando protegida da exposição ao extrato.

Lima *et al.* (2009) detectaram a atividade inseticida do óleo essencial da pimenta-longa *Piper hispidinervum* contra a lagarta-do-cartucho, causando mortalidade e redução alimentar ao inseto. Vera *et al.* (2008) isolaram da planta *Pluchea sagittalis* alguns compostos sesquiterpênicos, entre eles 3 α -(2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi)-4 α -formoxi-11-hidroxi-6,7-deidroedesman-8-ona (**17**) e 3 α -(2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi)-4 α ,7 α ,11-triidroxieudesman-8-ona (**18**) (**FIGURA 06**), os quais possuem atividade como deterrentes alimentares com níveis de atividade de 34 e 11% respectivamente.

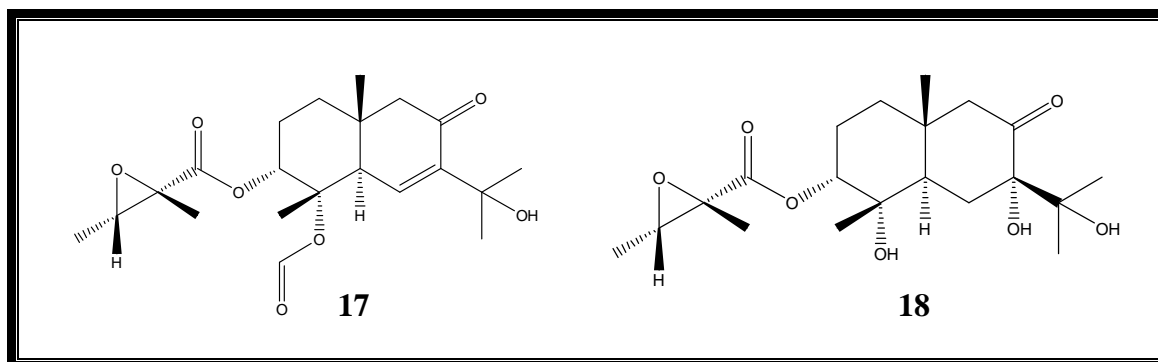


FIGURA 06 – Estruturas das seguintes substâncias: 3 α -(2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi)-4 α -formoxi-11-hidroxi-6,7-deidroeuodesman-8-ona (**17**) e 3 α -(2,3-epoxi-2-metilbutiriloxi)-4 α ,7 α ,11-triidroxieuodesman-8-ona (**18**)

1.4 A utilização de cultivares resistentes

Cultivares com características agrônomicas desejáveis aliadas à resistência à praga podem ser usados como alternativa ao manejo, sendo as plantas resistentes conhecidas por suas vantagens biológicas e ambientais (Farinelli e Fornasieri, 2006; Iwashina, 2003). Assim, a resistência do milho à lagarta-do-cartucho tem sido pesquisada de forma intensa (Sá *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2000).

Segundo Stout *et al.* (2009), as plantas sofrem modificações na expressão gênica e no metabolismo primário e secundário após prejuízo por artrópodes. Uma das formas de resistência é a induzida direta em que, por exemplo, a planta reduz a adequabilidade ou a palatabilidade para os herbívoros. Outra forma é a resistência induzida indireta, por meio da qual a planta pode melhorar a efetividade de inimigos naturais dos herbívoros. Ambas as respostas, frequentemente, são sistêmicas.

Para Farinelli e Fornasieri (2006), há influência das plantas resistentes à praga, passando a produzir indivíduos menos vigorosos e mais susceptíveis aos tratamentos químicos, racionalizando o uso dos últimos.

O homem utiliza a resistência genética, natural ou dirigida, no controle de pragas e doenças, desde quando as plantas foram domesticadas (Waquil *et al.*, 2002). Diversas fontes de resistência à lagarta foram identificadas, desenvolvidas, registradas e liberadas ao público. Contudo, tem-se pouca informação sobre mecanismos e causas de resistência. Segundo Viana e Potenza (2000) “a elucidação desses parâmetros seria

muito útil ao progresso do programa, contribuindo para a escolha do método de melhoramento adotado, a previsão da duração e a eficiência da resistência e para a ajuda no planejamento de novas linhas de ação a serem seguidas na solução de problemas futuros”. Pereira *et al.* (2000) corroboram a necessidade de tais estudos.

Alguns genes, quando são super expressados de forma transgênica em plantas, conferem resistência contra lagartas e a doenças. Por exemplo, produtos de isoenzimas peroxidases podem ter toxicidade variada a insetos e a fungos fitopatogênicos (Dowd e Johnson, 2009).

Vários trabalhos vem sendo publicados sobre resistência de cultivares à lagarta-do-cartucho. Stout *et al.* (2009) conduziram um estudo em que concluíram, por meio de comparação entre vias de resposta do vegetal e desenvolvimento da lagarta, a existência de resistência induzida direta no arroz quando submetido ao ataque de *S. frugiperda*.

No trabalho de Chen *et al.* (2009), houve a análise de três linhagens – uma suscetível e duas resistentes à lagarta-do-cartucho – atribuindo a susceptibilidade à Ab24E e a resistência à FAW7050 e a Mp708 às substâncias de defesa juntamente com a razão entre proteínas e carboidratos da planta (P/C). Mp708 contém uma razão entre proteínas e carboidratos da planta, ao contrário de Ab24E. Contudo, FAW7050 possui tal razão num intermediário e níveis elevados de resistência, justificando a presença de outro fator – substâncias de defesa – no estabelecimento de resistência.

Em estudo conduzido por Pereira *et al.* (2000), variedades foram testadas quanto à sua susceptibilidade à lagarta-do-cartucho e à *Helicoverpa zea*. As variedades menos susceptíveis foram Campeão, Cravo, BR-106, Asteca (São Mateus), Palha-Roxa (Francisco Beltrão), Palha-Roxa (Governador Valadares), Mato Grosso, Amarelo Paulista e BR-453. Já a Palha-Roxa (Celso Sul MG), foi a mais suscetível. Nas menos suscetíveis, o dano econômico não alcançou 20%.

Silveira *et al.* (1997) conduziram ensaios testando a resistência de diversos genótipos à *Spodoptera frugiperda*, concluindo que havia maior resistência dos genótipos Mp707 e Zapalote Chico à praga. Silva *et al.* (2000) e Lima *et al.* (2006) buscaram identificar fontes de resistência à lagarta. Ainda segundo Silva *et al.*, parâmetros como dano e o peso das lagartas, dano e comprimento das lagartas e peso e podem ser utilizados nos estudos de resistência à lagarta.

Viana e Potenza (2000) enfocaram a identificação do mecanismo de resistência, antibiose e não preferência, em genótipos de milho a *S. frugiperda*. Waquil *et al.* (2002) conduziram um estudo onde avaliaram a resistência do milho transgênico Bt,

expressando genes do *Bacillus thuringiensis* produtores de toxina, contra a lagarta. De maneira geral, vários cultivares testados apresentaram algum grau de resistência.

1.5 Quimiometria

Há algumas décadas, os métodos de análise química, sejam CLAE, CG, RMN, EM ou outros, geram uma grande quantidade de dados. Assim, houve a necessidade de serem desenvolvidas novas ferramentas com o objetivo de tratar esta enormidade de dados, extraindo informações relevantes. A quimiometria é usada para tal análise (Nielsen *et al.*, 1998).

Otto (2007) define a quimiometria como “a disciplina química que usa métodos matemáticos e estatísticos para “design” ou seleção de procedimentos de medições otimizadas e experimentos, e provir o máximo de informações químicas pela análise de dados químicos”. Geladi (2003) descreve a quimiometria como “ir além das limitações das estatísticas de uma única variável usando *design* experimental, classificação multivariada e calibração multivariada, utilizando métodos derivados da matemática, estatística e ciência computacional”.

Por exemplo, os métodos quimiométricos podem auxiliar na interpretação detalhada da região de impressão digital de um espectro no infravermelho. pode-se, também, facilitar a identificação de espécies através da análise dos dados gerados em análise metabolômica.

O número de variáveis processadas nos estudos de reconhecimento de padrão é elevado, visando, a representação gráfica, facilitar a interpretação, destacando, na quimiometria, a análise de componentes principais (ACP) (Correia e Ferreira, 2007).

ACP, do inglês *principal component analysis* (PCA), é um método estatístico multivariado desenvolvido para a extração de informações de dados de grandes matrizes contendo numerosas colunas e linhas. Calcula correlações entre as colunas da matriz de dados e classifica as variáveis de acordo com os coeficientes de correlação tendo em consideração a magnitude e o sinal dos coeficientes de correlação (Kdnya *et al.*, 2003). Assim, permite a visualização gráfica de um conjunto de dados, visando aumentar a compreensão dos mesmos, examinando a presença ou ausência de agrupamentos naturais (Correia e Ferreira, 2007).

Exemplificando, os conjuntos de cromatogramas gerados forneceriam dados que poderiam ser convertidos em uma única tabela. Nessa, a absorvância estaria em função do tempo de retenção em dado comprimento de onda. Considerando um método único aplicado a todas as amostras, uma mesma substância seria eluída em tempos de retenção bem próximos. Assim, ao ser aplicado o algoritmo do ACP, correlacionar-se-iam os cromatogramas e gerando a informação de quais amostras são mais similares a outras.

Atualmente, o ACP é utilizado como na análise e classificação de bebidas, em metabolômica, química analítica, detecção de alterações sutis da natureza de cromatogramas que não são visíveis a um operador na indústria, análise de imagens, dentre outros (Andrade *et al.*, 2008; Chandwani *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2006; Heyer e Schloerd, 1997; Hida, 1995; Kallithraka *et al.*, 2001, Robertson, 2005; Viant *et al.*, 2006).

Outro método bastante utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos. Tal análise reúne por meio de um critério de classificação, as unidades amostrais em grupos de tal forma que haja homogeneidade dentro de um grupo e heterogeneidade entre grupos (Albuquerque *et al.*, 2006). Para Passarino *et al.* (2007), análise de *clusters* engloba uma série de métodos que agrupam objetos de tal forma que o grau de associação entre dois objetos é máximo se eles pertencem ao mesmo grupo e mínima se contrário.

As distâncias podem ser calculadas utilizando a distância euclidiana entre dois pontos, conforme a equação abaixo:

$$d_{i,j} = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{k,i} - x_{k,j})^2}$$

Sendo $d_{i,j}$ a distância entre as observações i e j , sendo n o número de elementos por observação, e $x_{k,i/j}$ sendo o elemento k da observação i ou j . Essas distâncias são calculadas para cada par de observações (Cohen *et al.*, 2010).

A representação gráfica da análise hierárquica de agrupamentos pode ser feita. Vários trabalhos utilizam também tal técnica. Hartings *et al.* (2008), por meio da análise de agrupamentos, reuniram diversas variedades em quatro grupos, utilizando dados morfológicos de cada cultivar. Para isso, reuniu medidas de diversas características morfológicas como tamanho de folha e planta para cada variedade. Em seguida, com o

auxílio de programas estatísticos, obteve as análises de componente principal e análise hierárquica de agrupamentos.

As variedades estão representas por códigos alfanuméricos ou somente numéricos. Pode-se observar na **FIGURA 08** a tendência da proximidade de certas variedades com outras, tendência mais facilmente visualizada na **FIGURA 09**. Quanto menor distância entre as chaves, mais próxima uma variedade é da outra.

Trabalho semelhante realizado por Bige e Lorenzoni (2007), onde agrupou diversos ecotipos de milho angolano.

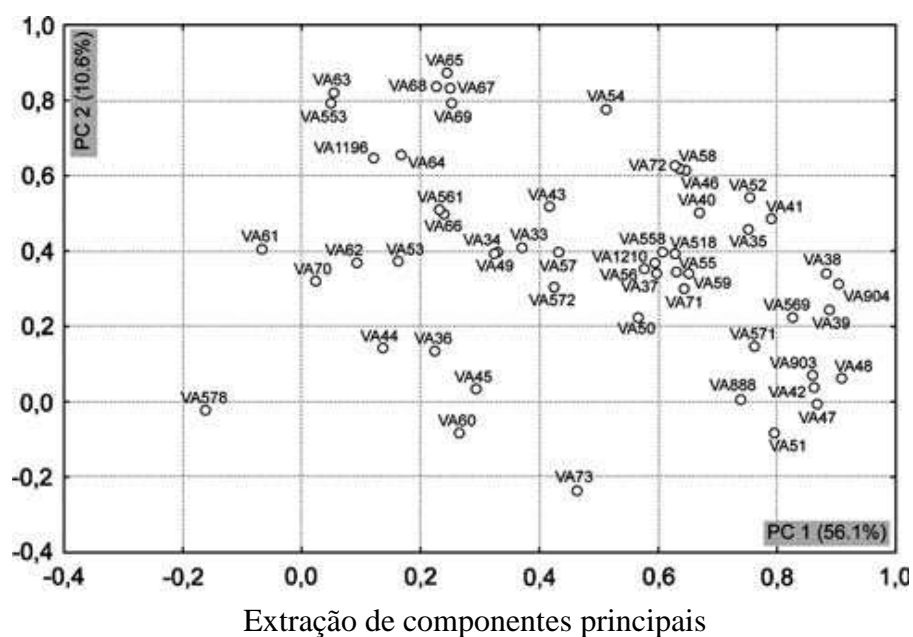


FIGURA 08 – Gráfico de componentes principais, adaptado de Hartings *et al.* (2008).
As siglas referem-se a morfologias diversas como tamanho de folha e de planta

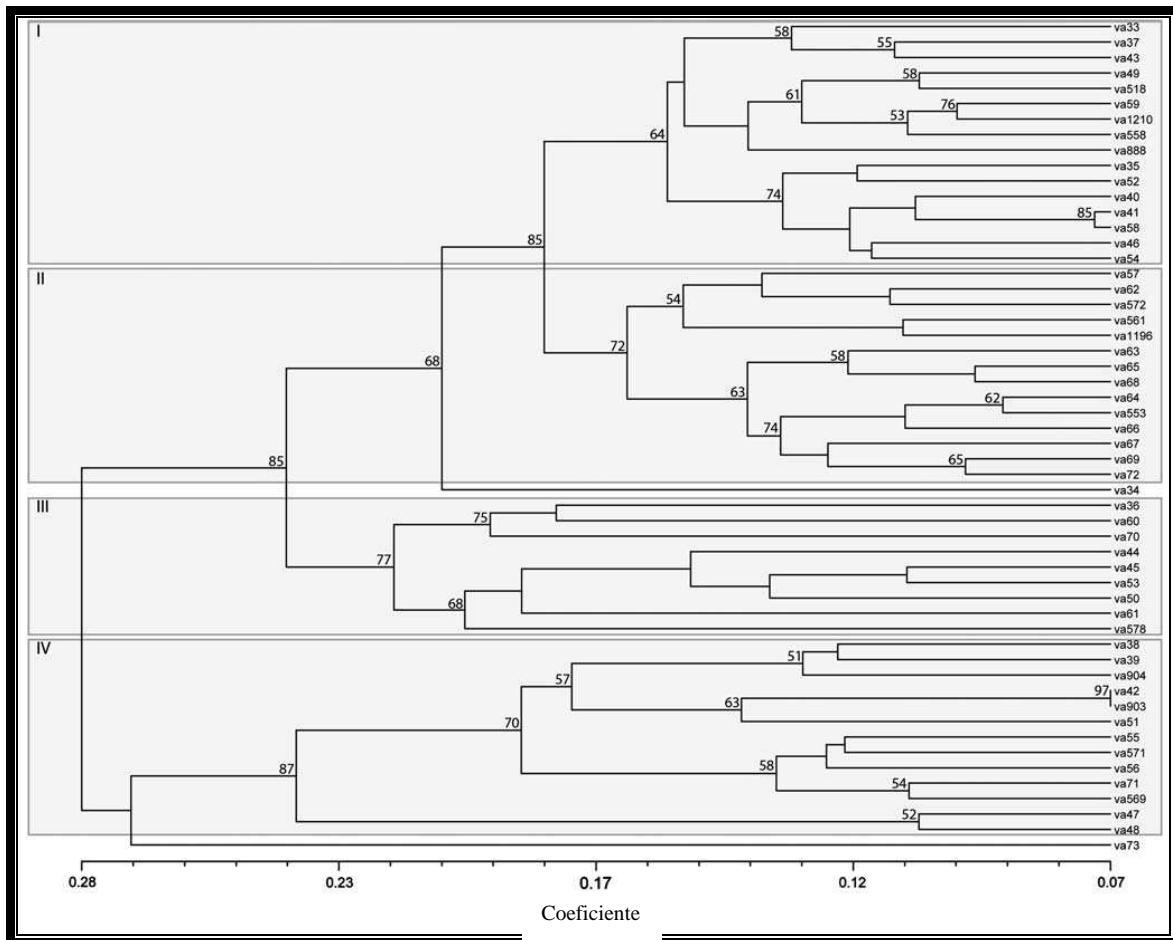


FIGURA 09 – Dendrograma, adaptado para a língua portuguesa, extraído de Hartings *et al.* (2008)

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desenvolver um método para análise de extratos de folhas de milho por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos (DAD).

Obter o perfil dos genótipos contrastantes de milho por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD);

Comparar os perfis cromatográficos dos genótipos resistentes com aqueles dos genótipos suscetíveis para identificar picos de substâncias presentes somente no primeiro grupo.

Identificar substâncias naturais presentes apenas nos genótipos resistentes por CLAE-EM ou por co-injeção de padrões.

Testar as substâncias presentes apenas nos genótipos resistentes que estiverem disponíveis, contra *S. frugiperda* e contra fungos patogênicos para avaliação da eficiência destas substâncias.

Capítulo 3

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 Equipamentos, reagentes e materiais

3.1.1 Equipamentos

- Balança analítica Quimis, modelo Q-ILA2104, 210 g/ 0,1mg.
- Balança eletrônica Digimed KN1000C, classe de exatidão II, série 04G6.
- Banho Buchi Waterbath B-480.
- Banho de ultra-som UltraCleaner 800A com aquecimento.
- Bomba de pressão Quimis Modelo Q-355B1, série 806377.
- Bomba de vácuo Tecnal TE-0581.
- Capela de fluxo laminar.
- Chapa para aquecimento Laboratory Stirrer modelo PC – 320, série 440893.
- Coluna Supelco com 25 cm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro, com fase estacionária de octadesiloxano e diâmetro de poro de 5 µm.
- Cromatógrafo líquido marca Shimadzu LC10AD series dotado de detector de arranjo de diodos SPDM10avp (DAD), duas bombas LC10AD e um autoinjeter SIL 10AF, módulo CBM10A.
- Estufa de secagem Fanen Ltda Modelo 002 CB.
- Estufa para placa cromatográfica Quimis G-317 8122.
- Geladeiras Electrolux Double D440 e Consul Praticce 230 refrigerador.
- Purificador de água Milipore Miliq Plus
- Refrigerador Nuair -86°C Ultralow Freezer
- Rotavapor Büchi Waterbath, modelo B – 480 e Fisaton modelo 802, série 531782.
- Scanner Genius Color Page modelo Vivid 1200 XE.

3.1.2 Reagentes e materiais

- Acetonitrila grau de pureza CLAE marca JT Backer e Carlo Erba.
- Ácido acético glacial PA Quimex.

- Ácido clorogênico 95% titulação Sigma-Aldrich.
- Ácido fosfórico 85%.
- Ácido trifluoroacético grau HPLC Merck.
- Água destilada.
- Água ultrapura.
- Alça de platina.
- Aparato de filtração a vácuo – com filtro sinterizado, borracha e quitassato.
- Bandejas de material plástico de 128 células cada.
- Balões volumétricos de 25 mL, 50 mL e 1000 mL.
- Bastão de vidro.
- Béqueres de 50 mL, 200 mL e 1000 mL.
- Cartucho octadecilsiloxano C18 40 μm 200 mg/mL para extração em fase sólida “Equilab Chrom expert”.
- Celite (Synth).
- Cloreto de sódio (Synth)
- Etanol grau de pureza comercial marca Minascool.
- Gral e pistilo
- Hesperidina (Sigma-Aldrich).
- Hidróxido de amônio PA CRQ.
- Indicador universal em fitas pH 0 – 14 Merck.
- Kaempferol 90% HPLC Sigma-Aldrich.
- Luteolina Sigma-Aldrich.
- Metanol grau de pureza CLAE marca JT Backer.
- Papel absorvente.
- Papel filtro.
- Parafilme M marca “Laboratory Film American Can Company”.
- Placa de petri 150 x 20 mm.
- Pipeta automática.
- Pipeta volumétrica.
- Polietilenglicol (PEG) 4000
- Revelador NP-Flavonoides.
- Quercetina diidratada 98% HPLC Sigma-Aldrich.

- Rutina hidratada 95% HPLC Sigma-Aldrich.
- Seringa de vidro 20 mL BD Yale.
- Sílica Gel 60 G Vetec.
- Sulfato de magnésio heptaidratado marca Synth
- Sulfato de sódio anidro marca Synth.
- Suporte de vidro para CCD – vidro 0,25 cm de espessura.
- Tubo “Vial” âmbar com tampa marca Supelco.
- Tween
- Unidade filtrante millex LCR 0,45 um – membrana de PTFE modificado para soluções orgânicas, 13 mm não estéril.

3.1.3 Material biológico

- *Aspergillus flavus*
- *Cladosporus cladosporioides*
- Lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*.
- Linhagens utilizadas da espécie *Zea mays*, de diferentes tipos de resistência à lagarta-do-cartucho. A linhagem L3 é suscetível a lagarta.
 - LCMS23-23
 - LCMS23-21B
 - MIRT-2Q
 - LMIRT-2Q
 - HSCMS23-6LCMS23-23 X LCMS23-21B
 - HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B
 - L3
 - ZAPALOTE CHICO

3.1.4 Soluções utilizadas

- Solução 1:1 de ácido acético glacial em água ultrapura.
- Solução de 200 ppm de ácido trifluoroacético.
- Solução 0,02 mol.L⁻¹ de ácido fosfórico.

- Solução alcoólica de PEG 4000 - O etanol grau comercial foi purificado duas vezes em montagem de destilação fracionada. Após recuperado, o etanol foi guardado em frasco devidamente rotulado. Um volume de 100 mL de etanol foi aquecido em chapa de aquecimento e a esse foram adicionados 5 g de PEG 4000. A solução foi armazenada em frasco rotulado e armazenada em geladeira. Antes da utilização, a solução era aquecida a uma temperatura ligeiramente superior a do ambiente para solubilizar novamente o polímero.
- Solução salina – Foi preparado 1 L de solução salina do seguinte modo: 9 g de cloreto de sódio, 0,5 g de sulfato de magnésio heptaidratado e 2 g de tween foram transferidos para um balão volumétrico de 1 L. Em seguida, houve o acréscimo de 1 L de água destilada.

3.1.5 Aplicativos

- Advanced Chemistry Development – ACDLabs.
- ChemOffice.
- Microcal Origin.
- Pacote de aplicativos CLASS LC10 PROGRAM.
- Pacote de aplicativos Microsoft Office – Excel e Word.
- Statística 6.0.

3.2 Experimentos

3.2.1 Cultivares

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação localizada nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo, km 45, rodovia MG 424, Sete Lagoas, MG.

O experimento foi delineado na forma de blocos ao acaso. Oito cultivares de milho foram utilizados e, para cada bloco de cultivar, havia oito vasos contendo cinco plantas cada. Dos oito vasos, metade foi infectada – tratamento – e a outra metade foi preservada como controle. O milho foi semeado em vasos de 5 L contendo solo adubado com a fórmula NPK (nitrogênio, fósforo, potássio) 8-28-16 (300 kg/ha). Os cultivares foram plantados dia 10 de novembro de 2008. As plantas foram irrigadas três vezes por semana com 500 mL de água.

Cada planta, no estágio de quatro folhas, pertencente à metade do tratamento foi infectada com dez lagartas recém-eclodidas da espécie *Spodoptera frugiperda*, provenientes de criação mantida no Laboratório de Resistência de Plantas a Pragas da Embrapa Milho e Sorgo. A infestação com as lagartas ocorreu dia 27 de novembro de 2008. As temperaturas registradas no experimento variaram entre 19 °C e 40 °C. Ao final do experimento, folhas de cada cultivar foram colhidas, identificadas e colocadas em sacos de plástico. As folhas foram escolhidas aleatoriamente de cada linhagem visando ter uma média de cada. O material foi armazenado previamente em isopor com gelo até o transporte ao laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram armazenadas em ultrafreezer sob temperatura de -78°C para conservação. As FIGURAS 10, 11 e 12 apresentam fotos ilustrativas deste experimento.

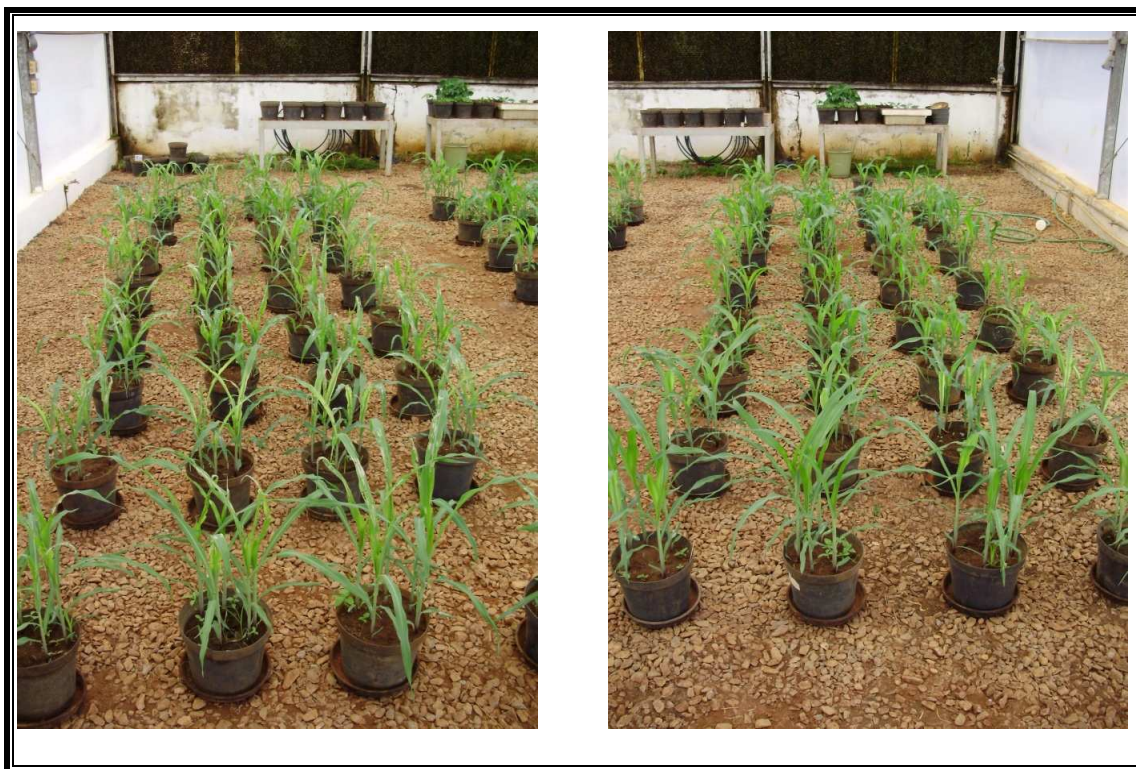


FIGURA 10 – Cultivares do milho em estufa. À esquerda, cultivares infestados com a lagarta. À direita, cultivares controle.



FIGURA 11 – Danos da lagarta-do-cartucho em um cultivar do milho



FIGURA 12 – Cultivar de milho “controle”

3.2.2 Extração das folhas

Cada folha foi limpa com água destilada para retirar possíveis detritos presentes, principalmente terra e fezes do inseto. Foi utilizado papel absorvente para secar as folhas uma a uma. Em seguida, a quantidade de folhas colhida foi pesada. O material seco então foi picotado grosseiramente com uma tesoura convencional e transferido para um gral. A esse, foi adicionado nitrogênio líquido para promover o congelamento das folhas, tornando-as friáveis e possibilitando a trituração do material com pistilo. As

folhas foram trituradas por aproximadamente cinco minutos até a redução a um pó grosso.

O material foi reconstituído com metanol destilado e transferido para um béquer de 500 mL. O volume foi completado para 200 mL do solvente utilizado e submetido a aquecimento sob agitação em agitador magnético até pouco abaixo da temperatura de ebulição do metanol, por cerca de 20 min. O conteúdo do béquer foi filtrado em uma montagem de filtro de vidro sinterizado, papel de filtro e celite como adjuvante de filtração. Ao resíduo, foram adicionados 50 mL de metanol destilado para retirar materiais ainda solúveis. Após a evaporação completa do solvente em um evaporador rotativo à pressão reduzida em temperatura de 45°C, a amostra foi transferida, com o auxílio de uma espátula, para um frasco devidamente pesado. Foi adicionado metanol para solubilizar porções aderidas ao balão. As amostras foram armazenadas no mesmo ultrafreezer sob temperatura de -78°C para conservação até o momento da análise. Cada extrato foi devidamente pesado e codificado.

3.2.3 Análise preliminar

Cerca de 2 mg de cada extrato foram transferidos para frascos devidamente identificados e solubilizados com 0,5 mL de metanol. Com o auxílio de capilares de vidro, as amostras foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel 0,25 mm para se realizar a técnica da cromatografia em camada delgada (CCD) (**FIGURA 13**). Foi utilizada, como eluente, uma seguinte mistura de acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético : água na proporção de 80:11:11:20. Os extratos foram aplicados, da esquerda para a direita, na ordem visualizada na **TABELA 05**. Como revelador, foram utilizadas a solução de NP e solução alcoólica de PEG 4000, observado em lâmpada de ultravioleta de comprimento de onda de 360 nm.

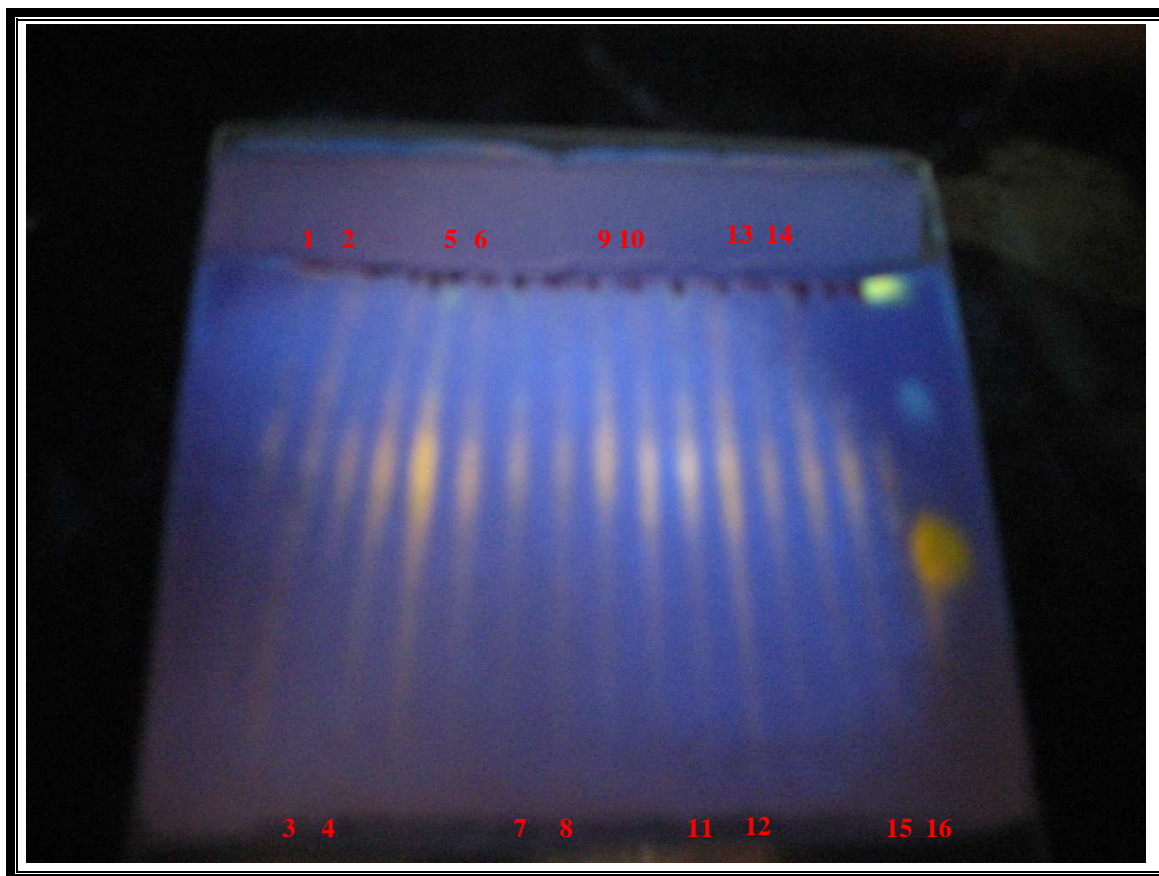


FIGURA 13 – Cromatoplaça dos extratos dos cultivares

Legenda: 1 (Y01-EN1-12), 2 (Y01-SP1-12), 3 (Y01-EN2-12), 4 (Y01-SP2-12), 5 (Y01-EN3-12), 6 (Y01-SP3-12), 7 (Y01-EN4-12), 8 (Y01-SP4-12), 9 (Y01-EN5-12), 10 (Y01-SP5-12), 11 (Y01-EN6-12), 12 (Y01-SP6-12), 13 (Y01-EN7-12), 14 (Y01-SP7-12), 15 (Y01-EN8-12), 16 (Y01-SP8-12).

Na cromatoplaça, os extratos apresentaram-se com o mesmo perfil cromatográfico. Foi utilizada uma solução metanólica de 5 mL contendo cerca de 0,05 mg de alguns padrões disponíveis no laboratório para comparação, como rutina, ácido clorogênico e luteolina (últimas três manchas à direita). Visualmente, não foram identificados nenhum dos padrões utilizados. Além disso, os perfis dos extratos apresentam aspectos semelhantes.

3.2.4 Análise em cromatógrafo líquido – desenvolvimento do método

Para a análise cromatográfica dos extratos, foram pesados 50 mg de cada extrato e transferidos individualmente para frascos diferentes devidamente codificados. Foram

adicionados 5 mL de água ultrapura para a solubilização. As amostras foram sonicadas por cinco minutos por meio de aparelho de ultrassom. A solução foi filtrada em unidade filtrante de 0,45 µm com o auxílio de uma seringa de vidro. Em seguida, a acidez do filtrado foi ajustado para próximo a pH 3. A verificação foi efetuada com fitas indicadoras. O pH inicialmente encontrado, em média, foi igual a 5, sendo necessária a adição de solução 1:1 de ácido acético glacial em quantidade suficiente para a correção.

O filtrado foi submetido à extração em fase sólida por meio da utilização de um cartucho SPE C18 200 mg/3 mL. O cartucho foi tratado anteriormente com 5 mL de metanol e 5 mL de água ultra pura para a ativação da fase estacionária (Lee *et al.*, 2005). Com o auxílio de uma bomba de pressão, o filtrado foi eluído no cartucho. A fase estacionária passou de branco a levemente amarelado e o filtrado antes amarelado teve sua cor reduzida em intensidade. Em seguida, esta foi eluída com 10 mL de água acidificada com ácido acético, pH 3. Essa etapa visou a eluição de substâncias solúveis em água, pois as substâncias fenólicas na forma não ionizada possuem maior afinidade pela fase estacionária.

Em seguida, foram eluídos 20 mL de água alcalinizada (pH 8) com solução de hidróxido de amônio a 25%, sendo coletado um líquido de cor amarela intensa. Isso foi devido à desprotonação causada pela solução alcalina, tornando a fração rica em ácidos fenólicos mais solúveis em água e com menor interação com a fase estacionária. Tal fração foi reduzida em evaporador rotativo a 60°C. Após isso, foi adicionado 1 mL de metanol grau CLAE e a solução formada foi transferida para um frasco eppendorf devidamente identificado.

Foi utilizado, para as análises, um cromatógrafo líquido marca Shimadzu LC10AD *series* dotado de detector de arranjo de diodos SPDM10avp (DAD). Foi utilizado metanol com solvente de purga do sistema injetor.

O método 1 para análise preliminar foi nomeado como método exploratório. Tratou-se de um método de gradiente, utilizando duas soluções para a eluição. A solução A foi de ácido fosfórico 0,2% v/v e a solução B continha acetonitrila e ácido fosfórico 0,2% v/v. O tempo de eluição utilizado foi de 30 minutos. Utilizou-se a seguinte programação: no tempo 0 para o tempo 30 minutos, partiu-se de 5% de B para 95% de B. De 30 a 34 minutos, manteve-se condição isocrática. Para o reequilíbrio da coluna, reestabeleceu-se a concentração inicial: de 34 a 36 minutos, partiu-se de 99% de B para 5% de B e de 36 a 46 minutos, manteve-se a concentração de 5% de B.

A partir dos resultados da análise anterior e posterior otimização do método, foi definido o seguinte método, denominado como método 2: O tempo de eluição utilizado foi de 90 minutos. Utilizou-se a seguinte programação: no tempo 0 para o tempo 65 minutos, partiu-se de 10% de B para 25% de B. De 65 a 67 minutos, partiu-se de 25% de B para 99%, mantendo isocrática em 99% de B até 73 minutos. Para o reequilíbrio da coluna, reestabeleceu-se a concentração inicial: de 73 a 75 minutos, partiu-se de 99% de B para 10% de B e de 75 a 90 minutos, manteve-se a concentração de 10% de B.

Visando a eliminação do tratamento por cartucho de extração em fase sólida, foi proposto um novo método. Cerca de 12 mg de cada extrato foram pesados e transferidos cada um para frascos diferentes devidamente codificados. Após isso, foi medido 1 mL de metanol grau HPLC em pipetador automático para solubilizar cada extrato. Os extratos foram sonicados por 15 minutos em aparelho, filtrados em unidade filtrante de 0,45 µm com o auxílio de uma seringa de vidro e transferidos para *vials* de cromatógrafo devidamente codificados. A injeção foi feita em triplicata.

Inicialmente, foram utilizados os método exploratório e método 2, sendo escolhido este último. As análises foram realizadas com o auxílio do autoinjeter do cromatógrafo líquido. A injeção de todas as amostras foram programadas como batelada. De forma que não ocorresse interrupções na análise, o volume foi calculado em quantidade suficiente para análise em 72 h. Ao término das mesmas, foi utilizado o software SPDMXA *Post Run Analysis*, pertencente ao pacote de aplicativos do cromatógrafo.

Após a análise dos cromatogramas de todas as amostras, foram usados diversos padrões para a identificação das substâncias fenólicas envolvidas na atividade antialimentar por meio da comparação entre tempos de retenção e espectros no ultravioleta. Os padrões usados foram: quercetina, rutina, ácido clorogênico, luteolina, kaempferol e hesperidina. Através da comparação realizada, apenas o ácido clorogênico foi encontrado nos extratos das amostras de folhas. Em seguida, foram realizadas coinjeções dos extratos com a solução padrão de ácido clorogênico. A análise dos cromatogramas dos extratos juntamente com os cromatogramas gerados por meio da coinjeção, permitiu confirmar a presença desta substância.

3.2.5 Curva de calibração do ácido clorogênico

Foram utilizadas diversas soluções de ácido clorogênico de concentrações diferentes para determinar a faixa de concentrações que a curva padrão deveria cobrir, baseando-se nas áreas dos picos referentes à substância nos cromatogramas das amostras (**TABELA 03**). Após a análise das amostras e do padrão, foi verificado que a curva de calibração deveria cobrir uma faixa entre 2 a 60 $\mu\text{g/mL}$.

Foi preparada uma solução estoque partida de ácido de concentração conhecida próxima a 100 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, foram pesados 2,48 g do padrão de ácido clorogênico e adicionados a 25 mL de metanol grau CLAE em um balão volumétrico de 25 mL. As concentrações foram elaboradas de modo que a curva tivesse 7 pontos com concentrações próximas a 60, 50, 40, 30, 20, 10 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Uma alíquota de solução estoque e outra de metanol grau CLAE foram transferidas para um eppendorfs de 1 mL devidamente identificados. Para tal, foram utilizadas pipetas automáticas de 100 μL , 500 μL e variável entre 5-50 μL . A solução foi homogeneizada e filtrada, com o auxílio de uma seringa, em filtros de membrana de 0,45 μm . As soluções foram preparadas na véspera da análise e mantidas resfriadas até momento anterior a análise.

TABELA 03

Valores utilizados para o preparo das soluções padrão de ácido clorogênico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Volume adicionado para o preparo dos padrões (μL)	
Teórica	Real	Solução estoque	Metanol
60	59,52	600	400
50	49,60	500	500
40	39,68	400	600
30	29,76	300	700
20	19,84	200	800
10	9,92	100	900
2	1,984	20	980

3.2.6 Espectrometria de massas

As amostras foram enviadas à Central Analítica (Instituto de Química da Universidade de São Paulo). A análise foi realizada em equipamento cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas. Tratava-se de Esquire 3000 Plus (Bruker

Daltonics), voltagem do capilar 4000 V, temperatura capilar de 320 °C, modo positivo, fluxo de gás de arraste 7.0 L/min, pressão de 28 psi, fluxo para massa de 100 µL/min.

3.2.7 Testes biológicos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cromatografia e Sala de Criação de Lagartas da EMBRAPA Milho e Sorgo em 29 de julho de 2009. Oito bandejas de plástico contendo oito blocos de dezesseis células cada foram utilizadas. Foi preparada a dieta de Resse modificada (Viana *et al.*, 1997) (**TABELA 04**), sendo vertido 1 mL dessa sobre cada célula.

TABELA 04

Componentes do meio utilizado como dieta para a lagarta-do-cartucho

INGREDIENTE	QUANTIDADE
Feijão pintado	333,0 g
“Torula yeast”	101,4 g
Germe de trigo	158,4 g
Ácido ascórbico	10,2 g
p-hidróximetilbenzoato	6,3 g
Ácido sórbico	3,3 g
Ágar	41,0 g
Solução 40% formalina	8,3 mL
Água	2400,0 mL

O ensaio foi delineado de tal forma que cada célula tivesse 15 mg de extrato de cultivar seco. Desse modo, foram necessários 240 mg de extrato para cada bloco. Inicialmente, foi necessário a realização de 4 replicatas para cada extrato. Considerando as quantidades de cada extrato, não foi possível a realização dos ensaios de forma igualitária. Assim, quando possível, foram realizadas mais replicatas.

Os extratos foram totalmente solubilizados utilizando metanol como solvente, observando as massas e volumes descritos na **TABELA 05**. Com o auxílio de uma pipeta automática, 30 µL de cada extrato líquido foram vertidos sobre cada célula, utilizando a dieta como suporte. As aplicações foram divididas em três de 10 µL cada, permitindo um intervalo de 10 minutos para que o solvente evaporasse.

TABELA 05

Massa e volume utilizados para a realização do teste biológico

Extrato	Cultivar	Massa (mg)	Volume de metanol adicionado (mL)	Número de replicatas
1	Y01-EN1-12	2,9658	5,937	4
2	Y01-SP1-12	2,1815	4,363	3
3	Y01-EN2-12	3,1309	6,626	4
4	Y01-SP2-12	2,3235	4,647	4
5	Y01-EN3-12	2,2837	4,567	4
6	Y01-SP3-12	0,6509	1,302	2
7	Y01-EN4-12	2,3888	4,778	4
8	Y01-SP4-12	0,3591	0,720	1
9	Y01-EN5-12	5,3303	10,66	4
10	Y01-SP5-12	1,2045	2,409	4
11	Y01-EN6-12	5,8258	11,652	4
12	Y01-SP6-12	0,3183	0,637	1
13	Y01-EN7-12	2,4173	4,835	4
14	Y01-SP7-12	0,6081	1,216	2
15	Y01-EN8-12	4,2812	8,562	4
16	Y01-SP8-12	0,6939	1,388	2
17	Metanol	-	-	4
18	Branco	-	-	4

Somente o solvente foi aplicado em alguns blocos, obtendo-se assim o controle do solvente. Foram realizadas três aplicações de 10 μ L, com intervalo de 10 minutos entre cada, totalizando 30 μ L. Em outros blocos, não foi aplicado solvente ou extrato, obtendo-se então o controle positivo (branco). Após a aplicação do extrato, as bandejas foram transferidas para uma sala de temperatura controlada, permitindo a evaporação completa do solvente. No dia seguinte, foram colocadas lagarta recém-eclodidas em cada célula. O experimento foi conduzido por sete dias.

Ao término do experimento, foi verificada a mortalidade de lagartas. Em seguida, as lagartas foram retiradas das células e adicionadas em potes plásticos para posterior determinação de massa, comprimento e tamanho da cápsula cefálica, parâmetros esses utilizados para a avaliação de antibiose nas lagartas (Viana e Potenza, 2000). A massa de sobra de dieta também foi avaliada.

3.2.8 Bioautografia

Foram utilizados os fungos *Aspergillus flavus* e *Cladosporus cladosporioides*, pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos dos cultivares.

Os materiais foram previamente esterilizados utilizando autoclave ou bico de Bunsen para tal. A capela de fluxo laminar foi previamente limpa com álcool 70%.

Os extratos foram dissolvidos utilizando acetato de etila em um frasco de vidro de forma que 20 µL da solução apresentasse 200 µg de extrato.

Foram aplicados 20 µL por ponto (ou 200 µg) Com o auxílio de um capilar de vidro, os extratos foram aplicados, em duplicata, em cromatoplaça de sílica. A distância entre os pontos aplicados foi de aproximadamente 1 cm. Foi aplicado um ponto somente com o solvente utilizado, servindo como controle negativo. O suporte foi transferido para capela de fluxo laminar após a aplicação, permitindo que o solvente evaporasse completamente.

Paralelamente, foi preparada a suspensão de esporos. Os fungos *Aspergillus flavus* e *Cladosporium cladosporioides*, pertencentes à coleção do laboratório, foram repicados, em torno de um bico de bunsen em capela de fluxo laminar, para um tubo de ensaio contendo solução salina. A suspensão foi homogeneizada por agitador de tubos por 1 min. Em seguida, houve a contagem de esporos em câmara de Neubauer utilizando um microscópio ótico.

Para o ensaio com *A. flavus*, foi utilizado meio de cultura contendo $0,5 \times 10^6$ de esporos por mL. No caso de *C. cladosporioides*, foram realizados dois ensaios: um contendo $0,5 \times 10^6$ esporos por mL e outro contendo $3,0 \times 10^4$ esporos por mL.

Cada meio de cultura preparado foi transferido para placas de Petri. Com auxílio de uma pinça, o suporte contendo os extratos foi imerso no meio de cultura. A seguir, o suporte foi retirado e transferido para uma placa de Petri vazia utilizada para

incubação. Foi adicionado um chumaço de algodão embebido em água destilada estéril a placa de incubação. A placa foi lacrada com fita crepe e incubada a temperatura entre 28 e 30 °C. A leitura foi realizada após 3 dias do início do ensaio.

3.2.9 Análise quimiométrica

Visando a análise estatística dos cromatogramas, foram realizadas a análise de componentes principais (ACP) e a análise hierárquica de agrupamentos (AHA), utilizando o aplicativo Statistica 6.0 para tal. Para isso, os cromatogramas dos extratos foram convertidos em arquivo de texto, utilizando o comprimento de onda 320 nm como fonte de dados de absorvância, o comprimento de onda utilizado durante todo o estudo. As colunas referentes ao tempo de retenção e absorvância no comprimento de onda selecionado foram transferidos para o aplicativo Statistica 6.0. Em seguida, foi obtida a média de cada conjunto de replicatas e gerado os gráficos de ACP e AHA. Com o AHA foi possível construir uma classificação dos cromatogramas dos extratos, aproximando-os com relação à composição química.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração das folhas e quantificação do ácido clorogênico

As TABELAS 06 e 07 contêm a codificação, as massas das plantas utilizadas nas extrações e as massas dos extratos secos. As extrações foram realizadas em duas ocasiões diferentes. Os extratos resultantes da primeira extração (TABELA 06) foram utilizados para o desenvolvimento da metodologia enquanto que aqueles da segunda extração (TABELA 07) foram utilizados para a identificação, quantificação e testes biológicos.

TABELA 06

Massa de folha de cultivares utilizados para a extração e respectiva massa do extrato – primeira extração

LINHAGEM	CÓDIGO	Massa de folha (g)	Massa do extrato (g)
Cultivares não infestados			
LCMS23-23	Y01-EN1-09	10,22	0,4181
LCMS23-21B	Y01-EN2-09	10,44	0,5628
MIRT-2Q	Y01-EN3-09	10,26	0,5058
LMIRT-2Q	Y01-EN4-09	10,23	0,4144
HSCMS23-6LCMS2323 X LCMS23-21B	Y01-EN5-09	10,38	0,567
HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B	Y01-EN6-09	10,10	0,4629
L3	Y01-EN7-09	10,18	0,1447
ZAPALOTE CHICO	Y01-EN8-09	10,21	0,4244
Cultivares infestados			
LCMS23-23	Y01-SP1-09	10,25	0,4051
LCMS23-21B	Y01-SP2-09	10,24	0,386
MIRT-2Q	Y01-SP3-09	10,25	0,3014
LMIRT-2Q	Y01-SP4-09	10,34	0,2821
HSCMS23-6LCMS2323 X LCMS23-21B	Y01-SP5-09	10,20	0,2686
HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B	Y01-SP6-09	10,19	0,1763
L3	Y01-SP7-09	10,24	0,3616
ZAPALOTE CHICO	Y01-SP8-09	10,39	0,3199

TABELA 07

Massa de folha de cultivares utilizados para a extração e respectiva massa do extrato – segunda extração

LINHAGEM	CÓDIGO	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)
Cultivares não infestados			
LCMS23-23	Y01-EN1-12	100,91	3,22775
LCMS23-21B	Y01-EN2-12	81,84	3,27669
MIRT-2Q	Y01-EN3-12	69,56	2,36306
LMIRT-2Q	Y01-EN4-12	70,31	2,67261
HSCMS23-6LCMS2323 X LCMS23-21B	Y01-EN5-12	120,43	5,45808
HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B	Y01-EN6-12	138,89	6,10713
L3	Y01-EN7-12	82,87	3,59434
ZAPALOTE CHICO	Y01-EN8-12	100,93	4,46138
Cultivares infestados			
LCMS23-23	Y01-SP1-12	87,91	2,5292
LCMS23-21B	Y01-SP2-12	62,76	2,43885
MIRT-2Q	Y01-SP3-12	35,06	0,70226
LMIRT-2Q	Y01-SP4-12	12,02	0,35956
HSCMS23-6LCMS2323 X LCMS23-21B	Y01-SP5-12	41,21	1,98272
HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B	Y01-SP6-12	21,13	0,32971
L3	Y01-SP7-12	16,20	0,62762
ZAPALOTE CHICO	Y01-SP8-12	19,22	0,70896

Com a obtenção dos dados, foi determinado o rendimento médio de extrato por massa úmida (**TABELA 08**). Como o material analisado foi limitado, não houve outras extrações para determinação da reprodutibilidade do rendimento.

TABELA 08

Produção média de extrato por massa

CÓDIGO*	RENDIMENTO (%)	CÓDIGO*	RENDIMENTO (%)
Y01-EN1	2,9390	Y01-SP1	2,4815
Y01-EN2	3,8256	Y01-SP2	3,7022
Y01-EN3	3,2831	Y01-SP3	1,8565
Y01-EN4	3,3975	Y01-SP4	2,9913
Y01-EN5	4,4260	Y01-SP5	2,9228
Y01-EN6	4,1945	Y01-SP6	1,5088
Y01-EN7	2,9957	Y01-SP7	3,7540
Y01-EN8	4,2418	Y01-SP8	3,6105
MÉDIA	3,6629	MÉDIA	2,8535

* Os códigos referem-se à média da primeira com a segunda extração

O ácido clorogênico foi identificado a partir da comparação do espectro no ultravioleta (**FIGURA 14**) armazenado no aplicativo *Class LC-10* com os picos dos cromatogramas dos extratos (**FIGURA 15**). A presença foi confirmada por meio da adição de padrão nos extratos. Os cromatogramas de todos os extratos são mostrados na seção de Anexos.

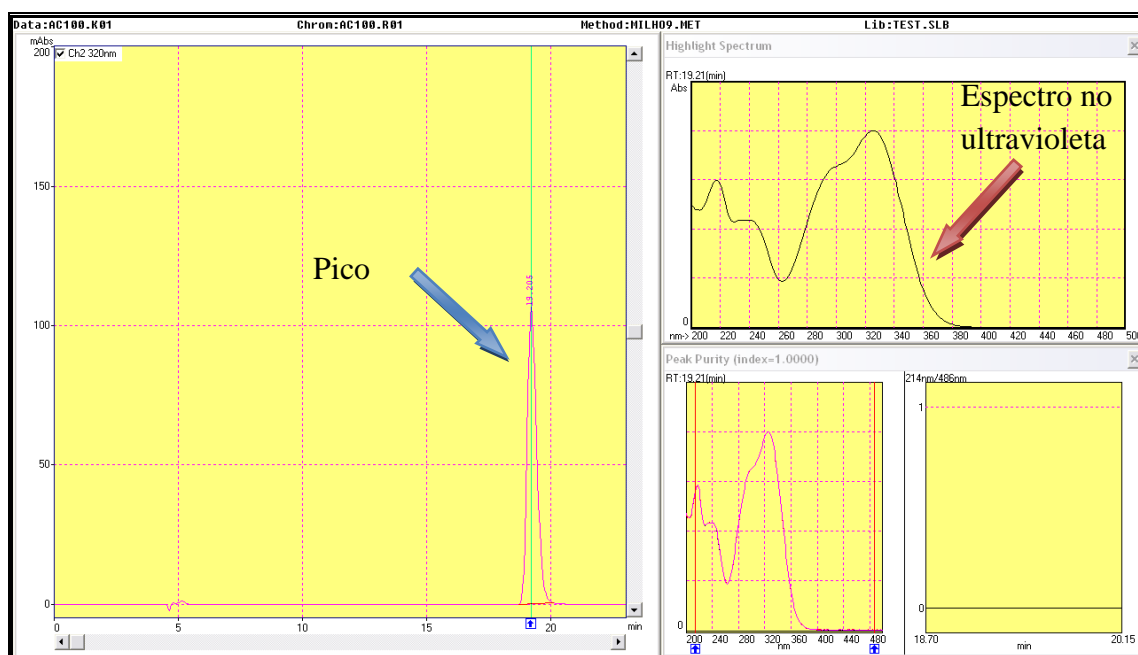


FIGURA 14 – Cromatograma do padrão ácido clorogênico 100 mg/mL

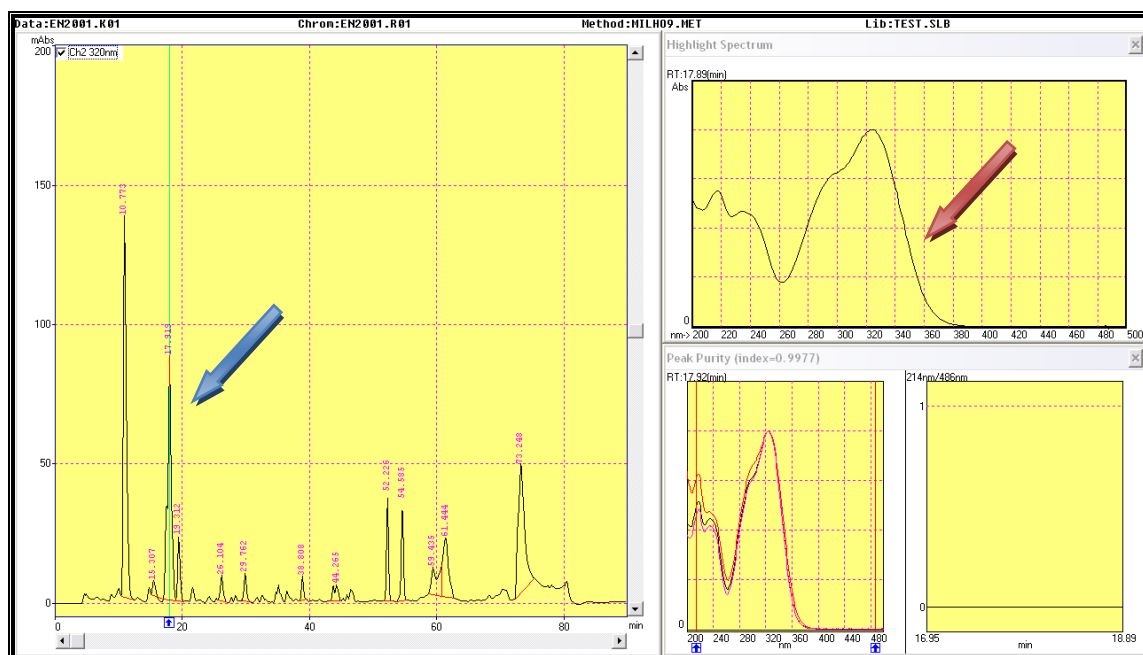


FIGURA 15 – Cromatograma do extrato EN2, evidenciando o pico referente ao ácido clorogênico (seta em azul) e o respectivo espectro (seta vermelha)

Após a análise dos extratos, dados referentes aos tempos de retenção e área de cada pico foram extraídos, tanto da série de calibração (**TABELA 09**) quanto dos extratos analisados (**TABELA 10**), permitindo a quantificação da substância.

TABELA 09

(continua)

Dados de área e tempo de retenção (t_R) dos picos referentes ao ácido clorogênico de cada extrato

	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
Y01-EN1-12	21,908	2.028.792	20,222	2.012.213	22,516	1.973.503
Y01-SP1-12	22,918	1.338.443	22,959	1.358.105	19,606	1.378.764
Y01-EN2-12	17,917	2.798.748	18,760	2.875.780	20,370	2.620.092
Y01-SP2-12	19,819	2.903.265	20,742	2.635.550	20,560	2.575.319
Y01-EN3-12	20,671	319.090	20,827	320.638	21,080	322.025
Y01-SP3-12	21,323	246.953	21,474	242.632	20,772	227.218
Y01-EN4-12	21,677	1.865.123	21,829	1.848.122	21,586	1.877.498
Y01-SP4-12	21,57	1.973.051	21,438	1.957.198	21,578	1.973.851
Y01-EN5-12	18,281	1.411.197	18,479	1.387.965	18,883	1.402.194

TABELA 09**(conclusão)**

Dados de área e tempo de retenção (t_R) dos picos referentes ao ácido clorogênico de cada extrato

	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
Y01-SP5-12	20,988	380.986	20,302	379.927	20,472	383.393
Y01-EN6-12	19,497	688.519	19,59	682.793	19,645	679.077
Y01-SP6-12	18,905	584.039	18,431	633.613	19,047	591.513
Y01-EN7-12	19,233	511.657	19,359	512.898	19,474	515.988
Y01-SP7-12	21,103	665.323	21,336	653.716	21,332	659.055
Y01-EN8-12	-	-	-	-	-	-
Y01-SP8-12	19,881	363.425	20,38	355.553	20,28	357.182

“-” significa a ausência de detecção da substância.

TABELA 10

Dados obtidos para a obtenção da curva de calibração

Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Primeira série		Segunda série		Terceira série	
	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área	t_R (min)	Área
2,0	15,565	93.291	15,524	91.923	15,537	92.994
10,0	15,495	553.595	15,396	551.405	15,492	551.037
20,0	15,552	1.135.918	15,113	1.160.929	15,064	1.160.947
30,0	15,04	1.687.098	14,118	1.706.262	14,11	1.706.262
40,0	15,28	2.277.320	15,141	2.267.502	15,188	2.268.067
50,0	15,137	2.901.021	15,351	2.830.873	15,174	2.861.324
60,0	14,907	3.552.223	15,009	3.477.746	15,068	3.464.002

Observação: Conc. = Concentração, t_R = tempo de retenção

A média da área sob o pico foi utilizada para a construção da curva de calibração. Para tal foi utilizada a função regressão linear do aplicativo *MicrocalOrigin*, fornecendo um gráfico (**GRÁFICO 1**). Considerando a equação de regressão linear (**I**), a equação do gráfico (**II**) foi determinada. Além disso, foi obtido o valor do quadrado do coeficiente de linearidade (R^2) (**III**).

I - $y = ax + b$

II - $y = 58719,394x - 31191,9700$

III - $R^2 = 0,9992$

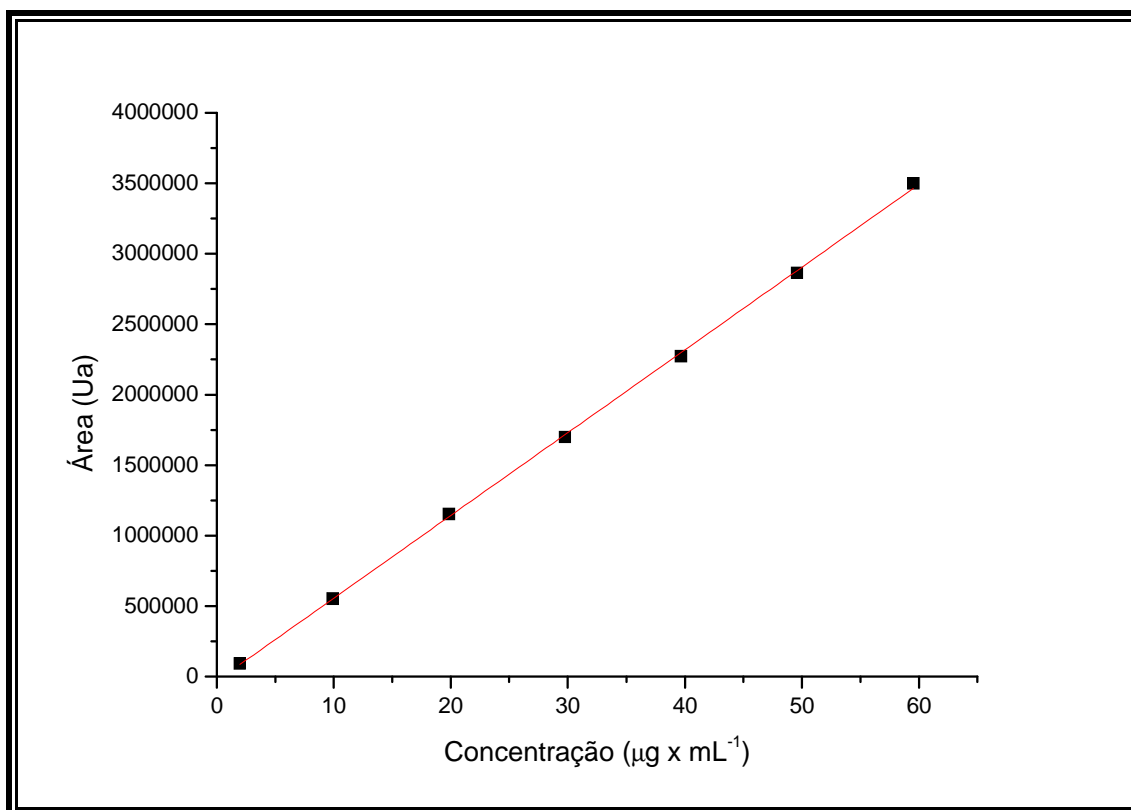


GRÁFICO 01

Área dos picos cromatográficos em função da concentração de ácido clorogênico.

Foram determinadas, com o auxílio do aplicativo *Microsoft Excel*, as concentrações de ácido clorogênico na solução preparada de extrato, a concentração de ácido clorogênico por extrato e a concentração de ácido clorogênico por massa de folha de milho (**TABELA 11**).

TABELA 11
Quantificação do ácido clorogênico

Código da amostra	Concentração do ácido clorogênico (µg/mL)	Massa do extrato (mg)	Ácido clorogênico /extrato (µg/mg)	Ácido clorogênico /folha (µg/g)
Y01-EN1-12	34,67	11,99	2,8919	92,50
Y01-SP1-12	23,67	12,15	1,9478	56,04
Y01-EN2-12	47,62	12,00	3,9681	158,87
Y01-SP2-12	46,59	12,08	3,8570	149,88
Y01-EN3-12	5,99	12,08	0,4959	16,85
Y01-SP3-12	4,60	12,07	0,3811	7,63
Y01-EN4-12	32,27	12,09	2,6690	101,45
Y01-SP4-12	34,05	12,09	2,8161	84,24
Y01-EN5-12	24,38	12,08	2,0183	91,47
Y01-SP5-12	7,03	12,09	0,5812	27,96
Y01-EN6-12	12,17	12,10	1,0058	44,23
Y01-SP6-12	10,80	11,88	0,9092	14,19
Y01-EN7-12	9,28	12,87	0,7208	31,26
Y01-SP7-12	11,76	12,03	0,9776	37,87
Y01-EN8-12	-	11,91	-	-
Y01-SP8-12	6,64	12,16	0,5461	20,14

“-” significa que não foi detectada substância.

Não foi detectado ácido clorogênico em Y01-EN8-12. A amostra desse extrato foi preparada novamente, não se observando novamente a presença do ácido. Individualmente, as amostras Y01-EN2-12, Y01-SP2-12, Y01-EN4-12 e Y01-EN1-12 continham a maior concentração de ácido clorogênico por folha.

Para a comparação dos valores de ácido clorogênico entre cultivares, foi utilizado o teste *t*, ao nível de 5% de significância. O extrato Y01-EN8-12 não foi considerado para a análise por não ter sido detectada a substância. Os dados encontram-se na seção anexos.

Quando o valor P encontrado, fornecido pelo teste supramencionado, for maior que 0,05, é considerado que não há diferença estatística entre o par de amostras infestada – não infestada. Entre mesmos cultivares, não houve diferença significativa entre a concentração de ácido apenas para LCMS23-21B, conforme descrito na TABELA 12. Entre cultivares diferentes, considerando apenas os que sofreram o mesmo tratamento, todos apresentam diferença significativa entre si.

TABELA 12

Valor P fornecido por teste *t*, ao nível de significância de 5%, em comparação de extrato infestado *versus* não infestado

Cultivar	Valor P
LCMS23-23	0,000006
LCMS23-21B	0,658110
MIRT-2Q	0,000174
LMIRT-2Q	0,000492
HSCMS23-6LCMS2323 X CMS23-21B	0,000000
HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B	0,006837
L3	0,000002
ZAPALOTE CHICO	INEXISTENTE

Após a avaliação estatística, foi avaliada a variação do ácido clorogênico nos extratos dos diferentes cultivares (TABELA 13). O valor encontrado para a diferença entre cultivar infestado e não infestado de LCMS23-21B foi descartado já que não foi encontrada diferença significativa entre eles. Situação semelhante de ZAPALOTE CHICO, já que não foi detectado ácido no cultivar não infestado. Pode inferir-se que, com exceção de L3, houve redução da concentração da substância na folha nos cultivares infestados. A redução mais acentuada foi para MIRT-2Q e HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B, superior a 50% de redução. Apenas o cultivar L3 houve aumento da produção de ácido.

Observados os resultados, sugere-se que a tendência de redução da concentração de ácido clorogênico possa ser explicada como uma alteração metabólica da planta. O

organismo pode utilizar o ácido clorogênico como precursor de uma substância que apresente maior atividade contra o inseto. Para confirmar essa hipótese, seria necessário, num momento posterior, um estudo mais aprofundado, em grande escala de material, variando o tempo de exposição da planta ao inseto e o uso de técnicas hífenadas, como CLAE acoplada a EM, como banco de dados de espectro.

TABELA 13

Redução, em porcentagem, da quantidade de ácido clorogênico do cultivar

Cultivar (amostra não infestada/infestada)	Porcentagem (%)
LCMS23-23 (Y01-EN1-12/ Y01-SP1-12)	39,4
LCMS23-21B (Y01-EN2-12/ Y01-SP2-12)	5,6
MIRT-2Q (Y01-EN3-12/ Y01-SP3-12)	54,7
LMIRT-2Q (Y01-EN4-12/ Y01-SP4-12)	17
HSCMS23-6LCMS2323 X CMS23-21B (Y01-EN5-12/ Y01-SP5-12)	69,4
HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B (Y01-EN6-12/ Y01-SP6-12)	44,23
L3 (Y01-EN7-12/ Y01-SP7-12)	-21,1
ZAPALOTE CHICO (Y01-EN8-12/ Y01-SP8-12)	*

Valor negativo significa aumento da produção de ácido.

O asterisco (*) significa que não foi possível a determinação, pois não foi detectado ácido no cultivar infestado.

4.2 Espectro de massas

Os espectros de massa foram obtidos na Central Analítica da USP, São Paulo. Em análise destes cromatogramas, foi percebido que estavam visualmente diferentes dos cromatogramas gerados no laboratório da UFMG. Como as amostras foram enviadas por correio, mesmo em embalagem sob refrigeração, o motivo das diferenças observadas pode estar relacionado à degradação de alguma substância durante o traslado. Ainda sim, alguns espectros foram analisados em busca de informações. Na seção Anexos, encontram-se os espectros de massas (ionogramas) dos extratos (ANEXOS 21 a 35). Foram identificados, nos extratos Y01-EN1-12 e Y01-SP1-12

(FIGURAS 16 a 19), um pico que, em análise do referente espectro, contém um fragmento m/z igual a 349,8. Essa massa é próxima à massa do ácido clorogênico: 354,3039 g/mol.

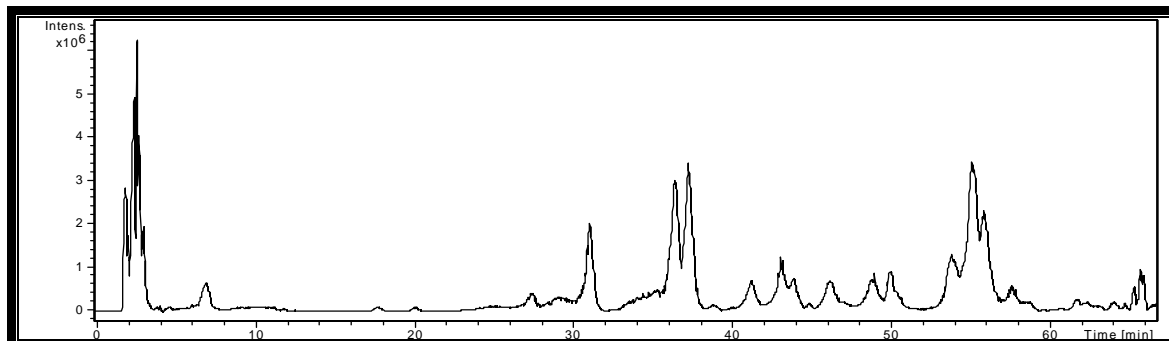


FIGURA 16 – Ionograma de Y01-EN1-12

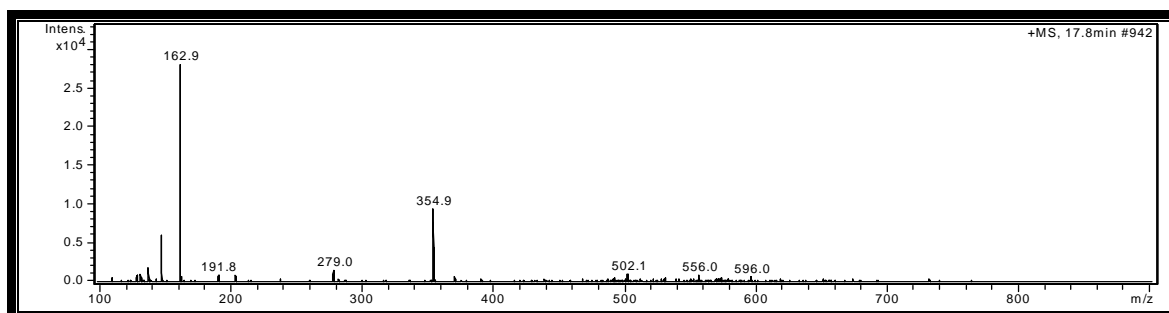


FIGURA 17 – Espectro de massas do tempo de retenção 17,8 min de Y01-EN1-12

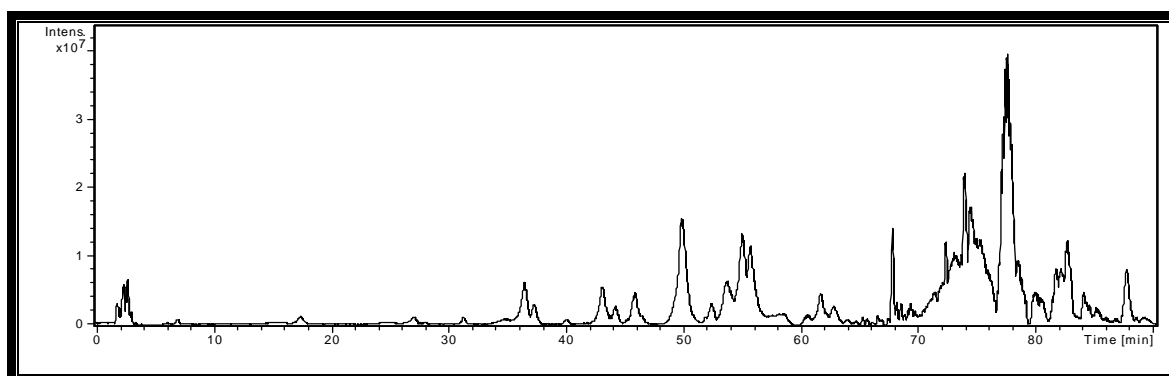


FIGURA 18 – Ionograma de Y01-SP1-12

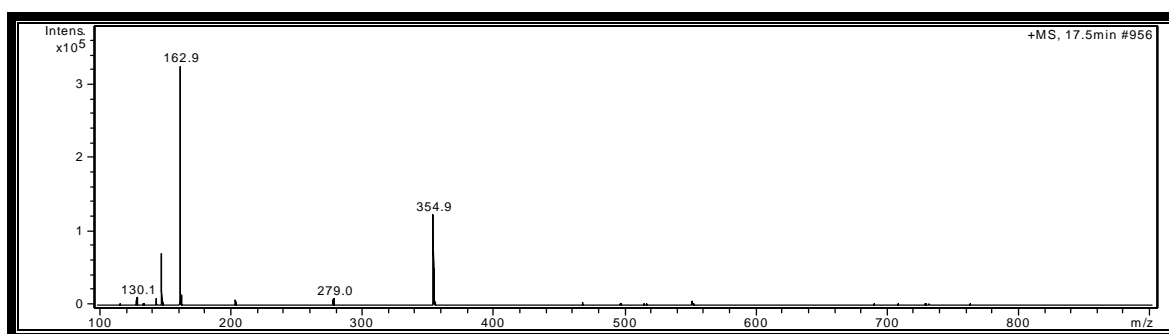


FIGURA 19 – Espectro de massas do tempo de retenção 17,5 min de Y01-SP1-12

Foram detectados e considerados os fragmentos, além do fragmento citado, com relação m/z igual a 191,8 e 162,9, para Y01-EN1-12, e o fragmento com relação m/z igual a 162,9, para Y01-SP1-12. O fragmento com relação m/z igual a 279,0 foi desconsiderado. Não há informação a respeito da pureza do pico podendo ser, esse fragmento, alguma impureza.

As **FIGURAS 20, 20 e 22** contêm propostas de obtenção do íon molecular e dos fragmentos com relação m/z igual a 162,9 e 191,8. Para o fragmento com relação m/z igual a 162,9, chegou-se em uma estrutura com massa igual a 163,1513. Para o fragmento com relação m/z igual a 191,8, chegou-se numa estrutura com massa igual a 191,1579. Verificou-se que os três fragmentos apresentam massa maior que a estimada entre 0,5 e 0,7.

Observou-se que a fragmento com relação m/z igual a 162,9 pode ser a mais estável das estruturas devido a maior intensidade do pico observado nos ionogramas das **FIGURAS 17 e 19**.

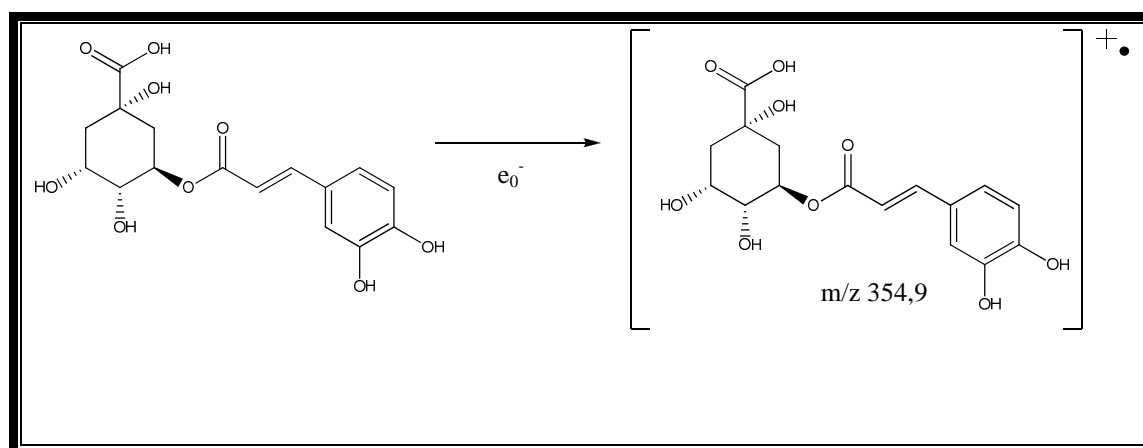


FIGURA 20 - Proposta para o mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico. Obtenção do íon molecular.

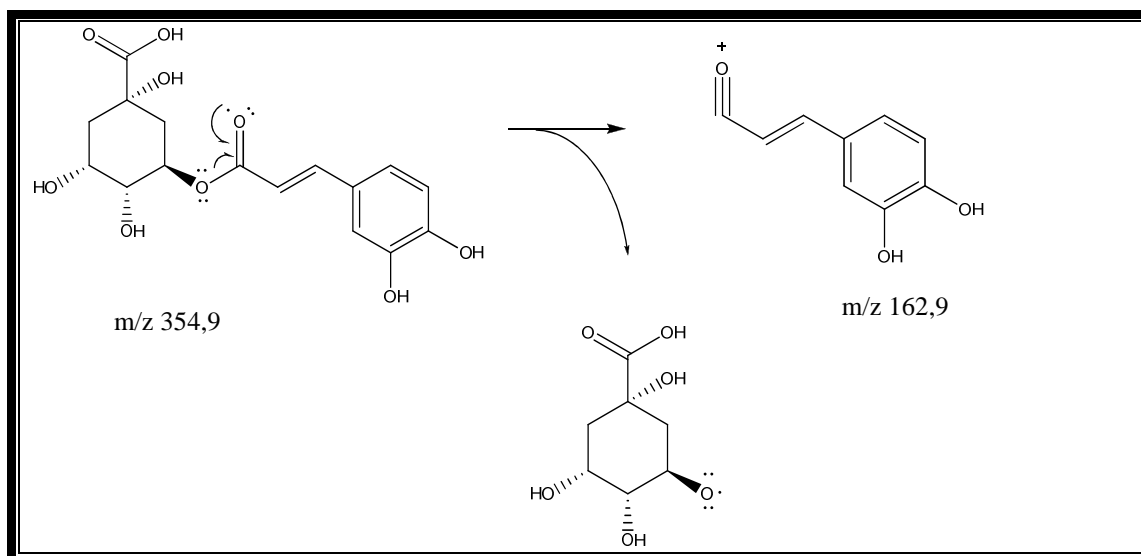


FIGURA 21 - Proposta para o aparecimento do fragmento com m/z 162,9.

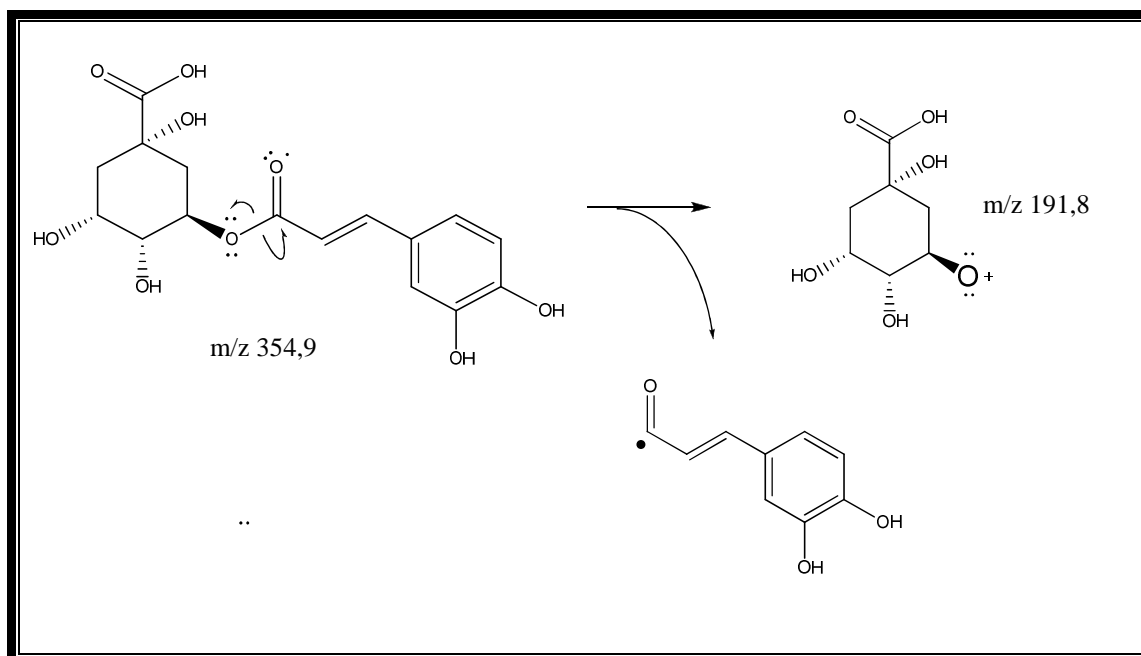


FIGURA 22 - Proposta para o aparecimento do fragmento com m/z 191,8.

4.2 Ensaio dos efeitos do extrato sobre a lagarta-do-cartucho

As bandejas utilizadas para o ensaio e o detalhe da célula da bandeja podem ser observadas nas **FIGURAS 23 e 24**. Os dados relativos à massa restante da dieta, comprimento da lagarta e largura da cápsula cefálica encontram-se na Seção Anexos. A **TABELA 14** contém as médias desses dados para cada cultivar. Os dados foram tratados estatisticamente, utilizando o programa SAS. As médias foram comparadas utilizando o teste t, com nível de significância de 5%.



FIGURA 23 - Bandeja onde foi realizado o teste com os extratos dos cultivares



FIGURA 24 - Detalhes das células da bandeja: lagarta e fonte de alimentação

TABELA 14

Médias dos valores coletados do ensaio biológico na lagarta-do-cartucho

CULTIVAR	Massa da dieta (mg)	Comprimento da lagarta (mm)	Largura da cápsula cefálica (mm)
Y01-EN1-12	661,986695	71,697917	1,00076122
Y01-SP1-12	556,966296	109,315278	1,63958333
Y01-EN2-12	612,551563	66,357465	0,98958333
Y01-SP2-12	536,235104	79,583681	1,22326389
Y01-EN3-12	469,775729	100,430952	1,54419643
Y01-SP3-12	566,978125	67,861818	0,77306548
Y01-EN4-12	670,169618	103,419296	1,30610119
Y01-SP4-12	779,570000	103,006667	1,57291667
Y01-EN5-12	493,569934	106,302435	1,57291667
Y01-SP5-12	620,297222	72,390865	1,36493056
Y01-EN6-12	532,962813	83,141369	1,31798115
Y01-SP6-12	694,793750	46,000000	0,38333333
Y01-EN7-12	642,131042	61,111074	1,19024725
Y01-SP7-12	683,996042	63,880000	1,05555556
Y01-EN8-12	577,110045	87,327266	1,42699748
Y01-SP8-12	698,977273	50,600000	0,93460648
Metanol	471,510045	114,691771	1,76961806
Branco	373,264063	162,645313	2,03645833

A **TABELA 15** contém a classificação, em ordem crescente, dos comprimentos das lagartas. Já a **TABELA 16** contém a classificação, em ordem crescente, da largura da cápsula cefálica. Todos os extratos apresentaram diferenças significativas com relação ao branco e ao solvente metanol.

Não houve diferença significativa entre as massas do restante da dieta. Com relação aos outros dois parâmetros, houve diferença significativa ao nível de significância de 5%. O solvente metanol interfere em pequena escala no ensaio, quando comparado com o controle positivo. Contudo, todos os cultivares apresentaram resultados diferentes do solvente, não comprometendo na realização do mesmo. Como o metanol foi o único solvente que conseguiu solubilizar a totalidade do extrato, não

foram realizados testes com outros solventes.

As linhagens apresentaram diferentes graus de resistência à lagarta quando comparados com o controle positivo.. De uma forma geral, não houve fago-estimulação da lagarta. Todos os extratos causaram algum grau de inibição na lagarta-do-cartucho. Isso pôde ser percebido comparando o comprimento e largura da cápsula da lagarta, quando alimentadas com os extratos, com os dados do controle positivo. As lagartas desenvolveram-se menos quando comparadas com a lagarta-controle.

TABELA 15

Classificação, em ordem crescente, do comprimento da lagarta

Extrato	Comprimento da lagarta (mm)	Classificação Teste t*
Y01-SP6-12	46,000000	g
Y01-SP8-12	50,600000	g
Y01-EN7-12	61,111074	g
Y01-SP7-12	63,880000	fg
Y01-EN2-12	66,357465	fg
Y01-SP3-12	67,861818	efg
Y01-EN1-12	71,697917	efg
Y01-SP5-12	72,390865	defg
Y01-SP2-12	79,583681	cdefg
Y01-EN6-12	83,141369	cdefg
Y01-EN8-12	87,327266	cdefg
Y01-EN3-12	100,430952	cdef
Y01-SP4-12	103,006667	cde
Y01-EN4-12	103,419296	cde
Y01-EN5-12	106,302435	cd
Y01-SP1-12	109,315278	bc
Metanol	114,691771	b
Branco	162,645313	a

*Mesmo grupo de letras significa a ausência de diferença estatística entre as amostras

TABELA 16

Classificação, em ordem crescente, da largura da cápsula cefálica da lagarta

Extrato	Largura da Cápsula Cefálica (mm)	Classificação Teste t*
Y01-SP6-12	0,38333333	f
Y01-SP3-12	0,77306548	ef
Y01-SP8-12	0,93460648	def
Y01-EN2-12	0,98958333	def
Y01-EN1-12	1,00076122	def
Y01-SP7-12	1,05555556	def
Y01-EN7-12	1,19024725	de
Y01-SP2-12	1,22326389	cde
Y01-EN4-12	1,30610119	cd
Y01-EN6-12	1,31798115	cd
Y01-SP5-12	1,36493056	bcd
Y01-EN8-12	1,42699748	bcd
Y01-EN3-12	1,54419643	bcd
Y01-SP4-12	1,57291667	abcd
Y01-EN5-12	1,57291667	abcd
Y01-SP1-12	1,63958333	abc
Metanol	1,76961806	ab
Branco	2,03645833	a

*Mesmo grupo de letras significa a ausência de diferença estatística entre as amostras

Em termos qualitativos, quando são analisados os dados contidos nas TABELAS 15 e 16, os extratos Y01-SP6-12, Y01-SP8-12, Y01-EN2-12, Y01-SP3-12, Y01-EN7-

12 e Y01-SP7-12 foram os que apresentaram maior inibição. Y01-EN1-12, Y01-SP2-12, Y01-SP5-12, Y01-EN6-12 e Y01-EN8-12 apresentaram inibição mediana. Y01-EN3-12, Y01-EN4-12, Y01-SP4-12, Y01-EN5-12 e Y01-SP1-12 apresentaram menor inibição da lagarta do cartucho.

Foi percebida a tendência dos extratos de plantas infestadas, codificados como “SP”, apresentaram maior atividade que aqueles de plantas não infestadas, codificados como “EN”. Assim foi sugerido que, de algum modo, o dano foliar provocado por *S. frugiperda* possa interferir no metabolismo secundário da planta, desencadeando a produção de substâncias com algum grau de atividade contra a lagarta-do-cartucho. Seria uma tentativa de a planta reduzir os danos provocados pelo inseto.

Analisando os extratos dos cultivares não infestados, LCMS23-21B e L3 destacam-se pela maior resistência a lagarta. MIRT-2Q, LMIRT-2Q e HSCMS23-6LCMS2323 X CMS23-21B tiveram seus extratos com a menor atividade. Com relação aos infestados, destacam-se, em termos de atividade, HSMIRT4LMRT2A X LMIRT20B e ZAPALOTE CHICO. Já LMIRT-2Q e LCMS23-23 foram os extratos com menor atividade.

Fazendo um paralelo com a determinação da concentração de ácido clorogênico (TABELA 11), em relação aos cultivares não infectados, foi percebido que o extrato do cultivar LCMS23-21B conciliou maior atividade com a maior concentração do ácido clorogênico (158,87 $\mu\text{g/g}$ de folha). Por outro lado, o extrato L3 não apresentou esse comportamento. Foi observada uma boa atividade, contudo foi um dos extratos com menor concentração observada da substância (31,26 $\mu\text{g/g}$ de folha). Também não foi observada relação entre concentração de ácido clorogênico, atividade nos outros extratos dos cultivares não infectados e nos extratos dos infectados.

Foram comparados a porcentagem de redução na concentração de ácido clorogênico com os dados das atividades dos extratos infestados. Não foram encontradas quaisquer relações.

4.3 Resultado da Bioautografia

Os resultados do ensaio podem ser visualizados por meio das **FIGURAS 25 à 27**. Não foi visualizada atividade de nenhum extrato. Entretanto, cabe ressaltar que o teste foi realizado com extrato bruto. O extrato contém dezenas de substâncias em pequenas e ínfimas quantidades, concentrações por vezes que impedem a manifestação da atividade, no caso, antifúngica.

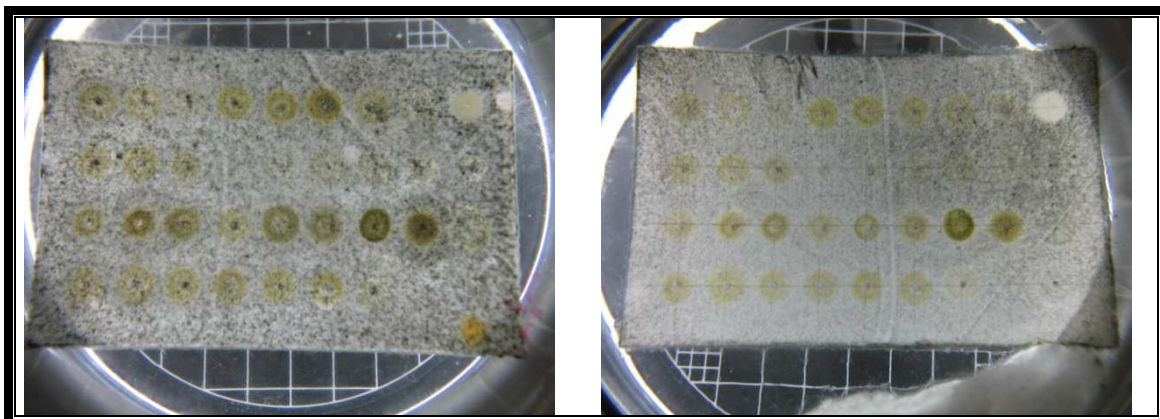


FIGURA 25 – Duplicatas do teste com *C. cladosporioides* $0,5 \times 10^6$ esporos por mL

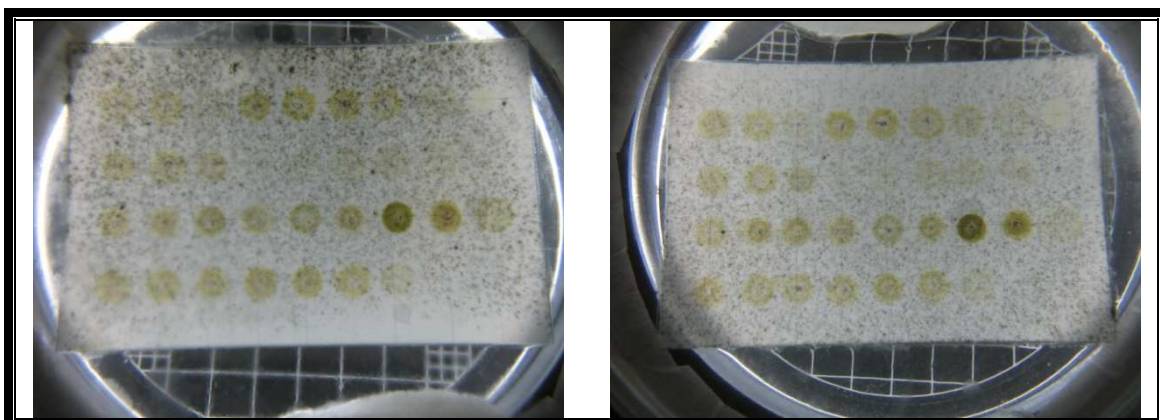


FIGURA 26 - Duplicatas do teste com *C. cladosporioides* $3,0 \times 10^5$ esporos por mL

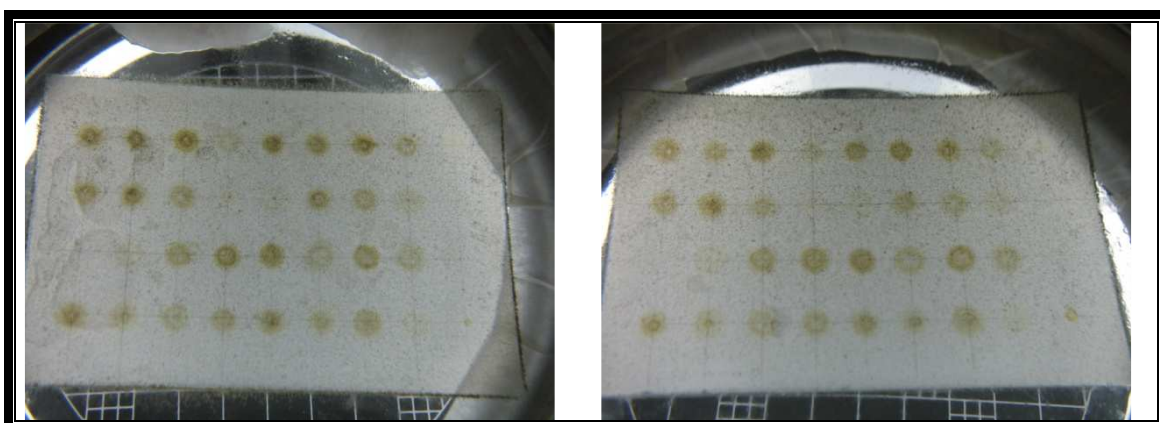


FIGURA 27 - Duplicatas do teste com *A. flavus* $0,5 \times 10^6$ esporos por mL

4.2 ACP E AAH

O resultado da ACP pode ser visualizada no **GRÁFICO 2**. Foram escolhidas as duas componentes que apresentavam a maior variância explicada, PC1 e PC2, para a similaridade. Como foi observada a aproximação dos pontos de vários extratos na representação gráfica, foi utilizada como codificação a porção do meio dos códigos dos extratos.

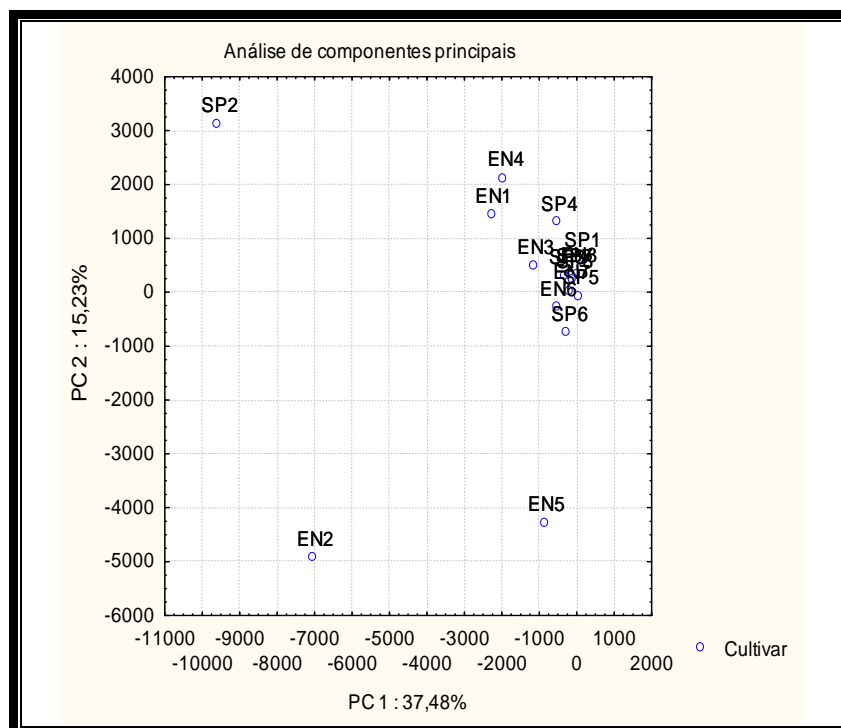


GRÁFICO 02 – Análise de componentes principais dos 16 extratos utilizando dois componentes: PC1 (37,48%) e PC2 (15,23%)

Em análise desse gráfico, percebe-se a presença de um grupo bastante definido. Apenas os extratos Y01-EN2-12, Y01-EN5-12 e Y01-SP2-12 estão bem distantes desse grupo. Inicialmente, foi considerado que os pares infestado e não infestado apresentassem maior similaridade entre si do que entre cultivares, genótipos, diferentes. O cultivar LCMS23-21B (Y01-EN2-12 e Y01-SP2-12) veio de encontro a essa expectativa. Os extratos se distanciam, observando o gráfico, não só entre si como do grupo principal. O cultivar não infestado HSCMS23-6LCMS2323 X LCMS23-21B também estava afastado do grupo principal. Entretanto, o cultivar infestado apresentou similaridade ao grupo principal.

O dendograma, visualizado no **GRÁFICO 3**, visa explicitar similaridades entre grupos.

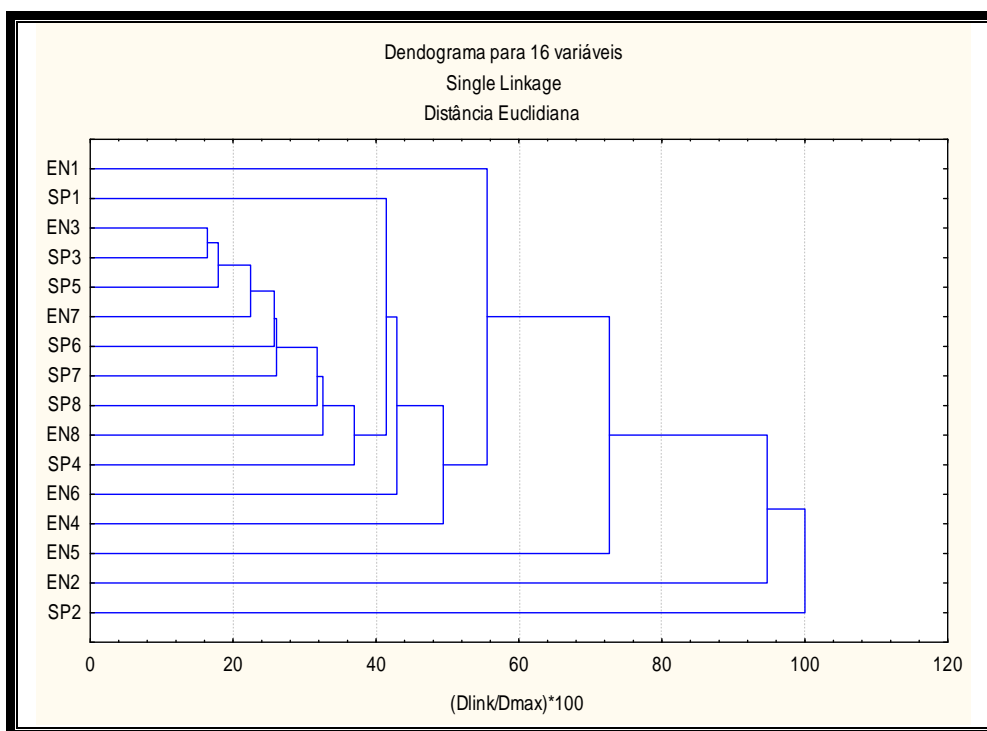


GRÁFICO 3 – Dendograma da classificação das amostras

Em análise do dendograma gerado, visualiza-se a aproximação das amostras. As amostras mais similares são agrupadas na mesma chave. Foi percebida certa aproximação entre ACP e AAH. Em ambos, há um grupo mais bem definido e o cultivar LCMS23-21B apresentou-se distante entre si e do grupo.

O par de extratos infestado e não infestado de MIRT-2Q (SP3 e EN3) são mais semelhantes entre si. O par do cultivar LCMS23-21B (EN2 e SP2) apresentou maior distinção entre si devido a maior distância de ligação entre eles. Nota-se que o par de HSCMS23-6LCMS2323 X LCMS23-21B (EN5 e SP5) não se encontra na mesma chave ou em um grupo próximo. O extrato infestado desse cultivar apresentou maior semelhança com o extrato de MIRT-2Q.

Levando em consideração as duas análises estatísticas percebe-se que os cromatogramas e, conseqüentemente, os cultivares, foram sensivelmente alterados quando foram expostos a lagarta-do-cartucho, quando comparamos extratos infestados com os não infestados de um mesmo cultivar. Ainda, o aumento e/ou diminuição da

biossíntese de certas substâncias pode aproximar o conteúdo metabólico de cultivares diferentes ou afastar, no caso, um cultivar infestado de um não infestado.

Capítulo 5

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÕES

O deterrente alimentar, ácido clorogênico, foi identificado, por meio da comparação entre espectros no ultravioleta em cromatografia de alta eficiência da amostra e padrão e espectro de massas.

Exceto o extrato Y01-EN8-12, referente ao cultivar ZAPALOTE CHICO não infestado pela lagarta, todos os extratos dos cultivares, sejam aqueles que não foram infestados ou aqueles que foram, apresentam o ácido clorogênico.

Foi percebida, em cinco cultivares, a redução de concentração de ácido em extratos de cultivares não infestados para o não infestados. Nos outros três, um deles não apresentou diferença estatística e os outros deles apresentaram síntese da substância.

A concentração de ácido, a princípio, não está relacionada diretamente a atividade antialimentar.

Dois cultivares que se destacaram no ensaio biológico com a lagarta-do-cartucho não apresentaram redução na concentração do ácido clorogênico. Um deles, ao contrário, apresentou aumento da concentração.

Em teste dos extratos brutos, não foi possível visualizar atividade antifúngica contra *A. flavus* e *C. cladosporioides*.

O dano foliar provocado por *S. frugiperda* interfere no perfil metabólico dos cultivares do milho. Propõe-se que o milho responda à lagarta por meio do aumento da síntese de substâncias, podendo inclusive utilizar substâncias existentes como precursoras de outras que apresentam atividade antialimentar.

Capítulo 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

Agroatlas, 2009. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries – Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds. Disponível em <http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Zea_mays_K/>. Acesso em 20 de maio de 2010.

Albuquerque, M.A., Ferreira, R.L.C. Silva, J.A.A., Santos, E.S., Stosic, B., Souza, A.L., 2006. Estabilidade em análise de agrupamento: estudo de caso em ciência florestal. *Revista Árvore* 30, 257-265.

Andrade, M.F., Souza, D.J.P., Silva, J.B.P., Paim, A.P.S., 2008. Análise multivariada de parâmetros físico-químicos em amostras de vinhos tintos comercializados na região metropolitana do recife. *Química Nova* 31, 296-300.

Australian Government, 2008. The Biology of *Zea mays* L. SSP *mays* (maize or corn) Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator, 01-80.

Beserra, E.B., Parra, J.R.P., 2005. Impact of the number of *Spodoptera frugiperda* egg layers on parasitism by *Trichogramma atopovirilia*. *Scientia Agricola* 62, 190-193.

Bige, T., Lorenzoni, C., 2007. Characterization of maize (*zea mays* l.) Germplasm of angola. *Maydica* 52, 135-144.

Casas, V., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T., 2007. Effects of sample pretreatment and storage conditions in the determination of pyrethroids in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1841-1849.

Capinera, J.L., 2008. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1-6.

Chandwani, R.M., Pate, M.E., Savery, J., Thornhill, N.F., Horstmann, B., Hoare, M., Titchener-Hooker, N.J., 1997. The use of principal component analysis as a database mining tool for the exploratory diagnosis of chromatographic processes. *Bioprocess Engineering* 17, 229-234.

Chen Y., Ni, X., Buntin, G.D., 2009. Physiological, Nutritional, and Biochemical Bases of Corn Resistance to Foliage-Feeding Fall Armyworm. *Journal of Chemical Ecology* 35, 297–306.

Chen, H., Pan, Z., Talaty, N., Raftery, D., Cooks, R.G., 2006. Combining desorption electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for differential metabolomics without sample preparation. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 20, 1577–1584.

Cimilho (Centro de Inteligência do Milho), 2010. Múltiplos Usos do Milho (Planta, Espiga e Grão) no Brasil. Extraído de <<http://cimilho.cnpms.embrapa.br/processamento/processamento.php>>. Acesso em 02 de março de 2010.

Cohen, M., Grossman, A.D, Morabito, D., Knudson, M.M., Butte, A.J, Manley, G.T., 2010. Identification of complex metabolic states in critically injured patients using bioinformatic cluster analysis. *Critical Care* 14, 1-11.

Common Chemistry – Substance Details, 2011. American Chemical Society. <<http://www.commonchemistry.org/ChemicalDetail.aspx?ref=309-00-2>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2011.

Correia, P.R.M., Ferreira, M.M.C., 2007. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova* 30, 481-487.

Cruz, I. 2002. Manejo da Resistência de Insetos-Praga a Inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 21, 1-32.

Cunha, U.S., Martins, J.F.S., Porto, M.P., Garcia, M.S., Bernardi, O., Trecha, C.O., Bernardi, D., Jardim, E.O., Back, E.C.U., 2008. Resistência de genótipos de milho para cultivo em várzeas subtropicais à lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*. *Ciência Rural* 38, 1125-1128.

Dixon, R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

Dowd, P. F., Johnson, E.T., 2009. Differential resistance of switchgrass *Panicum virgatum* L. lines to fall armyworms *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Genetic Resources and Crop Evolution* 56, 1077-1089.

Duete, R.R.C., Muraoka, T., Silva, E.C.S., Trivelin, P.C.O., Ambrosano, E.J., 2009. Viabilidade econômica de doses e parcelamentos da adubação nitrogenada na cultura do milho em LATOSSOLO VERMELHO Eutrófico *Acta Scientiarum*. *Agronomy Maringá*, v. 31, n. 1, p. 175-181.

Escobar, C.A., Dieter, S., Niemeyer, H., 1999. Evaluation of DIMBOA analogs as antifeedants and antibiotics towards the aphid *Sitobion avenae* in artificial diets. *Journal of Chemical Ecology* 25, 1543-1554.

Embrapa (Empresa Brasileira de Agropecuária), 2008. Cultivo do milho. Extraído de <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>>. Acesso em 02 de março de 2010.

Encyclopedia Britannica. 2010. History & Society: Arawak. Extraído de <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/32234/Arawak>>. Acesso em 02 de março de 2010.

FAO (Food And Agriculture Organization), 2010. Faostat. Extraído de <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 02 de março de 2010.

Farias, P.R.S., Barbosa, J.C.E., Busoli, A.C., 2001. Distribuição Espacial da Lagarta-do-Cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na Cultura do Milho. *Neotropical Entomology* 30, 681-689.

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

Fritz, L.L., Heinrichs, E.A., Pandolfo M., Salles, S.M., Oliveira, J.V., Fiuza, L. M., 2008. Agroecossistemas orizícolas irrigados: Insetos-praga, inimigos naturais e manejo integrado. Oecologia Brasiliensis 12, 720-732.

Geladi, P., 2003. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. Spectrochimica Acta Part B 58, 767–782.

Giolo, F.P., Grützmacher, A.D., Garcia, M.S., Busato, G.R., 2002. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (j.e. Smith, 1797) (lep.:noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. Revista Brasileira de Agrociência 8, 219-224.

Government of Canada, 2003. Canadian Biodiversity Information Facility. Disponível em:<[http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/noctuoidea/jpgs/image_e.php?image\[\]=109665.jpg,Spodoptera+exigua&image\[\]=109666.jpg,Spodoptera+frugiperda&image\[\]=109669.jpg,Spodoptera+ornithogalli&image\[\]=109667.jpg,Spodoptera+praeifica](http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/noctuoidea/jpgs/image_e.php?image[]=109665.jpg,Spodoptera+exigua&image[]=109666.jpg,Spodoptera+frugiperda&image[]=109669.jpg,Spodoptera+ornithogalli&image[]=109667.jpg,Spodoptera+praeifica)>. Acesso em 20 de abril de 2010.

Gueldner, R.C., Snook, M.E., Widstrom, N.W., Wiseman, B.R., 1992. TLC screen for maysin, chlorogenic acid, and other possible resistance factors to the fall armyworm and the corn earworm in *Zea mays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 1211-1213.

Hartings, H., Berardo, N., Mazzinelli, G.F., Valoti, P., Verderio, A., Motto, M., 2008. Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP Profiling TAG Theoretical and Applied Genetics 117, 831–842.

Heyer, M.H., Schloerb, F.P., 1997. Application of Principal Component Analysis to Large-Scale Spectral Line Imaging Studies of the Interstellar Medium. The Astrophysical Journal 475, 173-187.

Hida, M., 1995. New Analytical Method of Dye Aggregation using PCA Method. *Dyes and Pigments* 27, 123-132.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2010. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Extraído de <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>>. Acesso em 02 de março de 2010.

Isman, M., 2002. Insect Antifeedants. *Pesticide Outlook* 13, 152-153.

Iwashina, T., 2003. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in space* 17, 24-44.

Jain, D.C., Tripathi, A.K., 1993. Potential of Natural Products as Insect Antifeedants. *Phytotherapy Research* 7, 327-334.

Johnson, A.W., Snook, M.E., Wiseman, B.R., 2002. Green Leaf Chemistry of Various Turfgrasses: Differentiation and Resistance to Fall Armyworm. Published in *Crop Science* 42, 2004-2010.

Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I.S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., Psarra, E., 2001. Instrumental and sensory analysis of greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry* 73, 501-514.

Kdnya, Z., Cserhdti, T., Forgacs, E., 2003. Using Principal Component Analysis for the Study of the Retention Behaviour of Phenol Derivatives under Reversed-Phase Conditions. *Chromatographia* 57, 451-456.

Kendall, A., Chang, B., 2009. Estimating life cycle greenhouse gas emissions from corn-ethanol: a critical review of current U.S. practices. *Journal of Cleaner Production* 17, 1175-1182.

Kim, S., Dale, B.E., 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26, 361 – 375.

Kim, S., Dale, B.E., 2005. Life cycle assessment of various cropping systems utilized for producing biofuels: Bioethanol and biodiesel. *Biomass and Bioenergy* 29, 426-439.

Kojima, W., Fujii, T., Suwa, M., Miyazawa, M., Ishikawa, Y., 2010. Physiological adaptation of the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis* to chemical defenses of its host plant, maize. *Journal of Insect Physiology*, artigo on-line. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T3F-501JWFT-4-H&_cdi=4945&_user=686413&_pii=S002219101000137X&_orig=search&_coverDate=05%2F08%2F2010&_sk=999999999&view=c&wchp=dGLbVzz-zSkWb&md5=09e9b08177f9274a6992938f6ef2a037&ie=/sdarticle.pdf> Acesso em: 10 de junho de 2010.

Koul, O., 2008. Phytochemicals and Insect Control: an antifeedant approach. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27, 1-24.

Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L., 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1094, 122–129.

Lima, F.W.N., Ohashi, O.S., Souza, F.R.S., Gomes, F.S., 2006. Avaliação de acessos de milho para resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Acta Amazonica* 36, 147-150.

Lima, J.L., Souza, J.C., Machado, J.C., Ramalho, M.A.P., 2008. Controle genético da exigência térmica para o início do florescimento em milho. *Bragantia* 67, 127-131.

Lima, R.K., Cardoso, M.G., Moraes, J.C., Melo, B.A., Rodrigues, V. G., Guimarães, P.L., 2009. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazonica* 39, 377-382.

López-Ovejero, R.F., Fancelli, A.L., Dourado-Neto, D., García Y García, A., Christoffoleti, P.J., 2003. Seletividade de herbicidas para a cultura de milho (*Zea mays*) aplicados em diferentes estádios fenológicos da cultura. *Planta Daninha* 21, 413-419.

Machado, V.; Wunder, M., Baldissera, V.D., Oliveira, J.V., Fiúza, L.M., Nagoshi, R.N., 2008. Molecular Characterization of Host Strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern Brazil. *Annals of the Entomological Society of America* 101, 619-626.

Martinelli, S., Barata, R.M., Zucchi, M.I., Silva-Filho, M.C., Omoto, C., 2006. machado of *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 99, 519-526.

Mendez, W.A., Valle, J., Ibarra, J.E., Cisneros, J., Penagos, D.I., Williams, T., 2002. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control* 25, 195–206.

Moragas, W.M., Schneider, M.O., 2003. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no brasil. *Caminhos de Geografia* 3, 26-40.

Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., Rogers, K.R., 2001. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosensors & Bioelectronics* 16, 225–230.

Nagoshi, R.N., Silvie, P., Meagher, R.L., Lopez, J., Machado, V., 2007. Identification and comparison of fall armyworm (lepidoptera: noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. *Annals Of The Entomological Society Of America* 100, 394-402.

Narendra, M., Kavitha G., Kiranmai, A.H., Rao, N.R., Varadacharyulu, N.C., 2008. Chronic exposure to pyrethroid-based allethrin and prallethrin mosquito repellents alters plasma biochemical profile. *Chemosphere* 73, 360–364.

Negrisola Jr., A.S., Garcia, M.S., Negrisola, C.R.C.B., 2010. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Crop Protection* in press, 1–5.

Ni, X., Krakowsky, M.D., Buntin, G.D., Rector, B.G., Guo, B., Snook, M.E., 2008. Identification of Multiple Ear-Colonizing Insect and Disease Resistance in CIMMYT Maize Inbred Lines with Varying Levels of Silk Maysin. *Journal of Economy Entomology* 101, 1455-1465.

Nielsen, N.P.V., Carstensen, J. M., Smedsgaard, J., 1998. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A* 805, 17–35.

Oliveira, M. S. S., Roel, A.R.R., Arruda, J.A., Marques A.S., 2007. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: noctuidae). *Ciência e Agrotecnologia* 31, 326-331.

Otto, M., 2007. *Chemometrics – Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. 2nd Edition. Weinheim, Wiley-VCH, 1-343.

Passarino, G., Montesanto, A., De Rango, F., Garasto, S., Berardelli, M., Domma, F., Mari, V., Feraco, E., Franceschi, C., De Benedictis, G., 2007. A cluster analysis to define human aging phenotypes. *Biogerontology* 8, 283–290.

Pereira, E.J.G., Picanço, M., Guedes, R.N.C., Faleiro, F.G., Araújo, J.M., 2000. Suscetibilidade de populações de milho a *Spodoptera frugiperda* Smith e *Helicoverpa zea* Bod. (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Scientiarum* 22, 931-936.

Piubelli, G.C., Moscardi, F.; Hoffmann-Campo, C.B., 2009. Interactions among insect-resistant soybean genotypes extracts with populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) susceptible and resistant to its nucleopolyhedrovirus. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81, 861-871.

Poolpak, T., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Arjarasirikoon, U., Thanwaniwat N., 2008. Residue analysis of organochlorine pesticides in the Mae Klong river of Central Thailand. *Journal of Hazardous Materials* 156, 230–239.

PubChem Compound, 2011. NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=91748>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2011.

Regnault-Roger, C., 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* 2, 25-34.

Rice-Evans C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 933-956.

Risher, J.F., Mink, F.L., Stara, J.F., 1987. The Toxicologic Effects of the Carbamate Insecticide Aldicarb in Mammals: A Review. *Environmental Health Perspectives* 72, 267-281.

Robertson, D.G., 2005. Metabonomics in Toxicology: A Review. *Toxicological Sciences* 85, 809-822.

Rostás, M., 2001. The effects of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one on two species of *Spodoptera* and the growth of *Setosphaeria turcica* in vitro. *Journal of Pest Science* 80, 35–41.

Sá, V.G.M., Fonseca, B.V.C., Boregas, K.G.B., Waquil, J.M., 2009. Sobrevivência e Desenvolvimento Larval de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Hospedeiros Alternativos. *Neotropical Entomology* 38, 108-115.

Saito, M.L., Pott, A., Ferraz, J.M.G., Nascimento, R.S., 2004. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH) E *Anticarsia gemmatalis* HUBNER. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 14, 1-10.

Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoha, D., Lambonia, Y., Debeverea, J., Devliegherea, F., 2007. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage?. *Food Microbiology* 24, 465-473.

Santos, L.M., Redaelli, L.R., Diefenbach, L.M.G., Efrom, C.F.S., 2004. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. *Ciência Rural* 34, 345-350.

Saraji, M., Esteki, N., 2008. Analysis of carbamate pesticides in water samples using single-drop microextraction and gás chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 1091-1100.

Siloto, R.C., 2002. Danos e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) em genótipos de milho. Piracicaba. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1-105.

Silva, D.M.P., Oliveira, J.V., Tabosa, J.N., Barros, R., Santos, E.O., Azevedo, S.S., 2000. Identificação de fontes de resistência de milho à *Spodoptera frugiperda* (j. E. Smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae) em campo. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43, 345-348.

Silveira, L.C.P., Vendramim, J.D., Rossetto, C.J., 1997. Efeito de Genótipos de Milho no Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26, 291-298.

Simmonds, M.S.J., 2003. Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64, 21–30.

Snook, M.E., Wiseman, B.R., Widstrom, N.W., Wilson, R.L., 1994. Chemicals associated with maize resistance to corn earworm and fall armyworm. In: J. A. Mihm (ed.), *Proc. Insect Resistant Maize: Recent Advances and Utilization*, 37-45.

Spurr, E.B., McGregor, P.G., 2003. Potential invertebrate antifeedants for toxic baits used for vertebrate pest control - A literature review. Department of Conservation, Wellington, New Zealand. Extraído de: <<http://www.doc.govt.nz/upload/documents/science-and-technical/sfc232.pdf>>. Acesso em 20 de março de 2010.

Stout, M.J., Riggio, M.R., Yang, Y., 2009. Direct Induced Resistance In *Oryza sativa* to *Spodoptera frugiperda*. *Environmental Entomology* 38, 1174-1181.

Tavares, W.S., Cruz, I., Petacci, F., Assis Júnior, S.L., Freitas, S.S., Zanuncio, J. C., Serrão, J.E., 2009. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). *Industrial Crops and Products* 30, 384-388.

Tiemann, U., 2008. *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reproductive Toxicology* 25, 316–326.

Tutorvista, 2010. Tutorvista – Science form 5 notes. Disponível em <<http://www.tutorvista.com/topic/science-form-5-notes>>. Acesso em 20 de maio de 2010.

Vera, N., Misico, R., Sierra, M.G., Asakawa, Y., Bardón, A., 2008. Eudesmanes from *Pluchea sagittalis*. Their antifeedant activity on *Spodoptera frugiperda*. *Phytochemistry* 69, 1689-1694.

Viana, P.A., Guimarães, P.E.O., 1997. Maize resistance to the lesser cornstalk borer and fall armyworm in Brazil. In: *Proceedings of an International Symposium, 1997*, 112-116.

Viana, P.A., Potenza, M.R., 2000. Avaliação de antibiose e não-preferência em cultivares de milho selecionados com resistência à lagarta-do-cartucho. *Bragantia* 59, 27-33.

Viana, P.A., Prates, H.T., Ribeiro, P.E.A., 2007. Efeito de extratos de nim e de métodos de aplicação sobre o dano foliar e o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Revista Brasileira de Milho e Sorgo 6, 17-25.

Viant, M.R., Pincetich, C.A., Tjeerdema, R.S., 2006. Metabolic effects of dinoseb, diazinon and esfenvalerate in eyed eggs and alevins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) determined by ¹H NMR metabolomics. Aquatic Toxicology 77, 359–371.

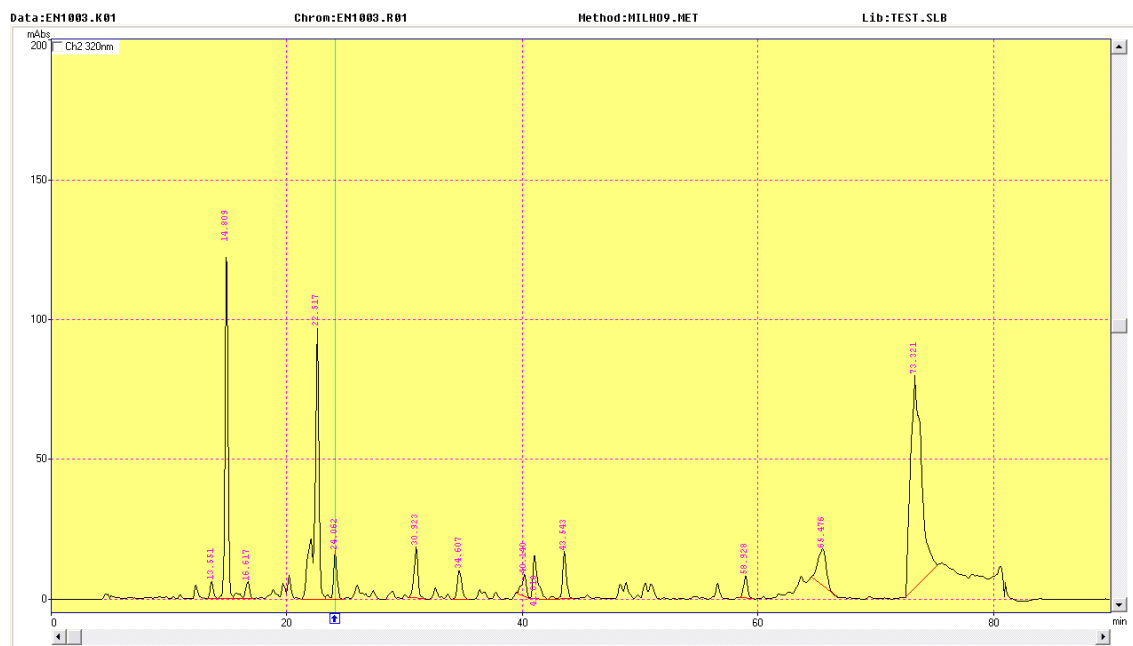
Waquil, J.M., Villela, F.M.F., Foster, J.E., 2002. Resistência do milho (*Zea mays L.*) transgênico (bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Brasileira de Milho e Sorgo 1, 1-11.

WHO (World Health Organization), 2002. Specifications and evaluations for public health pesticides d-allethrin. (rs)-3-allyl-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl (1r)-cis, transchrysanthemate. 1-24. Extraído de <http://www.who.int/whopes/quality/en/dAllethrin_spec_eval_March_04.pdf>. Acesso em 20 de março de 2010.

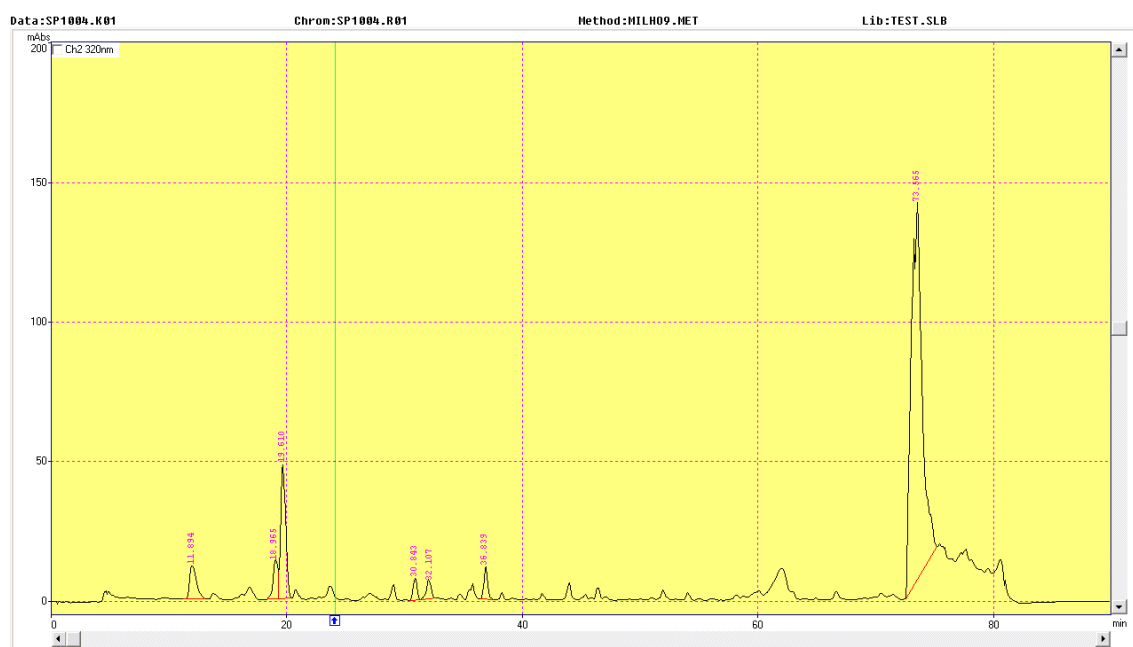
Wikipédia, a enciclopédia livre. Commodity. Extraído de <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Commodity>>. Acesso em 02 de março de 2010.

Yuan, J.S., Tiller, K.H., Al-Ahmad, H., Stewart, N. R., Stewart Jr, C.N., 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the Future. Trends in Plant Science 13,421-429.

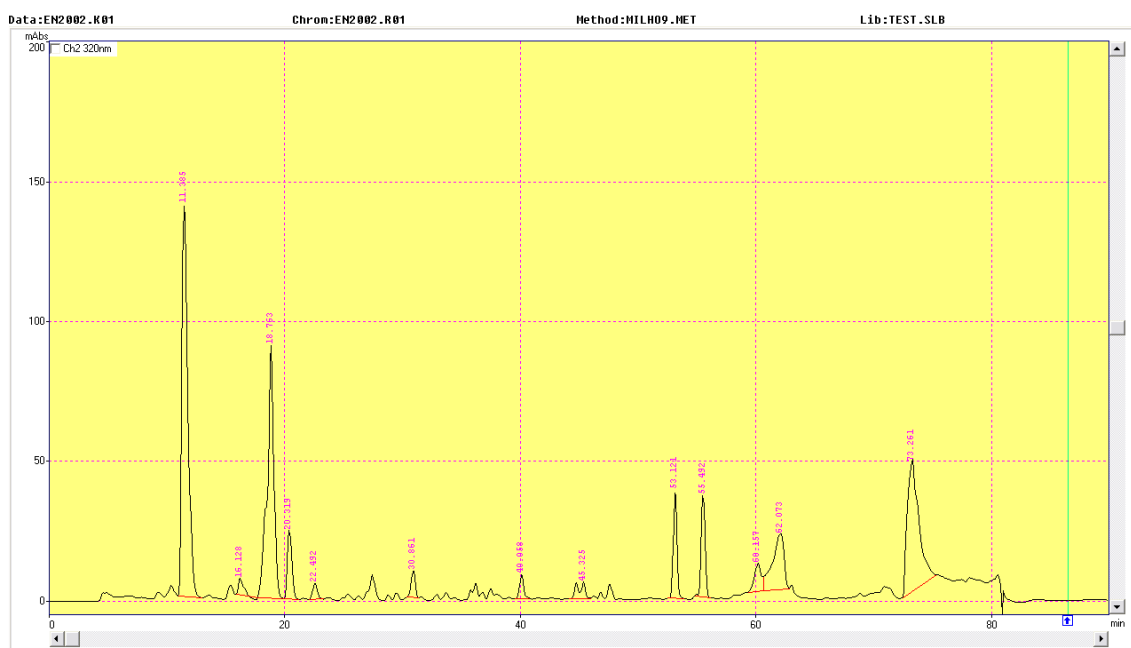
7. ANEXOS



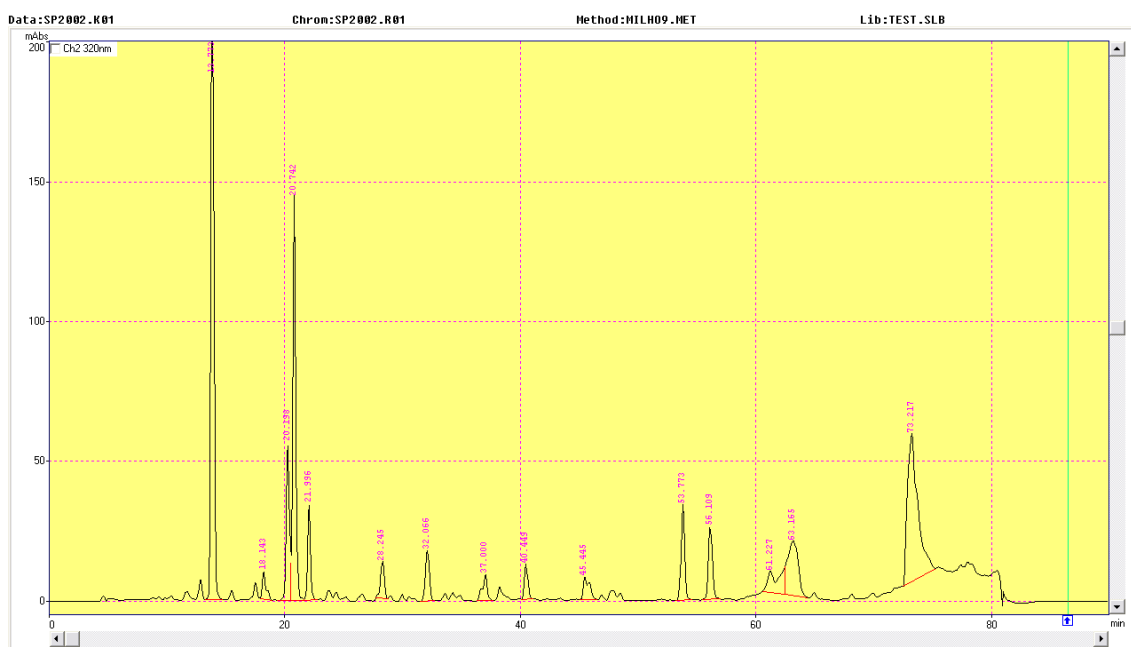
ANEXO 01 – Cromatograma do extrato Y01-EN1-12



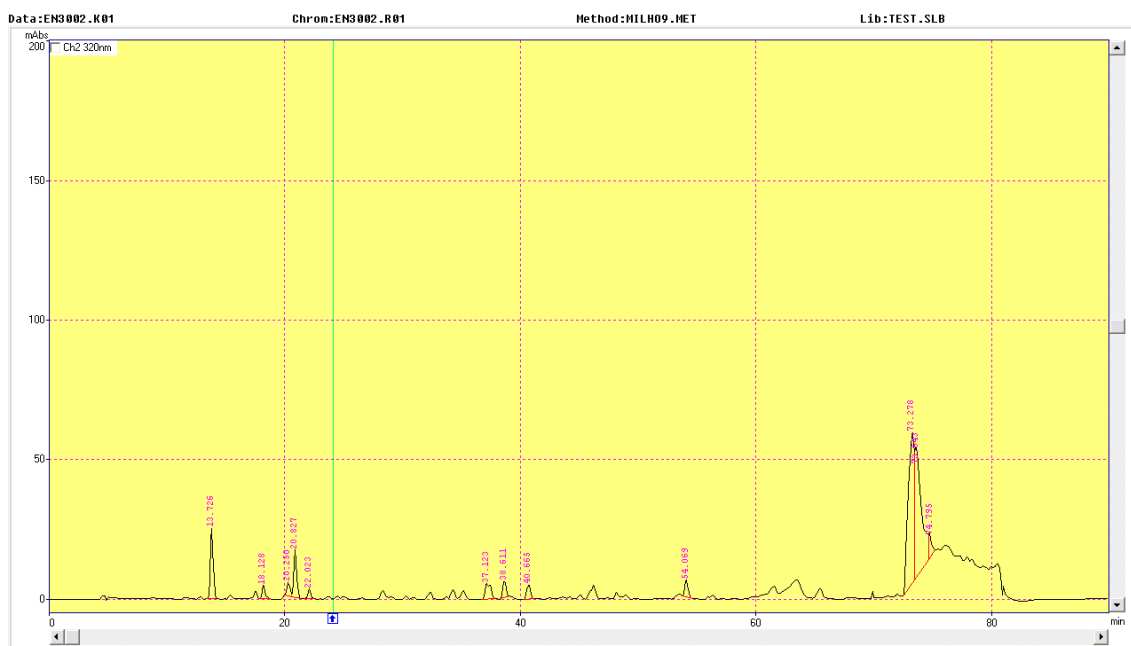
ANEXO 02 – Cromatograma do extrato Y01-SP1-12



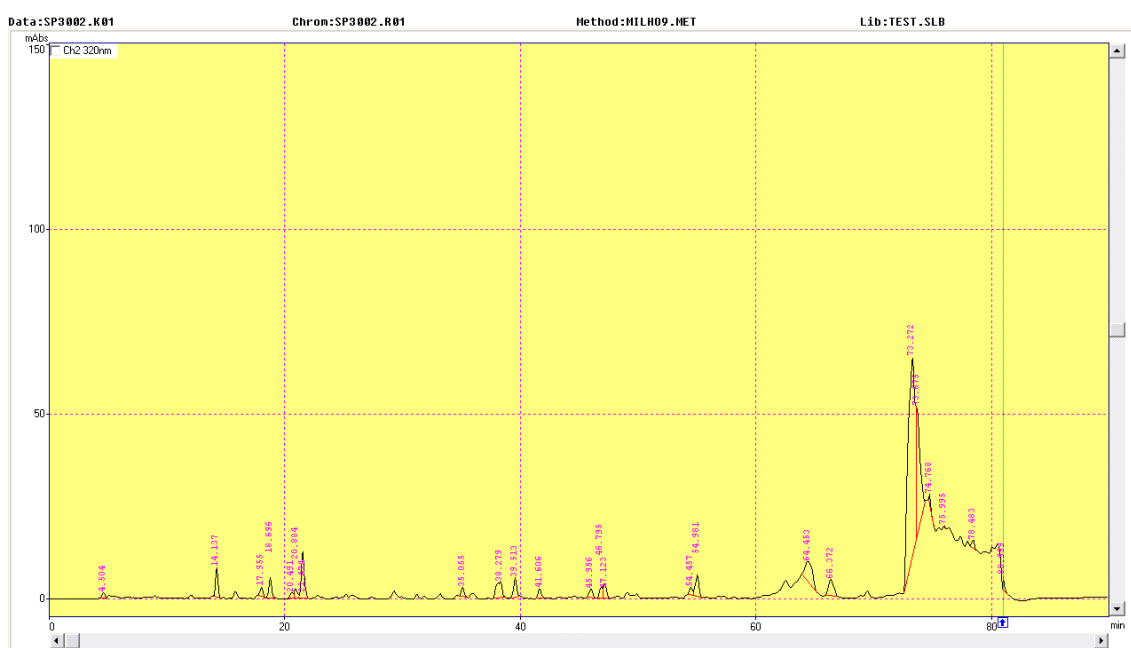
ANEXO 03 – Cromatograma do extrato Y01-EN2-12



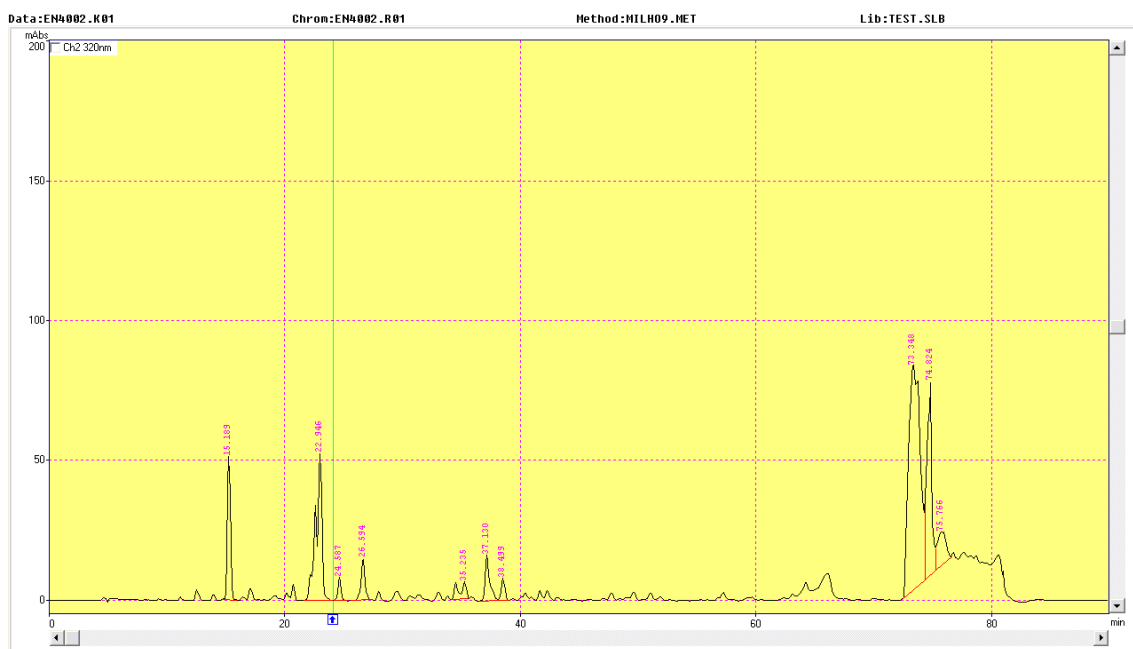
ANEXO 04 – Cromatograma do extrato Y01-SP2-12



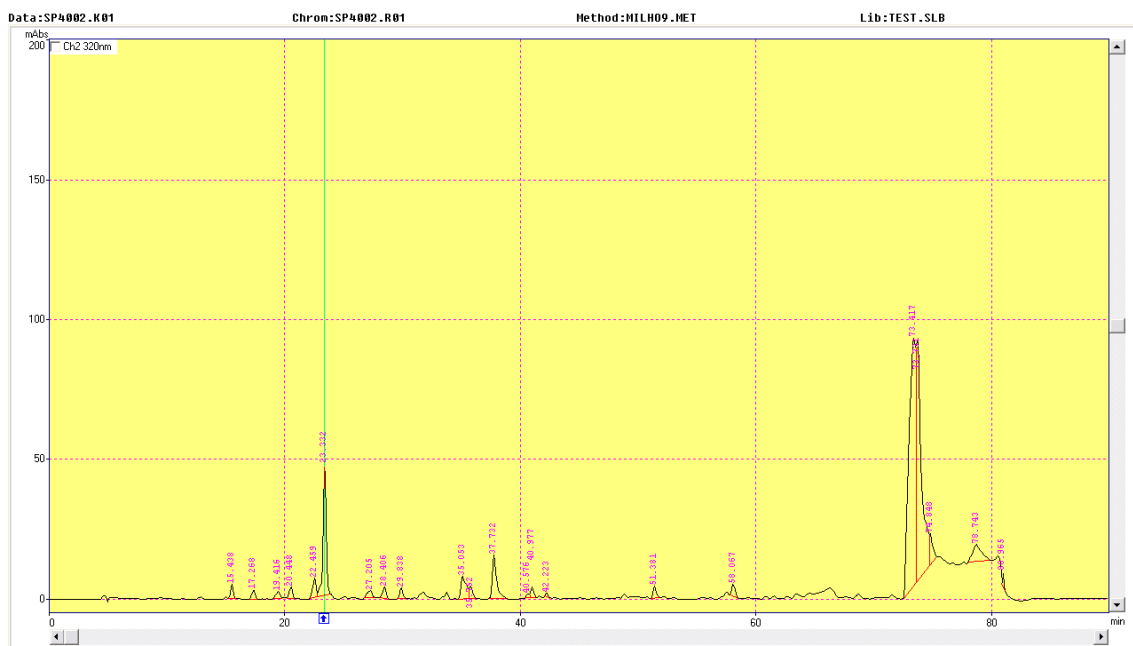
ANEXO 05 – Cromatograma do extrato Y01-EN3-12



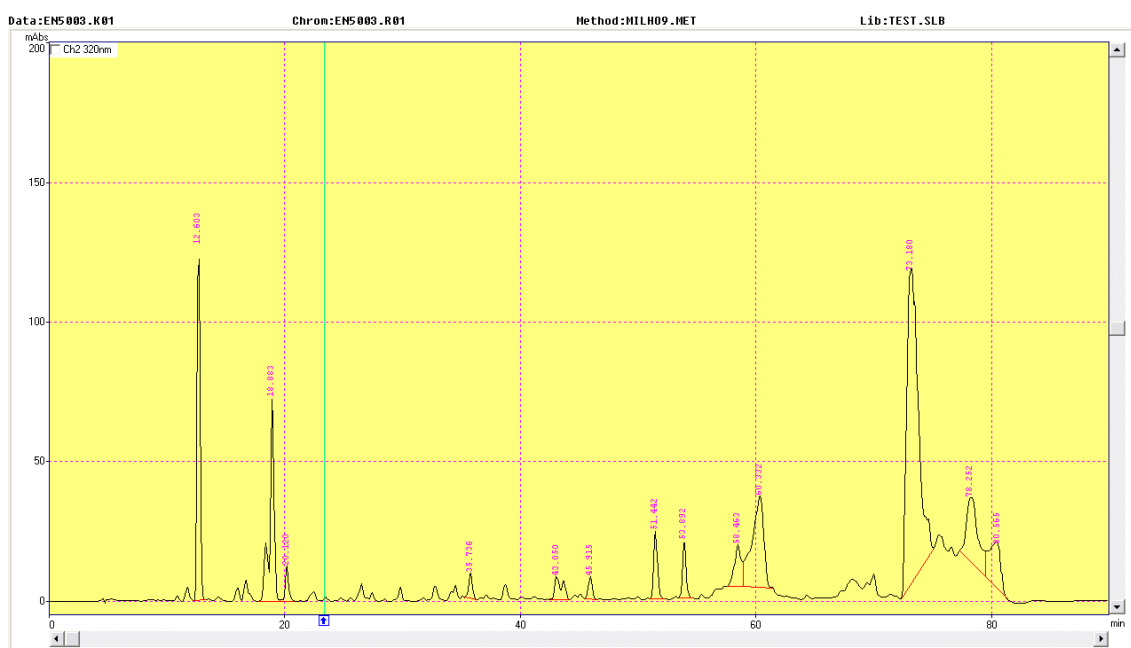
ANEXO 06 – Cromatograma do extrato Y01-SP3-12



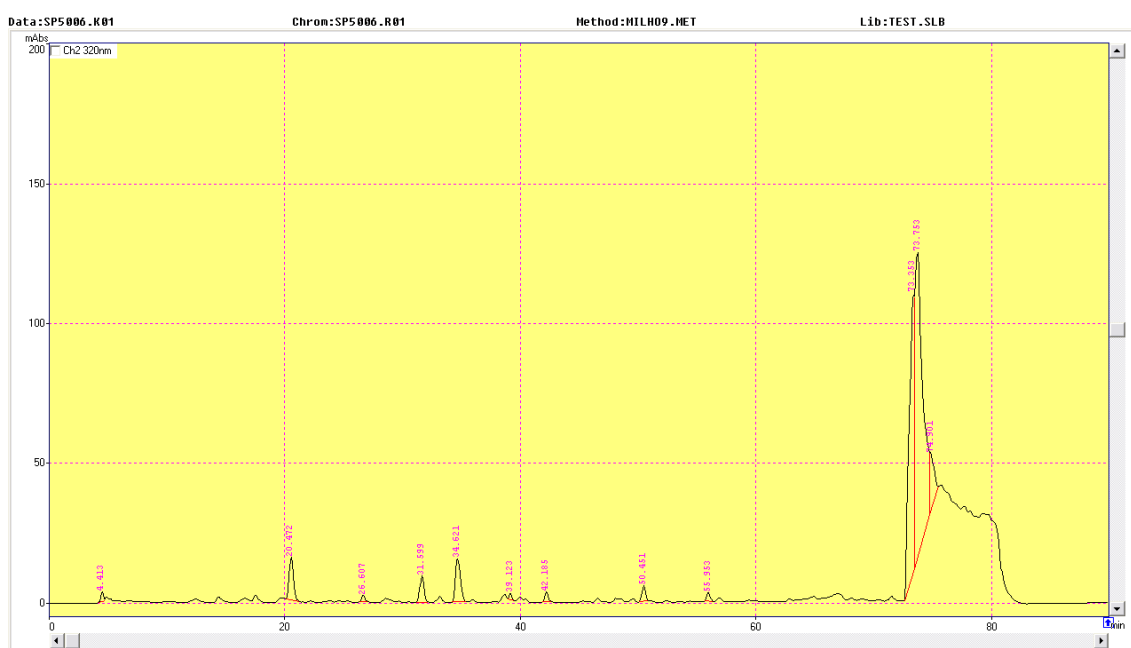
ANEXO 07 – Cromatograma do extrato Y01-EN4-12



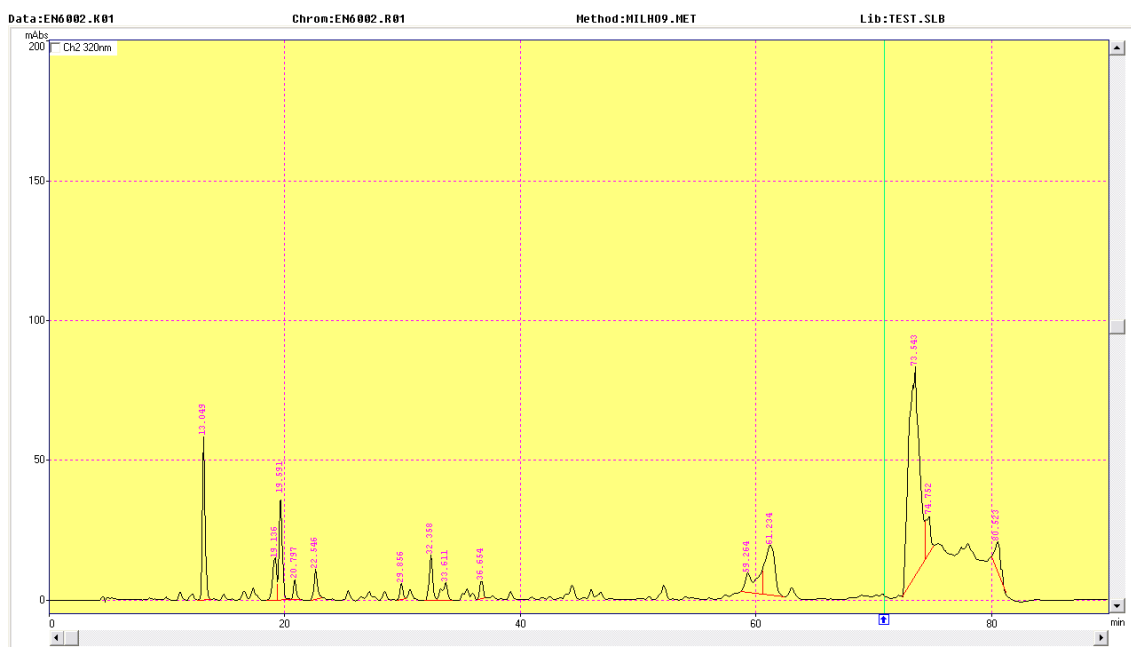
ANEXO 08 – Cromatograma do extrato Y01-SP4-12



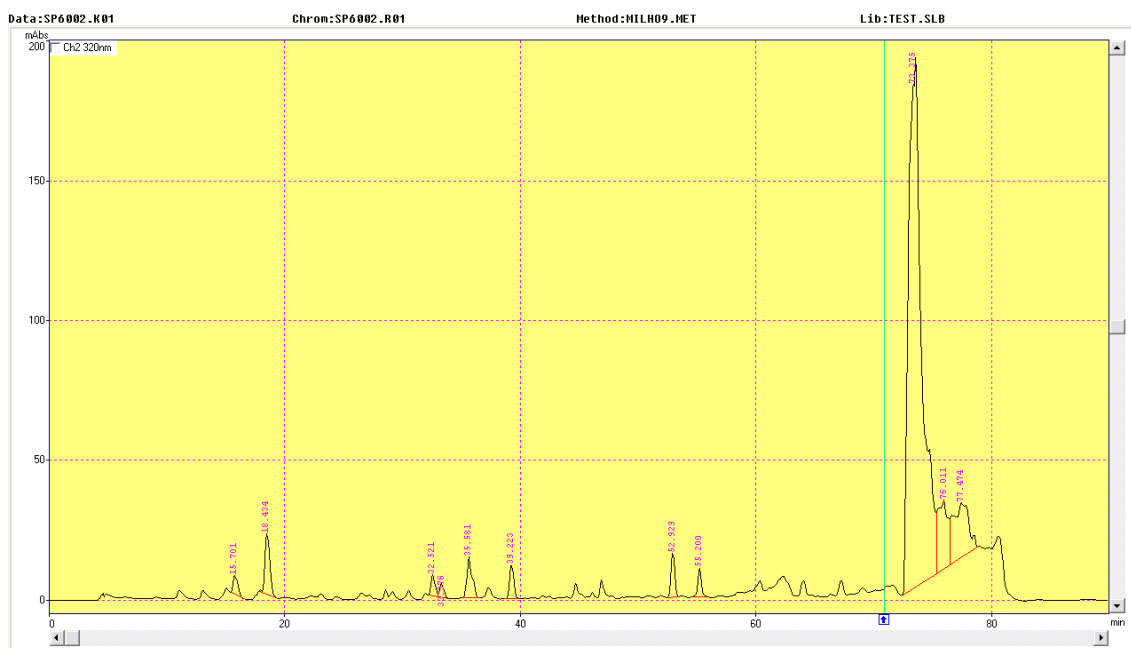
ANEXO 09 – Cromatograma do extrato Y01-EN5-12



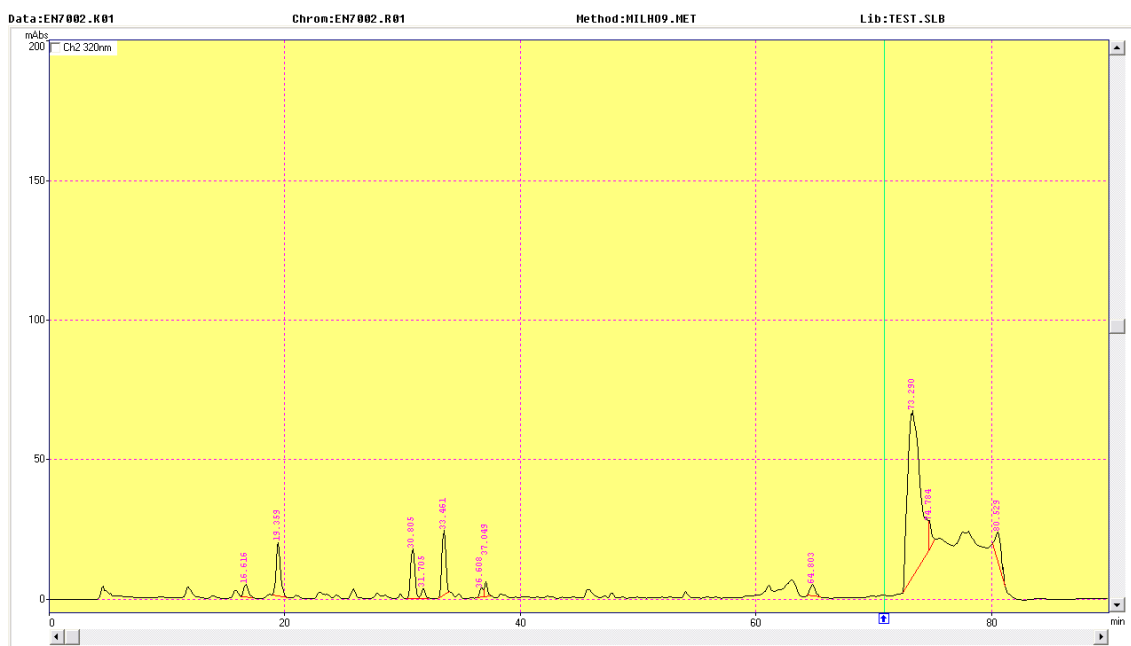
ANEXO 10 – Cromatograma do extrato Y01-SP5-12



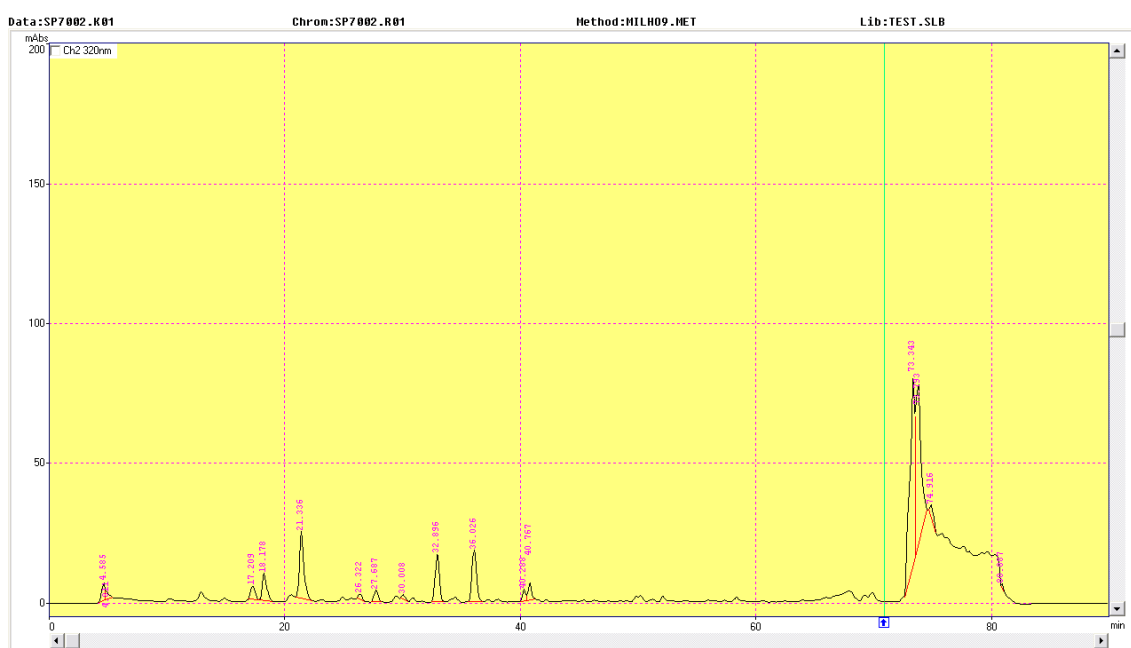
ANEXO 11 – Cromatograma do extrato Y01-EN6-12



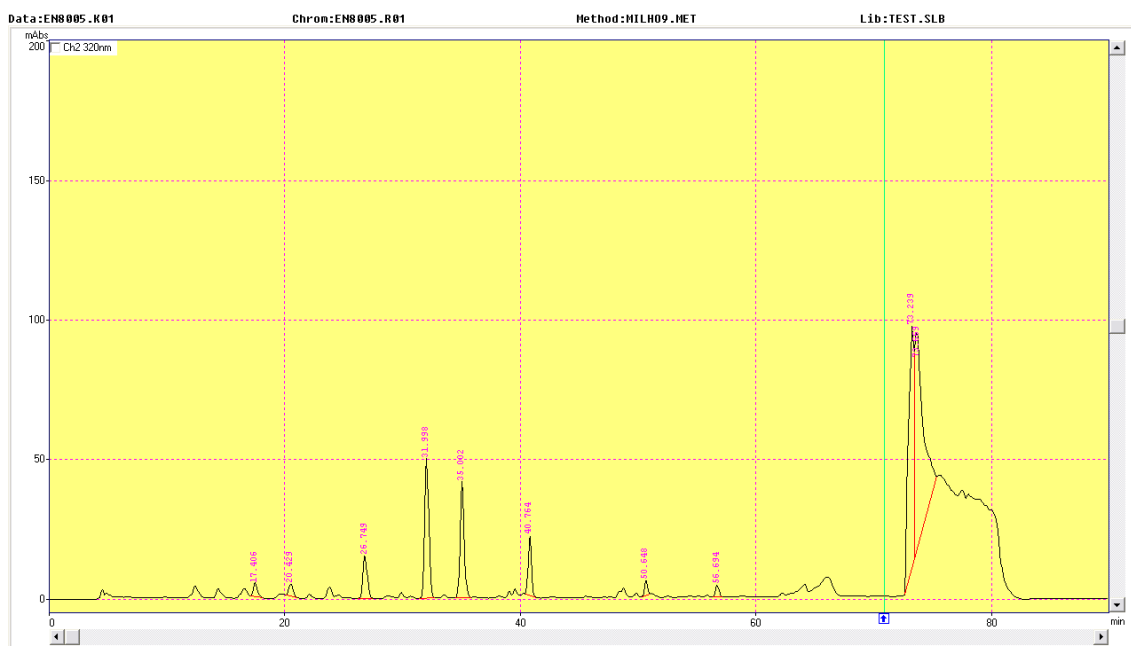
ANEXO 12 – Cromatograma do extrato Y01-SP6-12



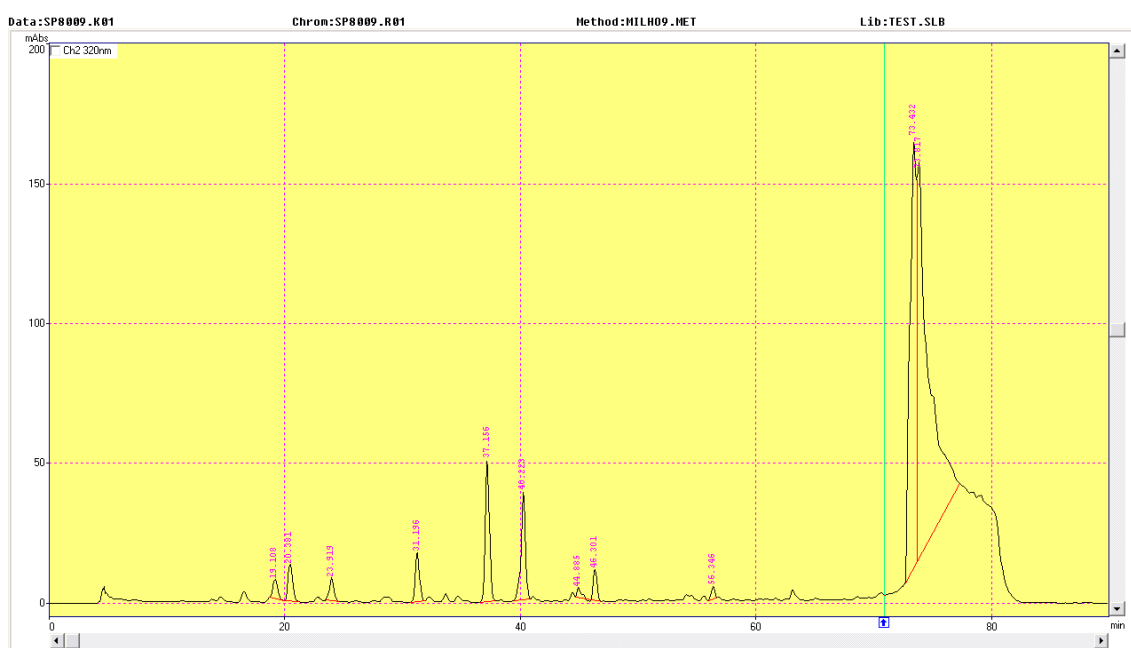
ANEXO 13 – Cromatograma do extrato Y01-EN7-12



ANEXO 14 – Cromatograma do extrato Y01-SP7-12



ANEXO 15 – Cromatograma do extrato Y01-EN8-12



ANEXO 16 – Cromatograma do extrato Y01-SP8-12

Anexo 17

Dados obtidos do ensaio teste para a obtenção da curva de calibração

TRATAMENTO	Replicata	Massa da dieta (mg)	Comprimento (mm)	Largura da cápsula cefálica (mm)
Y01-EN1-12	1	844,87	104,55	0,85
	2	568,78	39,57	0,86
	3	860,34	71,60	0,93
	4	373,97	71,08	1,36
Y01-SP1-12	1	459,35	95,81	1,37
	2	867,36	124,80	1,40
	3	344,19	107,34	2,16
Y01-EN2-12	1	866,46	66,13	0,93
	2	657,07	50,08	0,83
	3	567,31	72,73	0,57
	4	359,37	76,49	1,63
Y01-SP2-12	1	527,29	92,35	1,44
	2	580,75	86,81	1,10
	3	677,15	47,01	0,89
	4	359,75	92,16	1,46
Y01-EN3-12	1	799,42	100,26	1,63
	2	367,66	85,64	1,23
	3	300,58	112,32	1,68
	4	411,45	103,51	1,64
Y01-SP3-12	1	610,73	93,16	0,70
	2	523,23	42,56	0,84
Y01-EN4-12	1	559,86	126,43	1,49
	2	592,69	87,65	1,35
	3	701,84	65,16	0,90
	4	826,28	134,44	1,49
Y01-SP4-12	1	779,57	103,01	1,57
Y01-EN5-12	1	463,83	78,40	1,90
	2	565,00	75,95	1,03
	3	211,57	153,90	1,89
	4	733,88	116,96	1,48

Anexo 18

Dados obtidos para a obtenção da curva de calibração

CULTIVAR	Replicata	Massa da dieta (mg)	Comprimento (mm)	Largura da cápsula cefálica (mm)
Y01-SP5-12	1	723,09	89,65	1,50
	2	627,89	48,10	1,01
	3	569,98	103,09	1,51
	4	560,23	48,73	1,44
Y01-EN6-12	1	420,94	99,83	1,68
	2	642,72	80,78	1,47
	3	542,71	99,40	0,92
	4	525,49	52,56	1,20
Y01-SP6-12	1	694,79	46,00	0,38
Y01-EN7-12	1	592,55	68,56	1,18
	2	722,19	74,34	1,61
	3	604,11	56,38	1,17
	4	649,68	45,16	0,81
Y01-SP7-12	1	674,17	87,46	0,94
	2	693,82	40,30	1,17
Y01-EN8-12	1	562,79	106,93	1,64
	2	536,06	91,86	1,21
	3	607,72	75,44	1,70
	4	601,88	75,08	1,16
Y01-SP8-12	1	612,70	49,00	0,96
	2	785,25	52,20	0,91
Metanol	1	410,79	74,36	1,59
	2	311,89	159,09	1,94
	3	624,67	114,37	1,84
	4	538,69	110,95	1,71
Branco	1	291,53	164,43	2,08
	2	536,08	162,25	2,01
	3	216,15	150,08	2,03
	4	449,30	173,82	2,02

Anexo 19

(continua)

Dados obtidos por teste t entre as concentrações de ácido clorogênico dos cultivares

Cultivar A	Cultivar B	Valor de P	Cultivar A	Cultivar B	Valor de P
Y01-EN1-12	Y01-EN1-12	1,000000	Y01-EN1-12	Y01-EN5-12	0,000004
Y01-EN1-12	Y01-SP1-12	0,000006	Y01-EN1-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-EN1-12	Y01-EN2-12	0,000605	Y01-EN1-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-EN1-12	Y01-SP2-12	0,002372	Y01-EN1-12	Y01-SP6-12	0,000000
Y01-EN1-12	Y01-EN3-12	0,000000	Y01-EN1-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-EN1-12	Y01-SP3-12	0,000000	Y01-EN1-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-EN1-12	Y01-EN4-12	0,001568	Y01-EN1-12	Y01-EN8-12	
Y01-EN1-12	Y01-SP4-12	0,099891	Y01-EN1-12	Y01-SP8-12	0,000000
Y01-SP1-12	Y01-EN1-12	0,000006	Y01-SP1-12	Y01-EN5-12	0,035499
Y01-SP1-12	Y01-SP1-12	1,000000	Y01-SP1-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-SP1-12	Y01-EN2-12	0,000052	Y01-SP1-12	Y01-EN6-12	0,000001
Y01-SP1-12	Y01-SP2-12	0,000186	Y01-SP1-12	Y01-SP6-12	0,000003
Y01-SP1-12	Y01-EN3-12	0,000000	Y01-SP1-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-SP1-12	Y01-SP3-12	0,000000	Y01-SP1-12	Y01-SP7-12	0,000001
Y01-SP1-12	Y01-EN4-12	0,000004	Y01-SP1-12	Y01-EN8-12	
Y01-SP1-12	Y01-SP4-12	0,000001	Y01-SP1-12	Y01-SP8-12	0,000000
Y01-EN2-12	Y01-EN1-12	0,000605	Y01-EN2-12	Y01-EN5-12	0,000057
Y01-EN2-12	Y01-SP1-12	0,000052	Y01-EN2-12	Y01-SP5-12	0,000006
Y01-EN2-12	Y01-EN2-12	1,000000	Y01-EN2-12	Y01-EN6-12	0,000010
Y01-EN2-12	Y01-SP2-12	0,658110	Y01-EN2-12	Y01-SP6-12	0,000010
Y01-EN2-12	Y01-EN3-12	0,000005	Y01-EN2-12	Y01-EN7-12	0,000008
Y01-EN2-12	Y01-SP3-12	0,000005	Y01-EN2-12	Y01-SP7-12	0,000010
Y01-EN2-12	Y01-EN4-12	0,000293	Y01-EN2-12	Y01-EN8-12	
Y01-EN2-12	Y01-SP4-12	0,000466	Y01-EN2-12	Y01-SP8-12	0,000006
Y01-SP2-12	Y01-EN1-12	0,002372	Y01-SP2-12	Y01-EN5-12	0,000208
Y01-SP2-12	Y01-SP1-12	0,000186	Y01-SP2-12	Y01-SP5-12	0,000021
Y01-SP2-12	Y01-EN2-12	0,658110	Y01-SP2-12	Y01-EN6-12	0,000037
Y01-SP2-12	Y01-SP2-12	1,000000	Y01-SP2-12	Y01-SP6-12	0,000033
Y01-SP2-12	Y01-EN3-12	0,000019	Y01-SP2-12	Y01-EN7-12	0,000026
Y01-SP2-12	Y01-SP3-12	0,000017	Y01-SP2-12	Y01-SP7-12	0,000035

Anexo 19

(continua)

Dados obtidos por teste t entre as concentrações de ácido clorogênico dos cultivares

Cultivar A	Cultivar B	Valor de P	Cultivar A	Cultivar B	Valor de P
Y01-SP2-12	Y01-EN4-12	0,001142	Y01-SP2-12	Y01-EN8-12	-
Y01-SP2-12	Y01-SP4-12	0,001874	Y01-SP2-12	Y01-SP8-12	0,000020
Y01-EN3-12	Y01-EN1-12	0,000000	Y01-EN3-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-EN3-12	Y01-SP1-12	0,000000	Y01-EN3-12	Y01-SP5-12	0,000001
Y01-EN3-12	Y01-EN2-12	0,000005	Y01-EN3-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-EN3-12	Y01-SP2-12	0,000019	Y01-EN3-12	Y01-SP6-12	0,000053
Y01-EN3-12	Y01-EN3-12	1,000000	Y01-EN3-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-EN3-12	Y01-SP3-12	0,000174	Y01-EN3-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-EN3-12	Y01-EN4-12	0,000000	Y01-EN3-12	Y01-EN8-12	-
Y01-EN3-12	Y01-SP4-12	0,000000	Y01-EN3-12	Y01-SP8-12	0,000115
Y01-SP3-12	Y01-EN1-12	0,000000	Y01-SP3-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-SP3-12	Y01-SP1-12	0,000000	Y01-SP3-12	Y01-SP5-12	0,000020
Y01-SP3-12	Y01-EN2-12	0,000005	Y01-SP3-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-SP3-12	Y01-SP2-12	0,000017	Y01-SP3-12	Y01-SP6-12	0,000025
Y01-SP3-12	Y01-EN3-12	0,000174	Y01-SP3-12	Y01-EN7-12	0,000001
Y01-SP3-12	Y01-SP3-12	1,000000	Y01-SP3-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-SP3-12	Y01-EN4-12	0,000000	Y01-SP3-12	Y01-EN8-12	-
Y01-SP3-12	Y01-SP4-12	0,000000	Y01-SP3-12	Y01-SP8-12	0,000050
Y01-EN4-12	Y01-EN1-12	0,001568	Y01-EN4-12	Y01-EN5-12	0,000002
Y01-EN4-12	Y01-SP1-12	0,000004	Y01-EN4-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-EN4-12	Y01-EN2-12	0,000293	Y01-EN4-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-EN4-12	Y01-SP2-12	0,001142	Y01-EN4-12	Y01-SP6-12	0,000000
Y01-EN4-12	Y01-EN3-12	0,000000	Y01-EN4-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-EN4-12	Y01-SP3-12	0,000000	Y01-EN4-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-EN4-12	Y01-EN4-12	1,000000	Y01-EN4-12	Y01-EN8-12	-
Y01-EN4-12	Y01-SP4-12	0,000492	Y01-EN4-12	Y01-SP8-12	0,000000
Y01-SP4-12	Y01-EN1-12	0,099891	Y01-SP4-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-SP4-12	Y01-SP1-12	0,000001	Y01-SP4-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-SP4-12	Y01-EN2-12	0,000466	Y01-SP4-12	Y01-EN6-12	0,000000

Anexo 19**(conclusão)**

Dados obtidos por teste t entre as concentrações de ácido clorogênico dos cultivares

Cultivar A	Cultivar B	Valor de P	Cultivar A	Cultivar B	Valor de P
Y01-SP4-12	Y01-SP2-12	0,001874	Y01-SP4-12	Y01-SP6-12	0,000000
Y01-SP4-12	Y01-EN3-12	0,000000	Y01-SP4-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-SP4-12	Y01-SP3-12	0,000000	Y01-SP4-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-SP4-12	Y01-EN4-12	0,000492	Y01-SP4-12	Y01-EN8-12	-
Y01-SP4-12	Y01-SP4-12	1,000000	Y01-SP4-12	Y01-SP8-12	0,000000

Anexo 20**(continua)**

Dados obtidos por teste t entre as concentrações de ácido clorogênico – série restante

Cultivar A	Cultivar B	Valor de P
Y01-EN5-12	Y01-EN5-12	1,000000
Y01-EN5-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-EN5-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-EN5-12	Y01-SP6-12	0,000001
Y01-EN5-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-EN5-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-EN5-12	Y01-EN8-12	-
Y01-EN5-12	Y01-SP8-12	0,000000
Y01-SP5-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-SP5-12	Y01-SP5-12	1,000000
Y01-SP5-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-SP5-12	Y01-SP6-12	0,000138
Y01-SP5-12	Y01-EN7-12	0,000000
Y01-SP5-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-SP5-12	Y01-EN8-12	-
Y01-SP5-12	Y01-SP8-12	0,000958
Y01-EN6-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-EN6-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-EN6-12	Y01-EN6-12	1,000000
Y01-EN6-12	Y01-SP6-12	0,006837

Anexo 20

(continua)

Dados obtidos por teste t entre as concentrações de ácido clorogênico – série restante

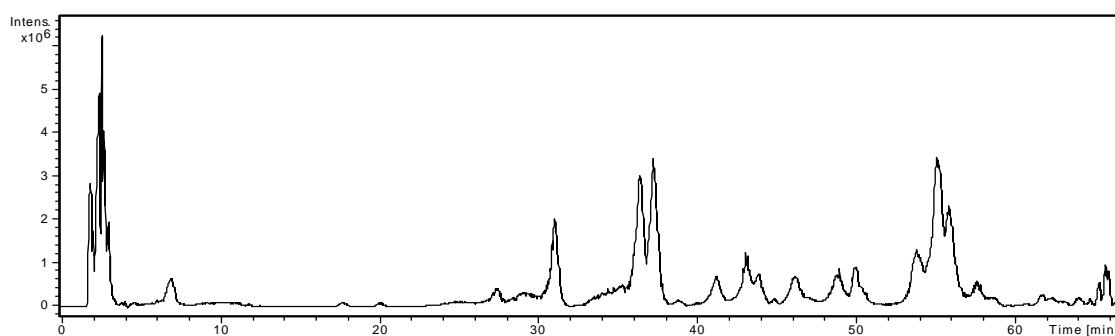
Cultivar A	Cultivar B	Valor de P
Y01-EN6-12	Y01-EN7-12	0,000001
Y01-EN6-12	Y01-SP7-12	0,005127
Y01-EN6-12	Y01-EN8-12	-
Y01-EN6-12	Y01-SP8-12	0,000000
Y01-SP6-12	Y01-EN5-12	0,000001
Y01-SP6-12	Y01-SP5-12	0,000138
Y01-SP6-12	Y01-EN6-12	0,006837
Y01-SP6-12	Y01-SP6-12	1,000000
Y01-SP6-12	Y01-EN7-12	0,004443
Y01-SP6-12	Y01-SP7-12	0,023461
Y01-SP6-12	Y01-EN8-12	-
Y01-SP6-12	Y01-SP8-12	0,000097
Y01-EN7-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-EN7-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-EN7-12	Y01-EN6-12	0,000001
Y01-EN7-12	Y01-SP6-12	0,004443
Y01-EN7-12	Y01-EN7-12	1,000000
Y01-EN7-12	Y01-SP7-12	0,000002
Y01-EN7-12	Y01-EN8-12	-
Y01-EN7-12	Y01-SP8-12	0,000001
Y01-SP7-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-SP7-12	Y01-SP5-12	0,000000
Y01-SP7-12	Y01-EN6-12	0,005127
Y01-SP7-12	Y01-SP6-12	0,023461
Y01-SP7-12	Y01-EN7-12	0,000002
Y01-SP7-12	Y01-SP7-12	1,000000
Y01-SP7-12	Y01-EN8-12	-
Y01-SP7-12	Y01-SP8-12	0,000000
Y01-EN8-12	Y01-EN5-12	-
Y01-EN8-12	Y01-SP5-12	-

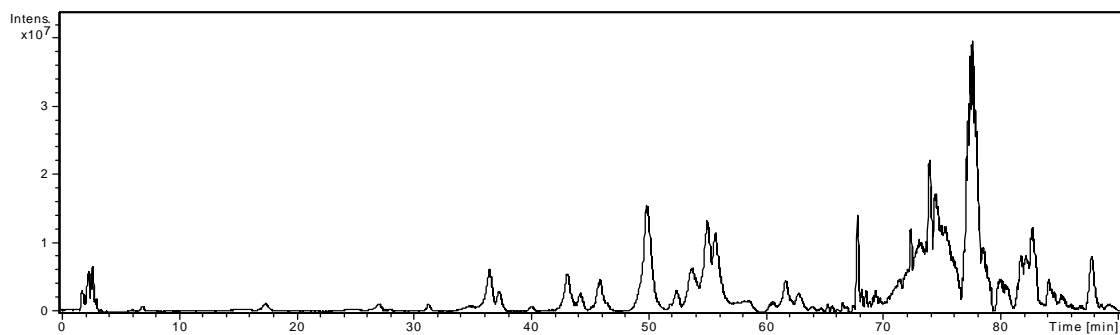
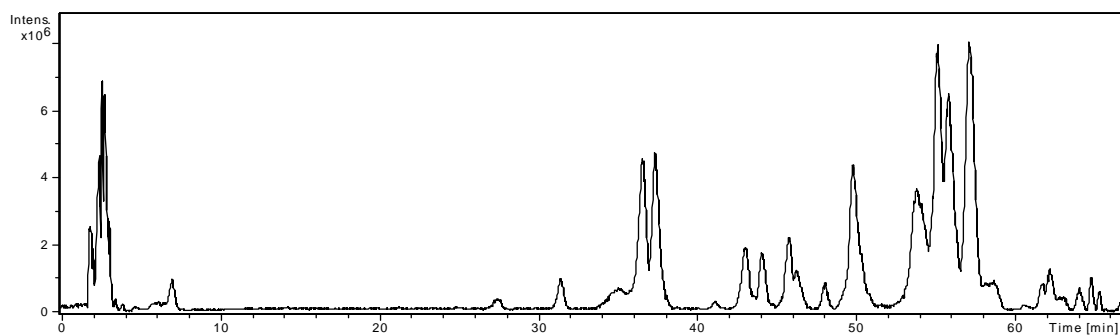
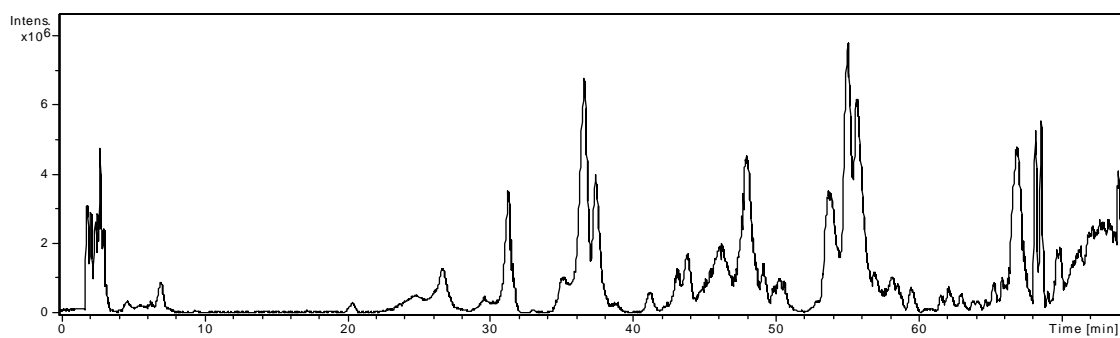
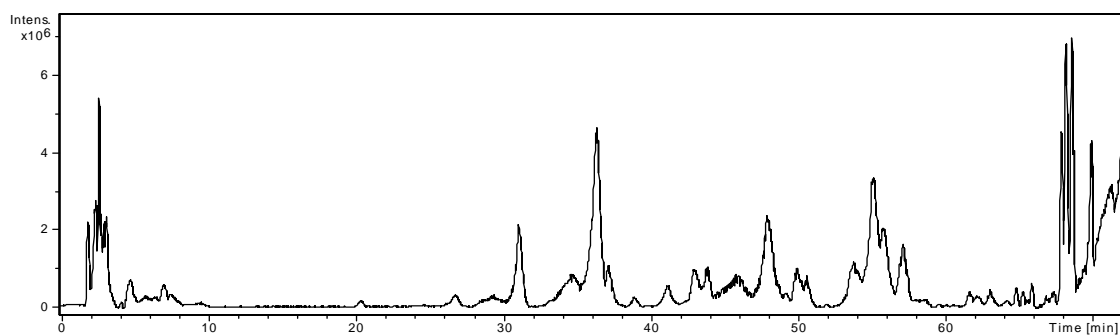
Anexo 20**(conclusão)**

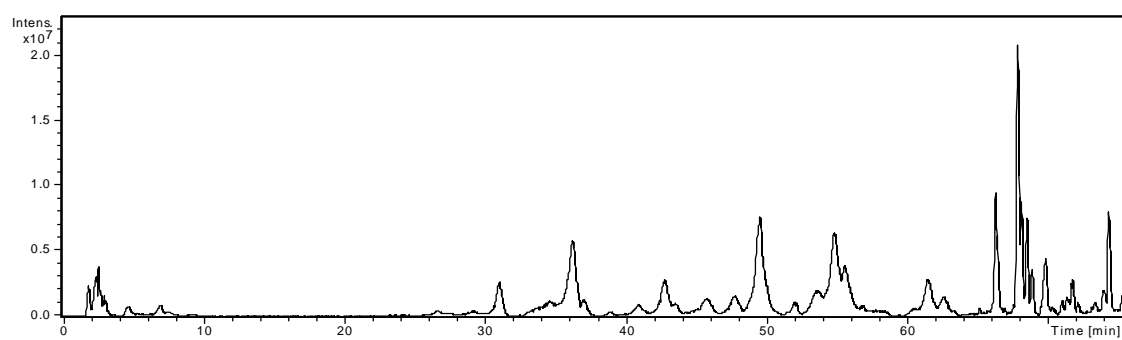
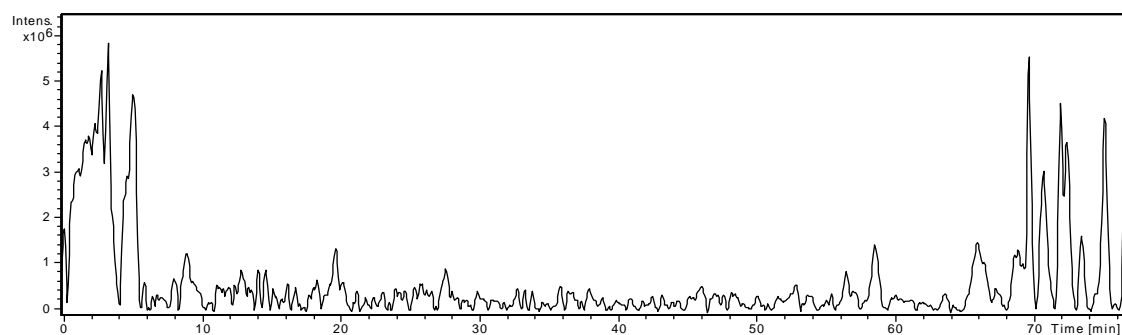
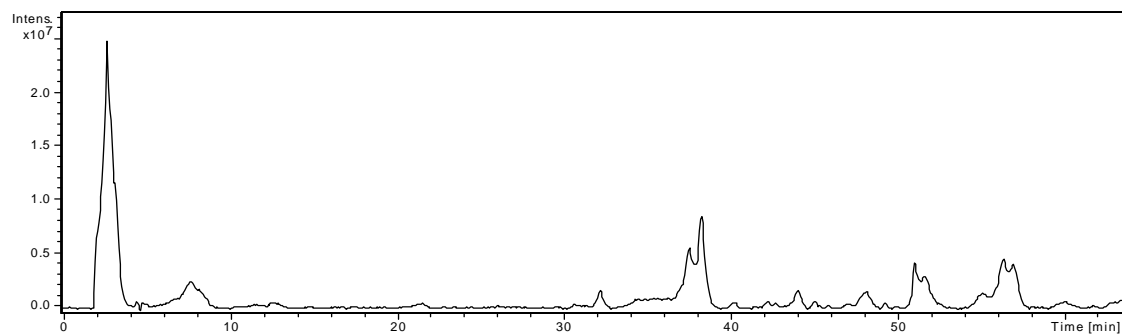
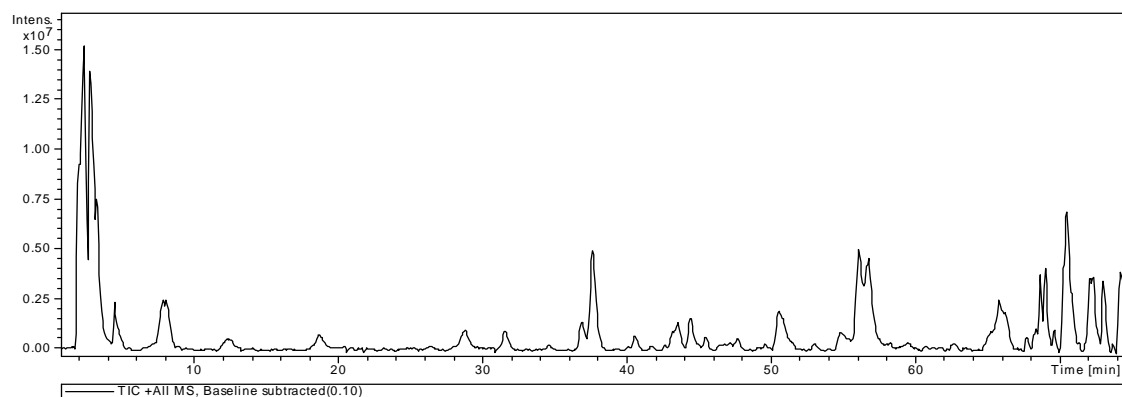
Dados obtidos por teste t entre as concentrações de ácido clorogênico – série restante

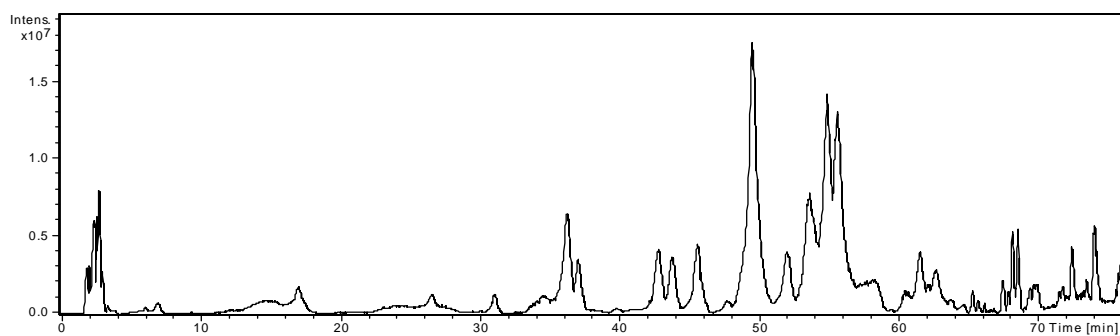
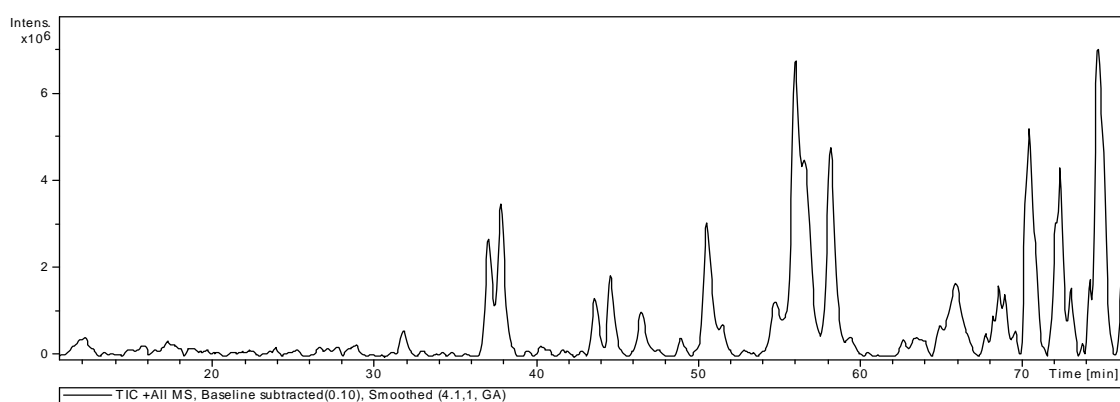
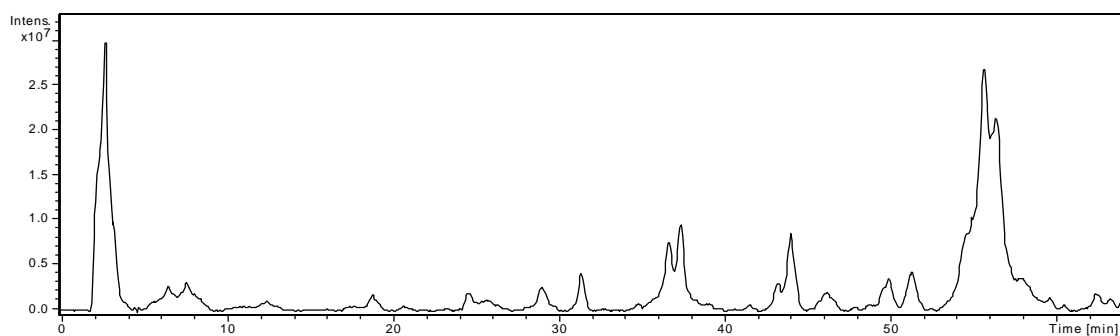
Cultivar A	Cultivar B	Valor de P
Y01-EN8-12	Y01-EN6-12	-
Y01-EN8-12	Y01-SP6-12	-
Y01-EN8-12	Y01-EN7-12	-
Y01-EN8-12	Y01-SP7-12	-
Y01-EN8-12	Y01-EN8-12	
Y01-EN8-12	Y01-SP8-12	
Y01-SP8-12	Y01-EN5-12	0,000000
Y01-SP8-12	Y01-SP5-12	0,000958
Y01-SP8-12	Y01-EN6-12	0,000000
Y01-SP8-12	Y01-SP6-12	0,000097
Y01-SP8-12	Y01-EN7-12	0,000001
Y01-SP8-12	Y01-SP7-12	0,000000
Y01-SP8-12	Y01-EN8-12	
Y01-SP8-12	Y01-SP8-12	1,000000

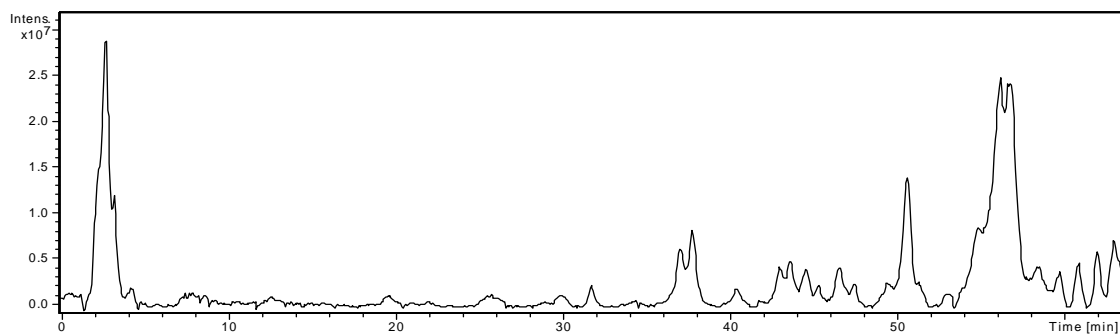
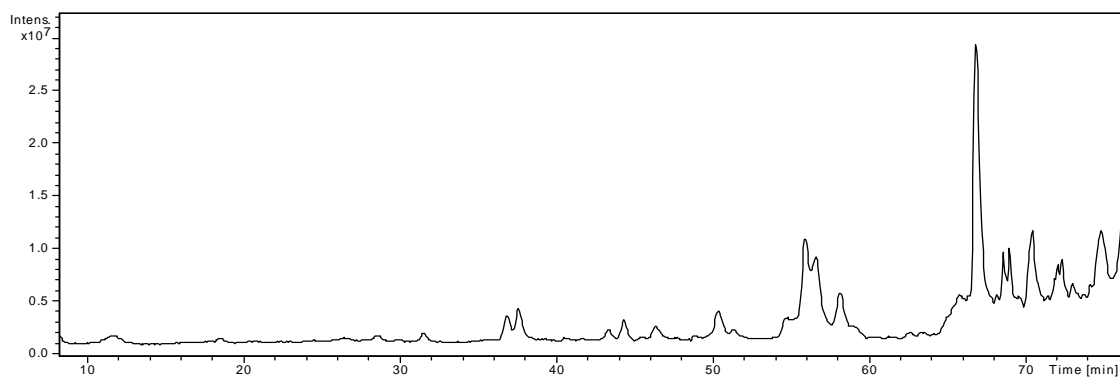
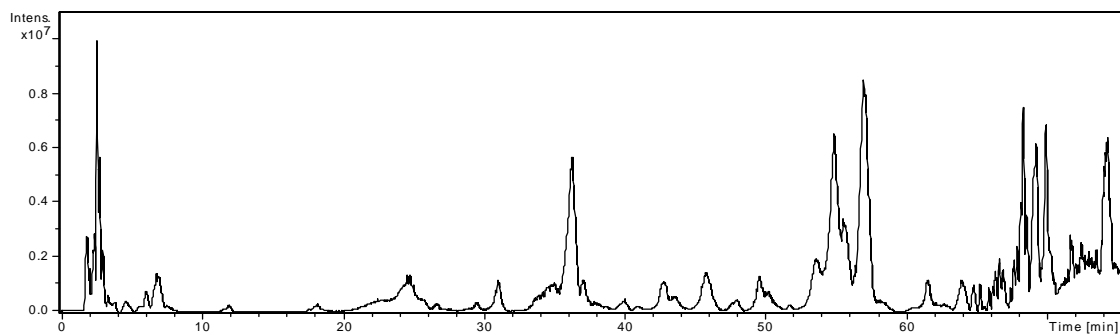
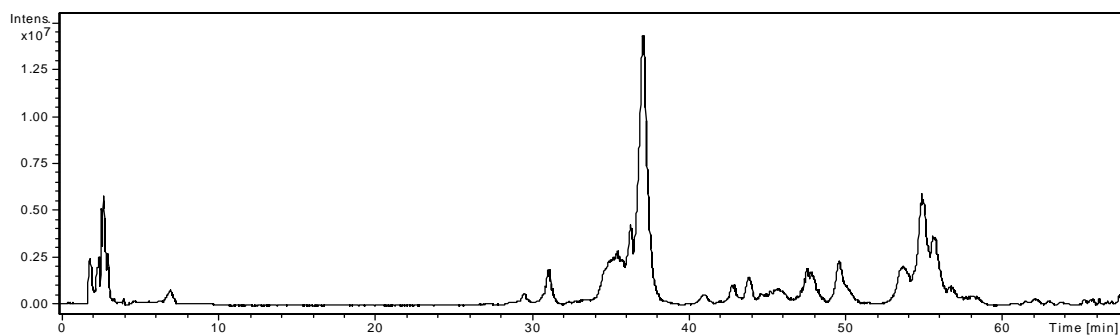
A série seguinte de anexos refere-se aos ionogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas.

**Anexo 21 - Y01-EN1-12**

**Anexo 22 - Y01-SP1-12****Anexo 23 - Y01-EN2-12****Anexo 24 - Y01-SP2-12****Anexo 25 - Y01-EN3-12**

**Anexo 26 - Y01-SP3-12****Anexo 27 - Y01-EN4-12****Anexo 28 - Y01-SP4-12**

Anexo 28 - Y01-EN5-12**Anexo 29 - Y01-SP5-12****Anexo 30 - Y01-EN6-12****Anexo 31 - Y01-SP6-12**

**Anexo 32 - Y01-EN7-12****Anexo 33 - Y01-SP7-12****Anexo 34 - Y01-EN8-12****Anexo 35 - Y01-SP8-12**