



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA EMIKO UEDA

**COMPOSTOS QUÍMICOS SEQUESTRADOS DURANTE A
ALIMENTAÇÃO DE LEPIDOPTEROS COMO INDICADORES DA
MOVIMENTAÇÃO DE ADULTOS EM SISTEMAS AGRÍCOLAS**

Londrina
2019

TATIANA EMIKO UEDA

**COMPOSTOS QUIMICOS SEQUESTRADOS DURANTE A
ALIMENTAÇÃO DE LEPIDOPTEROS COMO INDICADORES DA
MOVIMENTAÇÃO DE ADULTOS EM SISTEMAS AGRÍCOLAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura

Co-orientadora: Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Londrina

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

U22c Ueda, Tatiana Emiko.
Compostos químicos sequestrados durante a alimentação de lepidopteros como indicadores da movimentação de adultos em sistemas agrícolas / Tatiana Emiko Ueda. - Londrina, 2019.
90 f. : il.

Orientador: Maurício Ursi Ventura.
Coorientador: Clara Beatriz Hoffmann-Campo.
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Assimilação - Tese. 2. Compostos de defesa - Tese. 3. Adaptação da planta hospedeira - Tese. 4. Lagartas polífagas - Tese. I. Ventura, Maurício Ursi . II. Hoffmann-Campo, Clara Beatriz . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

TATIANA EMIKO UEDA

**COMPOSTOS QUIMICOS SEQUESTRADOS DURANTE A
ALIMENTAÇÃO DE LEPIDOPTEROS COMO INDICADORES DA
MOVIMENTAÇÃO DE ADULTOS EM SISTEMAS AGRÍCOLAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Co-orientadora: Dr^a. Clara Beatriz Hoffmann-Campo
Embrapa Soja

Dr. Samuel Roggia
Embrapa Soja

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leonel Vinicius Constantino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de março de 2019.

*Dedico este trabalho à minha avó
Cecília e aos meus pais Rose e Hélio
por todo amor e carinho.*

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura por toda orientação e amizade nesses anos de convívio desde o mestrado.

À minha co-orientadora Dra. Clara Beatriz Hoffmann-Campo por ter confiado em mim desde a iniciação científica, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por toda orientação dada durante esse período.

À Embrapa Soja por toda estrutura necessária para a condução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de crescimento pessoal, profissional e realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao professor Dr. Eduardo Jorge Pilau que possibilitou as análises deste trabalho.

Ao Dr. Eliseu Binneck por toda ajuda prestada para as análises estatísticas realizadas neste trabalho.

Ao Evandro Silva pela ajuda nas análises de espectrometria de massas e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Química da Embrapa Soja: Rejane Stubs, Lisa Exposito, Gustavo Cotrim, Tamires Scupinari, Deivid Metzel, Camila, pela amizade e auxílio em diversas atividades.

Ao meu querido amigo José Perez por todos esses anos de amizade e companheirismo.

Ao Italo Blanco por estar sempre presente me incentivando e me ajudando seja em momentos de bonança ou não.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

UEDA, Tatiana Emiko. **Compostos químicos sequestrados durante a alimentação de lepidopteros como indicadores da movimentação de adultos em sistemas agrícolas**. 2019. 96. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A possibilidade de identificar nos insetos adultos as plantas hospedeiras utilizadas na sua fase larval torna-se importante para monitoramento na sucessão de culturas, principalmente para as tecnologias pacíveis de gerar uma pressão de seleção, como no caso de cultivares Bt. Durante a alimentação na fase larval, os insetos podem sequestrar metabólitos secundários presentes nas plantas hospedeiras que permanecem em seus órgãos e tecidos até a fase adulta. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a metodologia de extração de compostos químicos exclusivo de plantas de importância agrícola como a soja, milho e algodão e verificar o sequestro destes por *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). Para a realização deste trabalho foram utilizadas a cultivar de soja BRS 284, o híbrido de milho Ag 9010 e a cultivar de algodão FMT 701. Para verificar o solvente extrator mais adequado, folhas das três culturas e adultos de *S. frugiperda* foram submetidos a extração com os solventes MeOH:H₂O, MeOH:ACN:H₂O e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O. Os extratos obtidos foram analisados em UHPLC/MS-MS. Devido à grande quantidade de informações obtidas, foi utilizada a análise de componentes principais para auxiliar na detecção dos íons mais discriminatórios para cada cultura através dos *loadings* apresentados para cada variável. O Diagrama de Venn, foi utilizado para selecionar os íons exclusivos para cada cultura avaliada. A união dessas duas ferramentas estatísticas possibilitou a detecção dos íons específicos de cada cultura. Os solventes MeOH:H₂O e MeOH:ACN:H₂O foram os mais apropriados para a separação dos extratos de folhas de soja, milho e algodão. Enquanto o solvente MeOH:ACN:H₂O foi o mais apropriado para os extratos de adultos de *S. frugiperda* alimentados em folhas de soja, milho e algodão. Embora não tenha sido realizada a identificação dos metabólitos secundários das amostras, é possível sugerir que MeOH:ACN:H₂O é o solvente mais adequado para separar os íons presentes nos extratos de mariposa como marcadores de alimentação prévia em soja, milho e algodão.

Palavras-chave: Assimilação. Compostos de defesa. Adaptação da planta hospedeira. Lagartas polífagas. Marcador biomolecular.

UEDA, Tatiana Emiko. **Chemical compounds sequestered during lepidopteran feeding as indicators of adult movement in agricultural systems**. 2019. 96. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The possibility of identifying in host insects the host plants used by the insect in the larval stage becomes important for monitoring in the succession of crops, especially for the technologies of generating a selection pressure, as in the case of Bt cultivars. During larval feeding, insects may sequester secondary defense metabolites present in host plants that remain in their organs and tissues through adulthood. Thus, the objective of this work was to identify exclusive chemical(s) compound(s) of important plants in the productive system as soybean, corn and cotton and to verify the assimilation of these by *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). For this work, soybean cultivar BRS 284, maize hybrid Ag 9010 and cotton cultivar FMT 701 were used. To verify the most suitable solvent extractor for the three cultures, the leaves were extracted with the solvents MeOH:H₂O, MeOH:ACN:H₂O and MeOH:CH₂Cl₂:H₂O. These solvents were also used for extraction of moth fed on soybean, corn and cotton leaves. All extracts samples of both plant tissue (leaves) and insect (adult body) were analyzed in UHPLC/MS-MS. Due to the large amount of information obtained, the principal component analysis assisted in the detection of the most discriminating ions for each culture through the loadings presented for each variable. The Venn Diagram selected the unique ions for each culture evaluated. The union of these two statistical tools provided the detection of the unique and specific ions for the soybean, maize and cotton culture, more relevant for the separation of these groups. In relation to the solvents measured, MeOH:H₂O and MeOH:ACN:H₂O indicated to be the most appropriate mixture for the separation of leaf extracts from soybean, corn and cotton crops. While the MeOH:ACN:H₂O mixture more suitably separated the *S. frugiperda* moth extracts fed on soybean, maize and cotton leaves. Although it has not been possible to identify the secondary metabolites of the samples, it is possible to suggest that MeOH:ACN:H₂O is the most suitable solvent to separate the ions present in the moth extracts as prior food markers in soybean, corn and cotton.

Key words: Assimilation. Defense compounds. Bt plants. Polyphagous caterpillar. Biomolecular marker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estruturas químicas dos flavonoides (1) daidzeína, (2) gliciteína e (3) genisteína | 22 |
| Figura 2 – Estruturas químicas dos ácidos hidroxâmicos DIMBOA, DIBOA, MBOA e BOA | 23 |
| Figura 3 – Estrutura química do gossipol | 24 |
| Figura 4 – Estrutura química do flavonol rutina | 30 |
| Figura 5 – Equipamento Liotop L101 utilizado para liofilizar o corpo do inseto | 39 |
| Figura 6 – Equipamento UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II utilizado para identificação de metabólitos..... | 42 |
| Figura 7 – Cromatogramas obtidos por cromatografia das amostras de folha de A-soja, B- milho e C- algodão extraídas com os solventes MeOH:H ₂ O (azul), MeOH:ACN:H ₂ O (verde) e MeOH:CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (vermelho)..... | 44 |
| Figura 8 – Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais (Varimax) mostrando a variabilidade entre os solventes MeOH:H ₂ O (S1), MeOH:ACN:H ₂ O (S2) e MeOH:CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (S3) na extração de íons da cultura da soja, milho e algodão | 46 |
| Figura 9 – Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais (Varimax) mostrando a variabilidade entre os íons da cultura da soja, milho e algodão extraída em diferentes solventes extratores MeOH:H ₂ O (S1), MeOH:ACN:H ₂ O (S2) e MeOH:CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (S3)..... | 47 |
| Figura 10 – Gráfico dos <i>loadings</i> dos cromatogramas obtidos por LC-MS da CP1 conforme seu tempo de retenção (minuto)..... | 48 |
| Figura 11 – Gráfico dos <i>loadings</i> dos cromatogramas obtidos por LC-MS da CP2 conforme seu tempo de retenção (minuto)..... | 48 |
| Figura 12 – Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica dos dados de extratos de folhas de soja (S), milho (M) e algodão (A); solventes MeOH:H ₂ O (S1), MeOH:ACN:H ₂ O (S2) e MeOH: CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (S3) e repetições das amostras (R) ... | 52 |
| Figura 13 – Diagrama de Venn representando o total de íons detectados nos extratos foliares da cultura da soja, milho e algodão. Os íons estão separados por cultura e solvente extrator, com os íons em comuns representados nas intersecções | 54 |
| Figura 14 – Cromatogramas obtidos após injeção de extratos do corpo de adultos de | |

Spodoptera frugiperda, cujas lagartas foram alimentadas com folhas de soja (A), milho (B) e algodão (C). As extracções dos metabólitos do corpo dos adultos de *S. frugiperda* foram realizadas com os solventes MeOH:H₂O (azul), MeOH:ACN:H₂O (verde) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (vermelho).....57

Figura 15 – Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais (Varimax) mostrando a variabilidade entre os solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3) na extração de íons dos extratos de *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão.....59

Figura 16 – Escores da CP2 x CP3 da Análise de Componentes Principais (Varimax) mostrando a variabilidade entre os íons dos extratos de *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão extraídos em diferentes solventes extratores MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3)60

Figura 17 – Gráfico dos *loadings* da CP1 conforme seu tempo de retenção (minutos)61

Figura 18 – Gráfico dos *loadings* da CP2 conforme seu tempo de retenção (minutos)62

Figura 19 – Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica dos dados para os extratos de mariposa da espécie *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja (S), milho (M) e algodão (A) e seus respectivos solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3) e repetições das amostras (R)65

Figura 20 – Diagrama de Venn representando o total de íons detectados nos extratos de mariposas da espécie *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão. Os íons estão separados por cultura e solvente extrator, com os íons em comuns representados nas intersecções66

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Sistema de solventes utilizado para extração de mariposas da espécie <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas nas culturas da soja, milho e algodão e seus extratos foliares | 39 |
| Tabela 2 – Gradiente de eluição utilizado na separação dos extratos de folhas de soja, milho e algodão; extratos de adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentados nas culturas..... | 40 |
| Tabela 3 – Componentes principais (CPs), autovalores (λ_i) e porcentagem da variância explicada, autovalor acumulado e proporção acumulada (%) pelas componentes..... | 45 |
| Tabela 4 – Contribuição dos escores através da combinação dos tratamentos cultura x solvente analisados nas CP's..... | 50 |
| Tabela 5 – Componentes principais (CPs), autovalores (λ_i) e porcentagem da variância explicada, autovalor acumulado e proporção acumulada (%) pelas componentes..... | 58 |
| Tabela 6 – Contribuição dos escores através da combinação dos tratamentos cultura x solvente analisados nas CP's..... | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------------|--|
| ACN | Acetonitrila |
| ACP | Análise de Componentes Principais |
| AH | Análise hierárquica |
| Bt | <i>Bacillus thuringiensis</i> |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CP | Componente Principal |
| H ₂ O | Água |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| LC | Liquid Chromatography |
| MeOH | Metanol |
| m/z | Razão massa/carga |
| MRI | Manejo da Resistência de Insetos |
| MS | Mass Spectrometry |
| MS/MS | Mass Spectrometry/Mass Spectrometry |
| UHPLC | Ultra High Performance Liquid Chromatography |

SUMÁRIO

| | | |
|--|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 09 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 | PLANTAS BT | 11 |
| 2.2 | SOJA | 14 |
| 2.3 | MILHO | 16 |
| 2.4 | ALGODÃO..... | 18 |
| 2.5 | METABÓLITOS SECUNDÁRIOS..... | 20 |
| 2.6 | LAGARTAS DESFOLHADORAS..... | 24 |
| 2.6.1 | SPODOPTERA FRUGIPERDA..... | 25 |
| 2.7 | ASSIMILAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR LEPIDÓPTEROS | 28 |
| 2.8 | METABOLÔMICA..... | 30 |
| 2.9 | ANÁLISE MULTIVARIADA | 32 |
| 2.9.1 | ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS | 33 |
| 2.9.2 | ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS POR MÉTODOS HIERÁRQUICOS | 34 |
| ARTIGO 1 – EFEITO DO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS DAS CULTURAS DA SOJA, MILHO E ALGODÃO E DE <i>Spodoptera frugiperda</i> ALIMENTADAS NESSAS CULTURAS | | 35 |
| INTRODUÇÃO | | 35 |
| MATERIAL E MÉTODOS | | 36 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | | 43 |
| CONCLUSÕES | | 68 |
| REFERÊNCIAS | | 69 |

1 INTRODUÇÃO

Os cultivos agrícolas estão expostos ao ataque de diversos artrópodes e patógenos durante todo o seu ciclo. Dentre eles, os insetos-praga representam um importante fator de redução da produtividade e qualidade da produção agrícola e demandam gastos representativos para o seu manejo.

Com a sucessão de monoculturas (principalmente soja, milho e algodão), as áreas de cultivo agrícola oferecem uma contínua oferta de alimento que favorece as populações de artrópodes, principalmente, a dos herbívoros polívoros. Isso tem causado sérios problemas ao sistema produtivo, devido à migração de pragas entre culturas próximas, observando-se anualmente, um aumento das suas infestações (BUSOLI et al., 2011). Dentre as principais técnicas de manejo de insetos-praga, a utilização de plantas geneticamente modificadas tem se mostrado uma ferramenta eficaz no controle de pragas agrícolas (BERNARDI et al., 2011).

Atualmente, diversas culturas transgênicas possuem genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner que codificam a expressão de proteínas Cry, Cyt e Vip, tóxicas para insetos (ESTRUCH et al., 1997). Essas são denominadas plantas Bt, e à medida que sua área cultivada cresce no mundo, aumenta a preocupação em relação ao desenvolvimento de pragas resistentes às proteínas Bt (JAMES, 2010). Isso porque, as plantas Bt, expõem as pragas à proteína inseticida de forma contínua ao longo do ciclo, exercendo elevada pressão de seleção sobre as populações de insetos (BERNARDI et al., 2011), o que é agravado pelo cultivo contínuo de plantas Bt.

Um dos principais objetivos do manejo da resistência é evitar o desenvolvimento de populações de insetos resistentes às proteínas Bt produzidas pelas plantas e evitar que essa resistência se espalhe para outras populações. Isso porque, o desenvolvimento de populações de pragas resistentes às plantas Bt pode comprometer a eficiência dessa tecnologia no controle das pragas-alvo (HEAD et al., 2010). O uso da área de refúgio é uma das estratégias de manejo da resistência (TABASHNIK, 2008). O refúgio consiste em manter parte da área cultivada com plantas não-Bt, a fim de permitir o desenvolvimento de insetos suscetíveis em quantidade suficiente para acasalarem com os possíveis indivíduos resistentes que possam surgir das áreas cultivadas com plantas Bt (BERNARDI et al., 2011). A eficiência dessa tática depende da resistência ser uma característica de herança

recessiva, de ocorrer dispersão pré-acasalamento e acasalamento aleatório.

Os cultivos Bt compartilham algumas espécies de pragas-alvo, e esses, podem compartilhar uma mesma toxina Bt. Como os lepidópteros são capazes de migrar grandes distâncias, os princípios da área de refúgio para o manejo de resistência devem ser aplicados para uma área ampla, muito além dos limites de cada propriedade agrícola. Com isso, o conhecimento da movimentação das pragas agrícolas torna-se importante para monitoramento em áreas de sucessão de culturas, principalmente para as tecnologias que possam gerar pressão de seleção, como no caso das cultivares Bt.

As plantas possuem substâncias químicas utilizadas na sua defesa, e muitos desses, denominados metabólitos secundários, que em geral, têm a sua ocorrência restrita a uma determinada família botânica ou até mesmo a um gênero ou espécie vegetal (ORTH; HEAD; MIERKOWSKI, 2007). Todavia, devido ao efeito deletério desses metabólitos, os insetos herbívoros desenvolveram mecanismos ou estratégias co-evolutivas para desintoxicar e, em alguns casos, sequestrar algumas substâncias, através da absorção seletiva, transporte, modificação e armazenamento para utilização desses metabólitos secundários para a sua própria defesa contra inimigos naturais (HECKEL, 2014).

A habilidade de lepidópteros sequestrar substâncias químicas responsáveis pela defesa das plantas é conhecido desde o século XIX. O exemplo clássico da utilização dessa proteção química é a borboleta monarca, *Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Danaidae), cuja larva sequestra cardenólídeos de sua planta hospedeira (*Asclepias syriaca*) e as mantém em sua ontogênese, tornando-as impalatáveis para pássaros (citado por PETSCHENKA; AGRAWAL, 2015). Com isso, a determinação de compostos químicos específicos de cada espécie de plantas é uma ferramenta para se verificar a presença de quantidades detectáveis de substâncias em mariposas adultas para determinar a planta hospedeira de insetos polívoros em sua fase larval (ORTH; HEAD; MIERKOWSKI, 2007). O objetivo deste trabalho foi 1) realizar testes com diferentes solventes extratores, como análise exploratória para determinar o melhor solvente para a identificação dos principais compostos químicos da soja, milho e algodão; 2) identificá-los nos extratos do corpo dos adultos de *S. frugiperda* para determinar, a planta hospedeira consumida durante a fase larval. Esse estudo prévio fornecerá posteriormente, indicativos das plantas consumidas pelos insetos coletados em

campo, conseqüentemente, possibilitando o monitoramento do cenário agrícola para a prevenção da resistência dos insetos-alvo à tecnologia Bt.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS BT

A disponibilidade de culturas transgênicas expressando proteínas cry, cyt e vip, obtidos da bactéria *B. thuringiensis*, tem sido utilizada para controlar lagartas desfolhadoras em culturas de interesse econômico. Essas proteínas são altamente específicas em sua atividade contra lepidópteros (VAECK et al., 1987) e, devido às ligações das toxinas ocorrerem em sítios específicos, ocasionam o rompimento das membranas do intestino médio de lagartas (BRAVO et al., 2008; CARNEIRO et al., 2009; MICHELOTTO et al., 2011), conseqüentemente, levando-as à morte. A utilização de plantas Bt traz diversos benefícios na agricultura através de um controle eficiente das pragas, redução do uso de inseticidas, manutenção dos inimigos naturais (que não são afetados pela proteína) que contribuem para uma agricultura mais sustentável (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

A primeira tecnologia Bt aprovada no Brasil e liberada comercialmente ocorreu em 2005, com o algodão transgênico Bollgard I®, que contém a proteína Cry1Ac (BERNARDI, 2012) e visa o controle dos principais lepidópteros da família Noctuidae, como *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), *Alabama argillacea* (Hübner, 1818), bem como, *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1843) da família Gelechiidae. Segundo Gould (1998) o manejo de *H. virescens* é praticamente completo, mas o de *H. zea* é apenas parcial, devido à elevada tolerância desta espécie para a maioria das proteínas Bt. Em 2009, após o lançamento do Bollgard II®, a proteção contra insetos de raças mais resistentes de lepidópteros e mesmo outras ordens, como é o caso de *S. frugiperda* e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) foi observada após a inclusão do gene cry2Ab2 (CTNBio, 2011).

O primeiro milho resistente a insetos foi liberado em 2007, com o evento MON 810, que produz a proteína Cry1Ab (Yieldgard®), proporcionando uma redução significativa nas populações de *S. frugiperda* (MENDES; WAQUIL; VIANA, 2009; OKUMURA et al., 2013; WAQUIL et al., 2013) e *Diatraea saccharalis*

(Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (CTNBio, 2011). A agricultura brasileira se destaca pela rápida expansão no cultivo de materiais transgênicos. Na safra 2016/2017, o milho geneticamente modificado foi adotado em 88,4% da área total, correspondente a 15,7 milhões de hectares da área plantada (INFORMATIVO CÉLERES, 2017). Estima-se que o uso do milho Bt reduziu os custos de produção da cultura em cerca de 500 milhões de dólares anuais pela redução de perdas causadas pelos lepidópteros praga (WAQUIL; VILELLA; FOSTER, 2010).

A soja transgênica tolerante a herbicidas (Roundup Ready) oriunda da Argentina já era comercializada desde 1998, porém, a soja Bt (INTACTA RR2 PRO™) foi liberada apenas em 2010 (CTNBio, 2017). A primeira soja Bt foi desenvolvida com o evento MON 87701 x MON 89788, que representa uma evolução da soja RR que possui genes que codificam a expressão tanto da proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que confere tolerância ao herbicida glifosato, quanto da proteína de resistência aos insetos com genes que codificam a produção da proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* (BERNARDI, 2012). Segundo Informativo Céleres (2017), cerca de 96,5% da área plantada de soja possui transformação genética (INFORMATIVO CÉLERES, 2017). Hoje, é possível encontrar cultivares de soja transgênica tolerante a insetos com a presença de mais de uma proteína (Cry1A.105, Cry2Ab, Cry1Ac) e também à herbicidas (CTNBio, 2017).

A adoção de culturas transgênicas como o algodão, o milho e a soja produzindo proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, favorece a exposição direta das populações de insetos polívoros, dificultando o manejo da resistência ao nível de macrorregiões (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012). Na safra 2016/2017, a adoção de materiais transgênicos atingiu 93,4% da área total cultivada com soja, milho e algodão, representando 49,1 milhões de hectares (INFORMATIVO CÉLERES, 2017). Com esse cenário agrícola, a preocupação com o manejo de resistência à toxina Bt é um dos principais desafios a serem enfrentados, por exercer elevada pressão de seleção sobre as populações das pragas-alvo (BERNARDI et al., 2011), podendo comprometer a sua eficiência (HEAD et al., 2010). Atualmente, com os avanços na área de biotecnologia, o desenvolvimento de plantas transgênicas que contém mais de um gene Bt, pode retardar a evolução da resistência em populações de insetos, em condições de campo (HEAD; GREENPLATE, 2012; LEITE et al., 2011), aumentando o seu espectro de ação para outros insetos-praga

(MANYANGARIRWA et al., 2006). A estratégia de piramidação de genes Bt é usualmente caracterizada por aumentar o nível de proteção da planta Bt contra as pragas-alvo (STORER et al., 2012), isso devido à frequência de alelos de resistência para duas (ou mais) proteínas Bt na população dos insetos alvo ser relativamente menor do que na presença de apenas uma proteína Bt. Assim, a quantidade de insetos suscetíveis necessária para diluir os alelos de resistência é menor, o que viabiliza a redução da área de refúgio (SIEBERT et al., 2012). A lagarta *S. frugiperda* por exemplo, é praga-alvo tanto do milho transgênico, quanto do algodão, podendo atacar também a cultura da soja. O milho geneticamente modificado produz a proteína Cry1Ab e o algodão a Cry1Ac. É possível ocorrer a resistência cruzada dos insetos para Cry1Ac e Cry1Ab por essas proteínas atuarem nos mesmos receptores da membrana do intestino médio das lagartas (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Adicionalmente, Martinelli et al. (2006) verificou a similaridade genética entre populações de *S. frugiperda* provenientes das culturas de milho e algodão no Brasil.

Com o uso intensivo dos híbridos Bt, diversos casos de falha no controle de *S. frugiperda* se alimentando em milho foram registrados em diversas regiões brasileiras. Dentre elas, redução na suscetibilidade ao Cry1Ab (evento MON 810) (OMOTO et al., 2016), à toxina Vip3Aa20 (BERNARDI et al., 2015), eficácia reduzida para a proteína Cry1F (evento TC1507) (FARIAS et al., 2014). Outros casos de resistência também foram registrados em países como, a África do Sul com *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) se alimentando em milho Cry1Ab (VAN RENSBURG, 2007); *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) para algodão Cry1Ac na China (LIU et al., 2010); *S. frugiperda* para o milho Cry1F em Puerto Rico (STORER et al., 2012); *P. gossypiella* para algodão Cry1Ac na Índia (DHURUA; GUJAR, 2011) e *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) para milho Cry3Bb1 nos EUA (GASSMANN et al., 2011).

A implementação de um programa efetivo de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) é fundamental para retardar e prevenir a evolução da resistência de insetos e prolongar os benefícios trazidos pelas culturas Bt. A combinação do uso de alta dose da toxina Bt com áreas de refúgio têm sido as técnicas mais recomendadas para o manejo de resistência dos insetos (GOULD, 1998). O refúgio é uma área cultivada com plantas não Bt e tem como função produzir insetos suscetíveis às proteínas inseticidas. Esses insetos ao acasalarem com insetos

resistentes, provenientes das áreas Bt, irão gerar novos indivíduos (heterozigotos) suscetíveis à tecnologia. A adoção dessas áreas com plantas não Bt, é considerada a principal ferramenta dos programas de MRI para as culturas Bt que produzem proteínas inseticidas, e a sua não adoção pelos agricultores, tem resultado na seleção de insetos resistentes às toxinas, ocasionando prejuízos nas lavouras (MESQUITA, 2013).

A presença da mesma proteína em soja, milho e algodão Bt contribui para o aumento da pressão de seleção das populações de lepidópteros e aumenta as possibilidades de aparecimento de insetos resistentes. Entretanto, a rapidez com que as populações são selecionadas após a exposição à toxina depende de fatores como herança da resistência (ROUSH; MCKENZIE, 1987) e fluxo gênico entre as populações (MACHADO; FIÚZA, 2010). No Brasil, onde existe um sistema intensivo de produção agrícola, o monitoramento da resistência às toxinas Bt é uma ferramenta essencial para os programas de manejo da resistência. Com isso, torna-se importante o conhecimento da dinâmica populacional dos insetos de uma cultura para outra, principalmente porque a alta capacidade de voo dos adultos de lepidópteros torna possível a exploração de diferentes plantas hospedeiras. Dessa forma, a indicação da origem do indivíduo fornece informações relevantes para o manejo da resistência.

2.2 SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa da família Fabaceae, originária da China e conhecida a aproximadamente 2.000 a.C. É considerada uma das culturas mais antigas do mundo (MORSE, 1950) e tem grande importância para alimentação na Ásia, principalmente na China, Japão e Coréia (MISSÃO, 2006; USDA, 2017). A produção de soja aumentou a partir do início do século XX, quando as primeiras cultivares comerciais da leguminosa foram desenvolvidas e comercializadas nos Estados Unidos (EMBRAPA, 2005). No Brasil, os primeiros testes de cultivo iniciaram em 1882 com algumas variedades no estado da Bahia e, apenas em 1914 é que a introdução da cultura foi oficializada no estado de Rio Grande do Sul (FARIAS et al., 2001). No entanto, apenas nas décadas de 1960/1970, é que essa *commoditie* ganhou importância econômica, por se beneficiar com a política de incentivos fiscais oferecido à triticultura, no país, nessa época. Já

que, o trigo era cultivado durante o inverno e a soja, no verão, podendo ser utilizado para esta cultura, as mesmas áreas de cultivo, mão-de-obra e maquinários, viabilizando o seu cultivo (EMBRAPA, 2005). Na atualidade, a soja é o principal produto de exportação brasileiro e o Brasil é o maior exportador de soja do mundo (USDA, 2019).

A soja é um dos produtos agrícolas mais comercializados mundialmente (VILELA; MOREIRA, 2007). Dentre os principais produtores, os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina são responsáveis por 82% de toda produção mundial (USDA, 2019). Entretanto, o Brasil tem atingido produções de grãos cada vez maiores nas últimas safras e poderá em breve, se tornar o maior produtor mundial (ÁVILA; VIVIAN; TOMQUELSKI, 2013). Na safra 2018/2019, a produção brasileira de grãos foi de 115 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Apesar do sucesso que a implantação da soja obteve no Brasil, as condições edafoclimáticas, principalmente a temperatura, favorece a ocorrência de diversos problemas fitossanitários. As perdas no agronegócio brasileiro chegam a US\$55 bilhões no ano devido às doenças ocasionadas nas culturas, equivalente a 7,7% ou 25 milhões de toneladas dos produtos agrícolas (NOJOSA et al., 2015). Estima-se que cerca de 42,1% da produção seja perdida por danos ocasionados por pragas agrícolas que incluem agentes causais de doenças (fungos, bactérias, vírus e nematoides), insetos, ácaros e plantas invasoras (KREYCI; MENTEN, 2013). Segundo esses autores, cerca de 15,6% das perdas são decorrentes dos danos causados por ácaros e insetos-praga, 13,3% por fitopatógenos e 13,2% por plantas daninhas. Em relação aos insetos-praga, diversas espécies estão sujeitas desde a sua fase de germinação, até o momento da colheita (DEGRANDE; VIVAN, 2012). A partir da germinação, insetos como o bicudo-da-soja (*Sternechus subsignatus*), a lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*), os corós (Scarabaeoidea) e os percevejos-castanhos-da-raiz (*Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*) ocasionam danos à cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Com o desenvolvimento da soja, outras pragas como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), a lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), vaquinha (*Diabrotica speciosa*) ocorrem na cultura, causando desfolhamento com perdas na produtividade (DEGRANDE; VIVAN, 2012). Além dessas, algumas espécies de lagartas do complexo Spodoptera podem causar desfolha e danos às vagens, ao longo do desenvolvimento da cultura da soja (MOSCARDI et al., 2012).

Insetos sugadores como mosca-branca, tripes, cigarrinha verde, ácaro-rajado e o ácaro-branco também podem ameaçar o cultivo da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Com o início da fase reprodutiva, percevejos sugadores danificam as vagens e sementes e, como afetam a qualidade do produto final, são de extrema importância econômica (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2015). Dentre os percevejos da família Pentatomidae que ocorrem mais comumente, *Euschistus heros* (Fabricius, 1797), *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) podem causar danos desde a formação das vagens, até o enchimento completo dos grãos (GALLO et al., 2002), sendo o primeiro o mais abundante atualmente.

A soja possui alta capacidade de recuperar níveis significativos de desfolha sem comprometer a produtividade, principalmente se a injúria ocorrer na fase vegetativa ou em condições pluviométricas favoráveis. No entanto, caso os níveis de desfolha sejam superiores à capacidade de tolerância da planta, esta pode sofrer danos significativos de produtividade (MOSCARDI et al., 2012). Estima-se que antes do estágio R3 (aparecimento das vagens) (FEHR et al., 1971), a soja pode tolerar até 35% de desfolha sem ocasionar perdas, no entanto, após esse estágio, na fase de preenchimento da vagem, desfolha superior a 20% podem provocar redução significativa no rendimento da cultura (KOGAN; TURNIPSEED, 1987).

Dentre os métodos de controle, o uso de inseticidas químicos é a tática mais utilizada para o manejo de artrópodes praga quando a densidade populacional se aproxima do nível de dano econômico, principalmente devido à sua rápida ação (PAPA, 2002). No entanto, o seu uso indiscriminado é ecologicamente nocivo, podendo ter como consequência o aumento da população de pragas secundárias, provocar efeito adverso em organismos benéficos, resíduos indesejáveis em alimentos, danos aos aplicadores dos produtos (PIUBELLI et al., 2005), além de aumentar os custos da produção. Paralelamente, os insetos podem desenvolver resistência a diversos produtos químicos e, para retardar a evolução dessa resistência, é fundamental a implementação de um programa efetivo de manejo da resistência (MAPA, 2019).

2.3 MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae. Sua origem vem de um pasto mexicano denominado de teosinto. O

gênero *Zea* é composto por gramíneas de ciclo perene ou anual e são nativas do México e da América Central (DOEBLEY, 1990). Atualmente, é uma das plantas mais cultivadas e consumidas em todo o mundo (LIMA et al., 2007). No Brasil, é cultivada em praticamente todo o território nacional. O milho é o segundo grão mais cultivado no país, e o seu plantio é dividido em duas épocas, correspondente a safra de verão ou primeira safra e a safra de inverno ou safrinha (FORNASIERI FILHO, 2007; SANS; GUIMARÃES, 2010).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e China (USDA, 2019). Para a safra 2018/2019, estima-se que essa cultura atingirá cerca de 92 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 17 milhões de hectares (CONAB, 2019). A importância da cultura é caracterizada pelas diferentes formas de utilização, que vão desde a indústria de alta tecnologia, até a alimentação animal, que utiliza cerca de 70% do cereal representando a maior parte do consumo mundial do milho em grãos. No Brasil, apenas 15% da produção de milho se destina ao consumo humano, de maneira indireta na composição de variados produtos (SILVA et al., 2006).

Dentre os fatores que mais influenciam a redução da produtividade do cereal, destacam-se o ataque de insetos-praga, que são os que causam maior impacto na produtividade da cultura do milho (CRUZ; PINTO; QUEIROZ, 2009); WAQUIL et al., 2013). Estima-se que os prejuízos causados por insetos na cultura do milho possam ultrapassar R\$ 2 milhões (CRUZ; PINTO; QUEIROZ, 2009). Dentre essas pragas, *S. frugiperda* é considerada a principal praga do milho no Brasil e na América do Sul (BLANCO et al., 2016). Conhecida popularmente como lagarta-do-cartucho, essa lagarta é considerada uma praga de difícil controle pelo fato de migrar e permanecer no interior do cartucho do milho (BARROS et al., 2010), protegendo-se com as folhas jovens que formam um espiral. Coloniza plantas na fase vegetativa, desde a sua emergência até a sua fase de colheita. Dependendo do nível de injúria, a praga pode causar perdas no rendimento de até 55% nos grãos (FIGUEIREDO et al., 2006). No Brasil, aspectos bioecológicos como elevado potencial de polifagia, alta capacidade reprodutiva associada à dispersão na fase adulta (NAGOSHI; MEAGHER, 2008), além da ocorrência de gerações sobrepostas ao longo do ano, favorecem a sua ocorrência, tornando-a praga primária não só na cultura do milho, mas também em outras culturas como o algodão (POGUE, 2002; MARTINELLI et al., 2006).

Outros insetos, como a broca-do-colmo *D. saccharalis* e a lagarta-da-espiga do milho *H. zea*, também causam danos significativos à cultura e são consideradas pragas importantes do milho (FARIAS et al., 2013). De modo semelhante à lagarta-do-cartucho, são espécies que a eficiência da aplicação foliar de inseticidas é limitada para o seu controle (CRUZ, 2007).

Dentre os métodos de controle de insetos-praga, o uso de inseticidas sintéticos é predominante na cultura do milho, podendo chegar em até oito aplicações durante o ciclo de cultivo (CRUZ; PINTO; QUEIROZ, 2009). Devido aos danos que tais produtos podem causar ao meio ambiente e a saúde humana, métodos alternativos são desenvolvidos, tais como o manejo integrado de pragas (MIP), plantas transgênicas e baculovírus (PEIXOTO et al., 2017). A principal estratégia para controle de *S. frugiperda* tem sido a utilização de híbridos de milho geneticamente modificados que expressam genes proveniente de *B. thuringiensis* que codificam a produção de proteínas tóxicas para as lagartas (INFORMATIVO CÉLERES, 2013). Espécies como *D. saccharalis* e *H. zea* também são pragas alvo dos genótipos Bt. Estima-se que até 90% do ataque de insetos nas espigas de milho é reduzido com o uso de milho Bt e, desta forma, diminui a probabilidade de entrada de patógenos nas perfurações provocadas pelos insetos-praga (CIB, 2012).

2.4 ALGODÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) pertence à família Malvaceae e essa cultura produz a principal fibra têxtil natural para a indústria têxtil e outras finalidades. Originária do continente americano, incluindo-se o Brasil, essa cultura foi utilizada por indígenas durante muito tempo (URBAN et al., 1995). É certamente um dos produtos mais antigos de exploração da agricultura brasileira e a sua produção, se destina ao mercado internacional como matéria prima para indústria têxtil (MOREIRA; SANTOS, 1994).

A área plantada de algodão no Brasil na safra 2018/2019 foi de 1562,8 mil hectares, com uma produção de 6,4 mil toneladas de algodão em caroço, das quais, 2,6 mil toneladas são na forma de pluma (CONAB, 2019). É uma cultura de grande importância econômica e social em virtude das diversas aplicações industriais, além da produção de fibras empregadas na indústria, como pela utilização da semente para fabricação de óleo para alimentação humana e do uso do

farelo do algodão utilizado na alimentação animal (SANCHES JÚNIOR; MALERBO-SOUZA, 2004). Dessa forma, pode gerar emprego e renda para um grande número de agricultores (CARTAXO; PEREIRA; SILVA, 2013). Segundo a FAO, o Brasil ocupa hoje a quinta posição no ranking mundial das nações produtoras de algodão, perdendo para a China, Índia, Estados Unidos e Paquistão. Dentre os estados brasileiros, Mato Grosso se destaca pela produção eficiente e rentável, onde a cada safra novas técnicas de cultivo são adotadas, refletindo em crescimento, que representa mais de 50% da área de algodão plantado no país (GALBIERI et al., 2014). A cultura está bem adaptada à região Centro-Oeste e tal sucesso, se deve à algumas vantagens da região em relação às demais, como Sudeste e Sul. A topografia da área possibilita a mecanização da atividade, a maioria das variedades desenvolvidas são adequadas para regiões com bioma como o Cerrado, permitindo maior homogeneidade da fibra, e principalmente, pela sua produção ser apoiada por elevado conhecimento tecnológico (URBAN et al., 1995).

Das várias espécies de insetos que atacam o algodão, destacam-se o bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) (NEVES et al., 2014) e o curuquerê-do-algodoeiro, *A. argillacea* (GRIGOLLI et al., 2012). Essas pragas-chave da cultura, podem causar perdas significativas à produção. Alguns países como os Estados Unidos, implementaram programas de erradicação de *A. grandis* devido às altas perdas na produtividade (McCORKLE et al., 2010). Outra importante praga do algodão é *P. gossypiella*, conhecida popularmente como lagarta rosada. É uma praga que ataca as maçãs do algodão e por isso, torna-se uma praga primária afetando diretamente a quantidade e qualidade das fibras e sementes (BUSOLI et al., 1991).

Outros insetos, como *S. frugiperda*, também ganharam importância nas principais regiões produtoras de algodão no país (FERNANDES; BUSOLI; BARBOSA, 2002). A sua localização na região mediana e basal do algodoeiro, impedem os produtos aplicados de atingir a quantidade suficiente para seu controle efetivo (SCRAMIN et al., 2002).

O aumento de nível tecnológico e, conseqüente expansão territorial de uma monocultura, provoca um incremento também nos problemas entomológicos (CRUZ et al., 1995). Dessa forma, assim como outras culturas, o algodoeiro está sujeito a severos danos de pragas e doenças, durante todas as fases de cultivo. Como o cultivo de algodão exige cuidados fitossanitários, o uso de defensivos

agrícolas para controle de pragas é bastante notório (SCRAMIN et al., 2002). Estima-se que cerca de 10% do mercado brasileiro de defensivos agrícolas seja utilizado para controle de pragas e doenças do algodão (SINDAG, 2006). O uso abusivo e inadequado de inseticidas provoca acúmulo de resíduos no meio ambiente, além de eliminação dos inimigos naturais (EKSTRÖM; EKBOM, 2011).

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas sintetizam uma vasta e diversa gama de substâncias químicas que podem ser divididas em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são substâncias essenciais para o crescimento, e responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção das células das plantas e de suas atividades essenciais. No entanto, em condições naturais, os vegetais estão expostos a diversos inimigos que podem afetar seu desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2010). As plantas desenvolveram mecanismos de defesa representados por uma série de características morfológicas e também, um complexo de substâncias químicas que podem ser repelentes ou tóxicas, tornando-as impróprias para os insetos-praga (PIUBELLI et al., 2003). Essas substâncias de defesa são chamadas aleloquímicos e são definidos como metabólitos secundários (KOGAN, 1986). A maioria dos metabólitos secundários são derivados das vias isoprenoide, fenilpropanoide, alcaloide ou de ácidos graxos/policetídeos (DIXON, 2002). São substâncias não nutritivas, produzidas por determinada espécie, e que afetam a sobrevivência, crescimento, comportamento, fecundidade ou fertilidade de indivíduos de outra espécie (KOGAN, 1986). Em teoria, todas as plantas são capazes de sintetizar compostos secundários, mas de maneira geral, a sua distribuição é limitada a algumas plantas e alguns metabólitos secundários são encontrados apenas em algumas ou em uma única espécie vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2010). Essa característica é mais comum em plantas selvagens, que para garantir a sua sobrevivência, desenvolveram mecanismos para se adaptar e competir contra seus inimigos (SOUZA FILHO; ALVES, 2002).

Os metabólitos secundários possuem importantes funções ecológicas nas plantas. Dentre elas, a proteção das plantas contra herbívoros e patógenos, são utilizados por polinizadores como atrativos de aroma, cor ou sabor, e funcionam também como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre

plantas e microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2006). São divididos em três grupos químicos distintos: terpenos, compostos fenólicos e componentes nitrogenados (CROTEAU et al., 2000; SHAHIDI, 1997; SHAHIDI; HO, 2005; SHAHIDI; NACZK, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Alguns metabólitos secundários podem ser constitutivos, expressos constantemente, sendo característico de cada genótipo sem depender da presença de nenhum fator elicitador (STOUT, 2013). No entanto, os processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem nas plantas podem ser alterados após lesão mecânica, herbivoria, infecção por patógenos e radiação ultravioleta (BALDWIN; SCHULTZ, 1983; CONCOMI et al., 1996; LIN; KOGAN; FISCHER, 1990), mudando a qualidade dos tecidos vegetais que servem de alimento para fitófagos (COLEMAN; JONES, 1991). A denominada resistência induzida pode alterar as rotas metabólicas das plantas, após sofrer algum estresse bióticos e/ou abióticos em resposta às injúrias (STOUT, 2013).

Os compostos secundários pertencem a diferentes grupos químicos e vários desses metabólitos secundários estão envolvidos na interação inseto-planta e são estudados pelos efeitos negativos que podem causar nos insetos-praga. Na cultura da soja os flavonoides são os compostos de defesa mais prováveis (HOFFMANN-CAMPO, 1995), e são conhecidos por desempenhar papel importante na defesa das plantas contra microrganismos e insetos herbívoros (DIXON; STEELE, 1999). Estes são derivados da rota metabólica dos fenilpropanoides e precursores derivados do acetato que são conhecidos por causar efeitos antixenose e/ou antibiose em pragas da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001; NEUPANE; NORRIS, 1990; SHARMA; NORRIS, 1991). De maneira geral, os isoflavonoides glicosídicos mais encontrados na soja, compreendem os compostos genistina, glicitina e daidzina, bem como suas correspondentes agliconas genisteína, gliciteína e daidzeína (Figura 1) (MACLEOD; AMES, 1988). Outros compostos derivados destes glicosídeos são as formas acetil e malonil (OHTA et al., 1979; KUDOU et al., 1991). O efeito destes compostos fenólicos depende de sua concentração, que podem ter função atrativa, deterrente, repelente, ou tóxica às pragas que atacam a cultura da soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001).

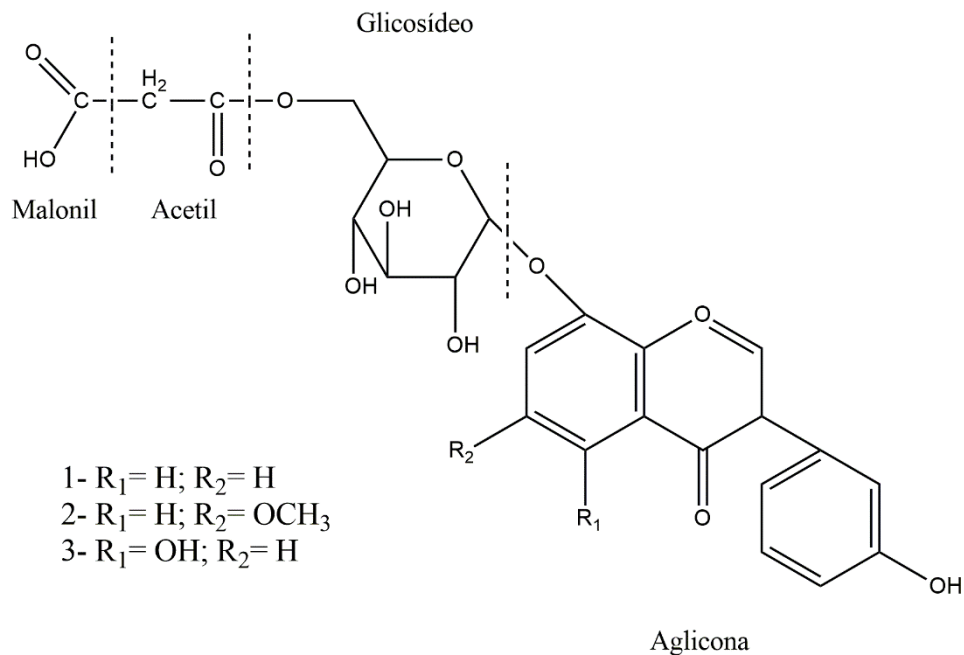


Figura 1. Estruturas químicas dos flavonoides (1) daidzeína, (2) gliciteína e (3) genisteína.

No milho, os ácidos hidroxâmicos (Hx) são grupos de substâncias que ocorrem nas plantas de forma natural, e são derivados da rota metabólica do ácido chiquímico, para produção do aminoácido triptofano (NIEMEYER, 1988). De modo geral, os ácidos hidroxâmicos são encontrados na forma de glicosídeos, e nessa condição, não são fitotóxicos. O DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-methoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) é o ácido hidroxâmico predominante no milho (HASHIMOTO; SHUDO, 1996), e junto com o DIBOA (2,4-di-hidroxi-2H-1,4-benzoxazin-3 (4H) -ona) passam por um processo de degradação espontânea, formando benzoxazolinonas correspondentes, como 6-metoxi-benzoxazolin-2 (3H) -ona (MBOA) e seu derivado 2-benzoxazolinona (BOA) (Figura 2) (NIEMEYER, 1988). Esses compostos possuem um papel importante no mecanismo de resistência das plantas a determinadas espécies de insetos (GUTHRIE et al., 1986; PHILOGÈNE; ARNASON, 1995). Na planta ilesa, BOA e MBOA ocorrem nas formas glicosídicas, mas os ácidos hidroxâmicos são enzimaticamente liberados após algum tipo de dano celular, como ataque de patógenos ou homogeneização (LONG; DUNN; ROUTLEY, 1974; VENIS; WATSON, 1978). Podem apresentar diferentes graus de concentração e toxicidade e em geral, as formas glicosiladas não afetam negativamente os insetos

(NIEMEYER et al., 1990). Alguns autores extraíram tecidos vegetais intactos e observaram que somente derivados de glicosídeos são observados, indicando que sem injúria, a planta não armazena os ácidos hidroxâmicos ou benzoxazolinona na forma livre (VIRTANEM; HIETALA, 1960). No entanto, após injúria nas células da planta, a enzima μ -glucosidase, é liberada e rapidamente inicia o processo de hidrólise do glicosídeo, liberando a aglicona, e esta, devido a sua toxicidade, promove a proteção para a planta (VIRTANEM; HIETALA, 1960). Nos cereais, estudos mostraram que ácidos hidroxâmicos cíclicos do tipo 4-hidróxi-1,4-benzoxazin-3-onas (benzoxazinoides) na forma de 2- β -O-D-glicosídeos, afetam insetos, fungos e bactérias (GIANOLI; NIEMEYER, 1997). Tais mecanismos de resistência incluem outras funções biológicas, como tolerância a herbicidas (NIEMEYER, 1988), alelopatia (BARNES; PUTNAM, 1987), farmacológicas e toxicológicas, isto é, atividades antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e mutagênicas são verificadas em suas atividades (HASHIMOTO; ISHIZAKI; SHUDO, 1995). Com isso, uma série de produtos para utilização farmacológicas e agroquímicas sintéticos têm sido desenvolvidos com base em benzoxazinoides (ATKINSON et al., 1992).

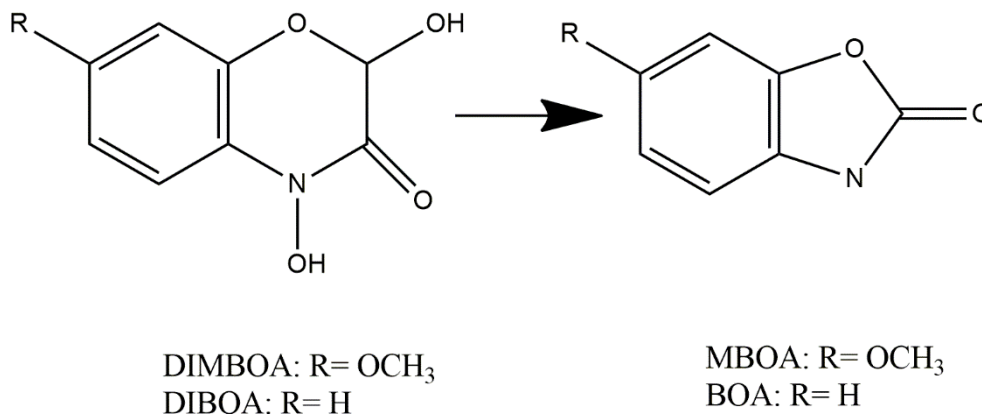


Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos hidroxâmicos DIMBOA, DIBOA, MBOA e BOA.

O gossipol (Figura 3) é um polifenol encontrado em várias partes da planta, não só na cultura do algodão, mas em várias espécies do gênero *Gossypium*.

Terpenoides do algodão, como o gossipol têm grande importância econômica, e estão presentes principalmente nas glândulas pigmentares do algodão, sendo os metabólitos secundários mais importantes dessa cultura (ALTMAN; STIPANOVIC; BELL, 1990). Podem proteger as plantas do ataque de várias doenças e fungos (HEDIN et al., 1992a, b), devido à sua toxicidade, efeito anti-nutricional, e efeitos deterrentes na alimentação de vários lepidópteros generalistas (BOTTGGER; PATANA, 1966).

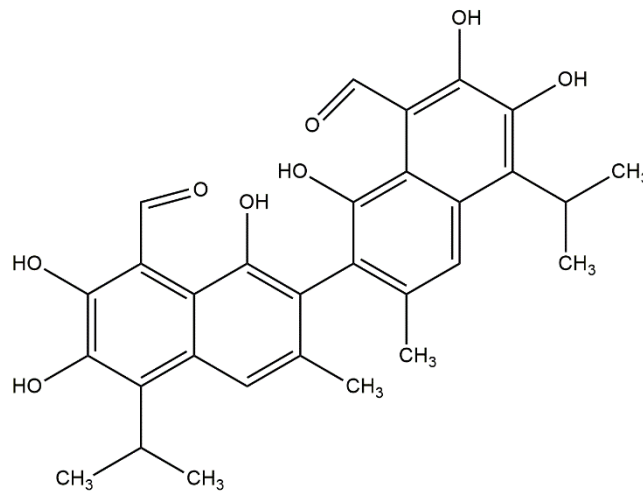


Figura 3. Estrutura química do gossipol.

2.6 LAGARTAS DESFOLHADORAS

Em áreas de cultivo, a prática da sucessão de culturas, ou semeaduras escalonadas de culturas com fenologias diferentes tem sido realizada em áreas contíguas durante o verão, como é o caso da soja, milho e algodão. Além desses, os cultivos de entressafra, como aveia, trigo ou milho-safrinha, favorecem populações de insetos polívoros, devido à oferta contínua de alimento durante todo o ano, dificultando o seu manejo. Tais pragas, vêm ganhando importância devido ao seu ataque constante em diferentes culturas, com ocorrência regular e ampla distribuição geográfica (BUENO; CORRÊA-FERREIRA; BUENO, 2010), especialmente nas culturas de milho, algodão, feijão e soja (SPECHELT et al., 2013). Segundo levantamento realizado por Formentini et al. (2015), mais da metade (52,2%) das espécies de insetos identificados na América do Sul pertencentes à ordem Lepidoptera, são consideradas polívoros, se alimentando principalmente de

plantas da família das Fabaceae e Poaceae. Georghiou e Taylor (1986) sugerem ainda, que o hábito polífago pode retardar a evolução da resistência a inseticidas, devido à migração de indivíduos suscetíveis provenientes de áreas ocupadas com outras culturas não tratadas com defensivos agrícolas. Entretanto, o uso de uma tecnologia dominante, como o uso de diversas culturas, sem refúgio, como tem ocorrido no Brasil dificulta a ocorrência de tal situação ambiental, ou seja, de refúgio natural.

Com a introdução na cultura da soja da doença ferrugem-asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow) (YORINORI et al., 2005), na safra 2001/2002, o uso preventivo e intenso de fungicidas tornou-se necessário. Como consequência, houve redução da ocorrência natural de fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium rileyi* (Farlow), afetando o controle biológico natural das pragas e alterando a composição das espécies de noctuídeos (MOSCARDI et al., 2012). A tecnologia mais recente para controle de pragas é o uso de plantas Bt que contém genes da bactéria *B. thuringiensis* que codificam a produção de proteínas inseticidas e controlam larvas de lepidópteros-praga. Essa tecnologia tem sido amplamente adotada no Brasil em milho e algodão e, a partir da safra 2013/14, em soja. A redução das aplicações de inseticidas, que consequentemente pode favorecer o controle biológico natural de pragas, foi listada como um dos benefícios das plantas Bt (HELLMICH et al., 2008).

2.6.1 SPODOPTERA FRUGIPERDA

As espécies do gênero *Spodoptera* tem uma ampla distribuição mundial, sendo cerca da metade das 30 espécies descritas, consideradas pragas de diversas culturas de importância econômica (POGUE, 2002). A incidência desse gênero tem aumentado na cultura da soja, causando reduções significativas na produtividade (BUENO; CORRÊA-FERREIRA; BUENO, 2010). Dentre as espécies, *S. frugiperda* conhecida popularmente como “lagarta-do-cartucho” ou “lagarta militar”, destaca-se pelo hábito polífago, alimentando-se em mais de 180 espécies de plantas (CASMUZ et al., 2010).

É a principal praga da cultura do milho (FARIAS et al., 2014), alimentando-se também de outras gramíneas como milheto, trigo, sorgo, arroz, grama-bermuda e cana-de-açúcar. Embora tenha preferência alimentar por

gramíneas, também se alimenta de outras plantas como alface, feijão, amendoim, batata, batata-doce, repolho, espinafre, tomate, couve, abóbora, soja e algodão (ALI et al., 1989; BOTTON et al., 1998, CRUZ, 1995; POGUE, 2002; SILVA et al., 1968; SPARKS, 1979).

A ampla oferta de hospedeiros disponíveis ao longo do ano, seja devido à sucessão de culturas como milho e soja no verão, ou de milho e sorgo na “safrinha”, favorece a manutenção da elevada densidade populacional de *S. frugiperda* no ambiente e dificulta o seu controle (BARROS; TORRES; BUENO, 2010). Na cultura do milho no Brasil, a lagarta-do-cartucho pode reduzir a produtividade entre 34,1% (CARVALHO, 1970) e 89,6% (COSTA et al., 2002), dependendo do estágio de desenvolvimento da cultura em que ocorre o ataque. É uma espécie amplamente distribuída em função da grande diversidade de plantas hospedeiras disponíveis durante todo o ano, além do clima favorável para o seu desenvolvimento (CRUZ, 1995). A presença de plantas voluntárias e plantas daninhas no ambiente agrícola também pode se constituir em um nicho ecológico inicial para *S. frugiperda*, proporcionando o crescimento populacional dessa espécie (SILVA, 2000). A buva (*Conyza* spp.), por exemplo, é uma planta daninha frequente em regiões produtoras de soja e milho e torna-se uma espécie de importância devido ao potencial de hospedeiro intermediário para a sobrevivência de pragas polífagas como *S. frugiperda* e também para a espécie *H. armigera* (MENDES et al., 2008). No entanto, segundo esses autores, a alimentação exclusiva em folhas de buva não é adequada para as duas espécies, que não conseguem atingir biomassa suficiente para completar seu desenvolvimento. Com isso, essa planta daninha pode ser utilizada por essas espécies apenas como abrigo e fonte temporária de alimento das lagartas.

O desenvolvimento de *S. frugiperda* é do tipo holometábolo, ou seja, possui metamorfose completa, passando pela fase de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulto (GARCIA, 2002). Os ovos geralmente acinzentados são depositados em massa, com camadas sobrepostas que podem conter mais de 100 ovos por postura (MOSCARDI et al., 2012). São colocados tanto na face inferior quanto na superior da folha, dando origem a lagartas muito pequenas que irão passar por seis a sete instares até completar o seu desenvolvimento (CRUZ et al., 2008). Segundo os autores, na fase larval pode atingir 50 mm de comprimento, apresentando uma coloração que varia de pardo escura, verde até quase preta, com três linhas

longitudinais de coloração branco amarelada na parte dorsal do corpo, uma linha escura mais larga e, abaixo dessa, uma listra irregular amarela marcada com vermelho. Uma característica dessa espécie é a cabeça de coloração escura com suturas que se cruzam e formam um “y” invertido (CRUZ et al., 2008). Após completar o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração inicialmente verde-clara, tornando-se progressivamente mais escura, até ficar totalmente preta, próximo à emergência do adulto (CRUZ, 1995).

As mariposas, medem aproximadamente 35 mm de envergadura e apresentam asas anteriores de coloração parda-escura e posteriores, branca acinzentada (GALLO et al., 1988). Os machos e fêmeas possuem diferença na coloração do primeiro par de asas, os primeiros apresentam manchas mais escuras, e as fêmeas, pardas. Outra diferença morfológica sexual é que as fêmeas adultas apresentam abdômen mais largo na porção mediana e as pupas, tem uma abertura anal com um traço reto longitudinal, ao contrário dos machos, que possuem um traço reto longitudinal seguido de curvas laterais circundantes.

S. frugiperda é uma praga de ocorrência sazonal devido à ausência de diapausa em seu desenvolvimento e em áreas de clima temperado ou sob temperaturas mais elevadas, pode produzir por ano na cultura do milho, até 13 gerações (AFONSO et al., 2009).

Antes da liberação do cultivo de plantas Bt o controle de *S. frugiperda* era realizado quase que exclusivamente por inseticidas químicos (BUENO; CORRÊA-FERREIRA; BUENO, 2010). Como resultado, os inimigos naturais, que anteriormente faziam o controle biológico dessa praga, mantendo-as em nível de pragas secundárias, são eliminados e para dificultar, o inseto desenvolveu resistência a diversas classes de inseticidas (YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003). Na soja, a praga ataca na fase reprodutiva e se abriga próximo à região das vagens, e com isso, ficam protegidas das aplicações de inseticidas, dificultando o seu controle (MOSCARDI et al., 2012).

No milho, é comum observar o inseto se alimentar da base da espiga de milho, que além de danificar os grãos e gerar altos prejuízos, ainda facilita a penetração de patógenos que produzem toxinas e podem causar problemas à saúde humana e animais domésticos (CRUZ et al., 1999). O cartucho do milho é seu nicho preferido (CRUZ; MONTEIRO, 2004) e como o seu manejo é realizado principalmente por produtos químicos (COSTA et al., 2005), o cartucho das plantas

protege e limita significativamente a eficiência desse método de controle (WAQUIL, 2007). Geralmente, pelo hábito canibal da espécie, é comum encontrar apenas uma lagarta de *S. frugiperda* por cartucho (LUGINBILL, 1928).

Na cultura do algodão, lagartas de *S. frugiperda* recém eclodidas se alimentam de folhas, na superfície inferior do algodão, passando posteriormente para os botões florais e principalmente de maçãs em formação (ALI et al., 1990, LUTTRELL; MINK, 1999; VELOSO; NAKANO, 1983). Embora seja identificada em baixas densidades populacionais, *S. frugiperda* é nociva em algodoeiro, pois se alimenta diretamente das estruturas reprodutivas (BARROS et al., 2010). Além disso, quando se alimenta nessa cultura, é uma praga de difícil controle, pois a lagarta fica alojada no interior do dossel e das maçãs, impedindo o contato com o inseticida via pulverização (BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

Em lagartas desenvolvidas no milheto, o hábito alimentar é similar ao observado na cultura do milho, exibindo a mesma taxa reprodutiva (BARROS et al., 2010). Ainda, segundo esses autores, lagartas alimentadas em milho atingem uma taxa intrínseca populacional maior e menor tempo de desenvolvimento em comparação com culturas como algodão, milheto e soja. Dessa forma, o milho é considerado o hospedeiro mais adequado para lagarta-do-cartucho. No entanto, o plantio de culturas com fenologias diferentes em áreas próximas com as citadas acima, favorece a movimentação da lagarta-do-cartucho entre os cultivos (NAGOSHI, 2009) podendo ser o motivo do seu aparecimento frequente nas culturas onde anteriormente era considerada praga secundária.

2.7 ASSIMILAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR LEPIDÓPTEROS

Em geral, compostos secundários são específicos de cada família ou mesmo gênero de plantas e, assim, a sua identificação pode ser uma estratégia para determinar nos adultos as plantas hospedeiras consumidas durante a fase larval. Considerando a ampla distribuição de compostos secundários em diferentes partes da planta, insetos polívoros estão sujeitos à ação desses compostos durante a sua alimentação (HARBORNE; GRAYER, 1993). Entretanto, alguns insetos desenvolveram a habilidade de sequestrar esses compostos, ou seja, assimilar os metabólitos secundários de defesa oriundos das plantas hospedeiras (KUBO; HANKE, 1986), sem prejuízo biológico.

Bates (1862) e Müller (1879) foram os primeiros autores a propor que borboletas coloridas aparentemente eram impalatáveis para predadores, e que a coloração de insetos palatáveis e impalatáveis não era semelhante. Após essa constatação, Poulton (1914) apontou que a impalatabilidade das borboletas era devido à alimentação do inseto em determinada planta hospedeira durante a fase larval.

O exemplo clássico de sequestro de metabólitos é o da borboleta monarca, *D. plexippus*, que em sua fase jovem se alimenta de *Asclepias curassavica* (Gentianales: Apocynaceae) e, desta planta, sequestra um metabólito conhecido como cardenólido, que tornam os insetos adultos impalatáveis para os pássaros (ROTHSCHILD; FORD, 1970, citado por ROTHSCHILD et al., 1975). Segundo Zagrobelny et al. (2014), esse processo ocorre na fase larval, e os compostos assimilados são mantidos através da ontogênese do inseto e, posteriormente, podem desempenhar inúmeros papéis ao longo de seu ciclo de vida.

Fisiologicamente, as substâncias sequestradas são absorvidas pela membrana do intestino e podem ser distribuídas por todo o corpo do inseto, principalmente, na hemolinfa, ou muitas vezes restritos em tecidos especializados, como as glândulas de defesa (BLUM, 1983; BOWERS, 1990; NISHIDA, 2002). A defesa química segundo Brower (1984) pode ser caracterizada quando organismos possuem uma ou mais substâncias químicas nocivas que promovem a aproximação e/ou distanciamento dos predadores. A rejeição de um alimento pode ocorrer de forma parcial ou completa depois do predador ingerir um ou mais indivíduos-praga, ou ser repelido depois de simplesmente sentir o odor ou o sabor da presa (BROWER, 1984). Essa impalatabilidade para os predadores pode ser demonstrada por meio de sinais de alerta visíveis e também pelo comportamento gregário dos insetos (BOWERS, 1992).

O papel dos compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, em diferentes aspectos da interação inseto-planta é conhecido. O flavonol rutina (Figura 4) e a isoflavona genistina causam efeito negativo no comportamento alimentar de lagartas da família Noctuidae (PIUBELLI; MOSCARDI; HOFFMANN-CAMPO, 2009; SALVADOR et al., 2010). Esse flavonol foi detectado em asas da borboleta *Melanargia galathea* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Satyridae) sendo uma evidência de sequestro de flavonoides em insetos (THOMSON, 1926).

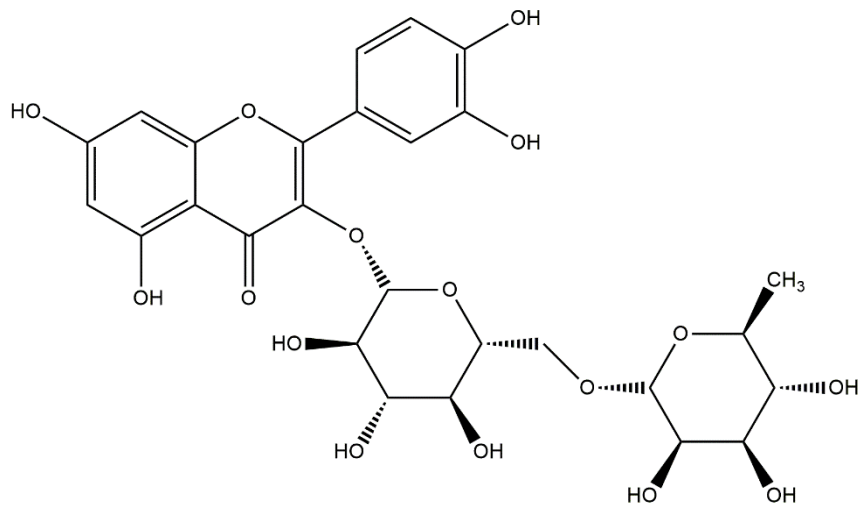


Figura 4. Estrutura química do flavonol rutina.

Os flavonoides, em geral, quando não eliminados pelas fezes, são detectados em maior concentração nas asas de fêmeas, que sequestram, em torno de 60% a mais do que os machos (SIMMONDS, 2003). Entretanto, os flavonoides sequestrados e acumulados nas asas das fêmeas, segundo Burghardt et al. (2000; 2001), não está relacionado à sua defesa, mas na comunicação visual e na atração dos machos para acasalamento.

Avanços no conhecimento da diversidade e especificidade de enzimas envolvidas na biossíntese de compostos, que ocorrem nos organismos vivos como insetos, podem auxiliar no entendimento não só da habilidade dos mesmos de desintoxicar e metabolizar os compostos das plantas, mas também na evolução do comportamento da seleção da planta hospedeira (BERENBAUM, 2002). Dessa forma, existem muitas possibilidades de utilização desses compostos pelo inseto sequestrador e possivelmente muitas funções dessas substâncias assimiladas ainda serão descobertas.

2.8 METABOLÔMICA

A metabolômica é o estudo dos metabólitos de um organismo, produzidos e/ou modificados em um sistema biológico (FIEHN, 2001). O conjunto de todos esses metabólitos (de massa molecular até 1500 Da) é chamado de

metaboloma (OLIVER et al., 1998). Esses metabólitos são compostos químicos que são formados, degradados ou transformados durante as rotas metabólicas e, no caso das plantas, podem ser divididos em dois grupos, os metabólitos primários e secundários (FILHO, 2010). Estima-se que no reino vegetal aproximadamente 200 mil metabólitos sejam produzidos (FIEHN, 2002) e sua análise é restrita, devido à diversidade química e ampla faixa de concentração encontrada nas plantas (LEI et al., 2011; WECKWERTH, 2011).

O perfil metabólico de diferentes classes químicas pode ser investigado de forma simultânea através da metabolômica. Essa ciência através de técnicas analíticas como espectroscopia (UV-Vis, infravermelho médio, NMR), espectrometria de massa (MS), cromatografia (HPLC, GC) e técnicas combinadas (OLIVER et al., 1998), gera informação sobre centenas de compostos presentes na amostra. Dentre essas técnicas analíticas, a espectrometria de massas é uma das mais empregadas nos estudos metabolômicos, fornecendo informações estruturais de diversas classes químicas (de RAAD; FISCHER; NORTHEN, 2016). Atualmente, a combinação da cromatografia líquida (LC) e da espectroscopia de massa (MS) vem sendo cada vez mais aplicada nesses estudos (THEODORIDIS et al., 2012), devido à alta robustez, sensibilidade e seletividade (XIAYAN; LEGIDO-QUIGLEY, 2008). LC-MS é uma técnica abrangente no que se refere à classe de compostos a serem analisadas, à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa, interação hidrofílica e troca iônica (CANUTO et al., 2017). Dentre as formas de abordagem da metabolômica, é possível definir uma análise quantitativa ou qualitativa dos metabólitos (CANUTO et al., 2017). Segundo esses autores, nas formas quantitativa, a metabolômica é útil para a busca de um ou mais metabólitos pré-selecionados, de determinada classe química, ou que estejam associados a via metabólicas específicas (*target*). Já a análise qualitativa dos metabólitos, fundamenta-se no maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo e são chamadas de metabolômica global (*untargeted*). Uma outra abordagem se refere aos metabólitos excretados por uma célula em condições controladas e é conhecida como *footprinting* (ainda sem tradução para o português) (KELL et al., 2005).

Para gerar os dados relacionados aos metabólitos, a preparação das amostras é uma das etapas mais importantes por tratar-se de uma fase complexa e

que demanda maior tempo de trabalho (ÁLVAREZ-SÁCHEZ; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2010). Após essa etapa, a aquisição dos dados e o seu pré-processamento são importantes para o seu processamento e análise (FUKUSHIMA; KUSANO, 2013), já que os dados gerados pelas análises metabolômicas são abundantes e complexos. Por isso, ferramentas adequadas de tratamento de dados devem ser empregadas no seu processamento, para evitar erros e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas obtidas (SUGIMOTO et al., 2012), como a análise multivariada, a análise de componentes principais e a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos.

2.9 ANÁLISE MULTIVARIADA

A extração de informações dos resultados de um experimento com dados químicos envolve a análise de grande número de variáveis. Entretanto, frequentemente, apenas algumas variáveis contém as informações mais relevantes, e a maioria delas adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos (NETO; MOITA 1997). A análise estatística é frequentemente utilizada para extrair as informações relevantes dos dados, através de métodos de análise multivariada e univariada.

Nas análises multivariadas, a classificação e identificação de metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras são realizadas através da avaliação do conjunto da matriz de dados das amostras (CANUTO et al., 2017). Dentre os métodos quimiométricos utilizados para identificar as semelhanças e as diferenças identificadas nas amostras, métodos supervisionados e não supervisionados são utilizados para agrupá-las e classificá-las. Nos métodos supervisionados, as amostras analisadas pertencem a uma classe já pré-estabelecida e essa informação é utilizada para análise e classificação dos dados. Enquanto nos métodos não supervisionados, não existe informação prévia, portanto, deseja-se observar se há agrupamento entre as amostras de forma natural sem utilização de classes pré-estabelecidas (FERREIRA, 2016).

A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser obtida através da análise de componentes principais (ACP). Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma

combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o objetivo de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados (REGAZZI, 2000). Também é possível construir agrupamentos entre as amostras de acordo com suas similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representá-los de maneira bidimensional através de um dendrograma. De acordo com Neto e Moita (1997), a análise de componentes principais (ACP) e de agrupamento hierárquico (AH) são técnicas de estatística multivariada complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos.

2.9.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (ACP) é uma das ferramentas mais utilizadas na análise de dados multivariados, pela sua capacidade de reduzir linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si. Utilizando essa metodologia, é possível identificar e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações existentes entre elas. Esse conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas são chamadas de componentes principais (CP) conhecidas também como fatores ou autovetores e contém a maior parte da informação do conjunto original dos dados (HONGYU et al., 2016). Cada CP é responsável pela representação de um percentual da variância dos dados (HAIR et al., 2005). A primeira CP é a combinação linear dos dados com máxima variância, onde o percentual da variância é proporcional a quantidade de informação contida nessa componente. A segunda CP é a combinação linear com máxima variância perpendicular à primeira CP. Essa propriedade das componentes principais é denominada ortogonalidade e se cumpre em todas as combinações (FERREIRA et al., 2016).

Para análise das componentes principais, o procedimento matemático pode ser escrito com os dados dispostos numa matriz de dados originais X de n linhas correspondentes às amostras e p colunas, correspondente às variáveis (HONGYU et al., 2016). Para encontrar as componentes principais numa determinada análise, a matriz X dos dados é decomposta na combinação de duas outras matrizes, sendo T a matriz dos escores, P a matriz dos *loadings*, E a matriz

dos resíduos e q o número de componentes principais inclusas na análise que pode ser demonstrada na seguinte equação:

$$X_{n \times p} = T_{n \times q} \cdot P^{q \times p} + E_{n \times p}$$

Os escores estão relacionados com a distribuição das amostras ao longo das CPs e os *loadings*, representam o peso de cada variável dentro de determinada componente e como este determina a formação de grupos no gráfico dos escores. Por exemplo, os *loadings* positivos de uma determinada componente são associados aos escores positivos das CPs e os *loadings* negativos aos escores negativos (MILLER; MILLER, 2018).

2.9.2 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS POR MÉTODOS HIERÁRQUICOS

A análise hierárquica é outra maneira não supervisionada para reconhecimento de padrões e consiste na análise de agrupamentos (*cluster analysis*), que interligam as amostras por suas associações. Desses agrupamentos é formado um dendrograma, que, segundo as variáveis escolhidas, agrupa as amostras semelhantes entre si, em uma mesma classe, ou dependendo do objetivo da análise, detecta e, pode agrupar amostras com comportamento diferente do conjunto de dados (FERREIRA et al., 2016).

Como a análise hierárquica é um método aglomerativo, ou seja, cada amostra representa um grupo separado e, admitindo que amostras próximas no espaço multidimensional possuem características semelhantes, a semelhança de uma amostra com outra, pode ser obtido por um cálculo da distância entre as duas amostras (NETO; MOITA, 1997).

Essa distância representa o grau de similaridade entre as amostras, e quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre elas. Esse cálculo é repetido até finalizar o conjunto de amostras totais, formando um dendrograma, que irá representar a estrutura hierárquica dos dados. A separação para identificar os grupos formados através do dendrograma, pode ser realizada pelo comprimento dos ramos formados no gráfico hierárquico representando a distância euclidiana entre os grupos, ou entre o índice de similaridade entre os dados, na qual, é realizado a normalização dos dados eliminando a escala como medida.

ARTIGO 1 – EFEITO DO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS DAS CULTURAS DA SOJA, MILHO E ALGODÃO E DE *Spodoptera frugiperda* ALIMENTADAS NESSAS CULTURAS

INTRODUÇÃO

Áreas de cultivo com sucessão de monoculturas (principalmente soja, milho e algodão), favorece populações de artrópodes, sobretudo, a dos herbívoros polípagos, devido à oferta contínua de alimento. Dentre elas, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida popularmente como a lagarta-do-cartucho, é uma praga altamente polífaga, capaz de se alimentar em mais de 80 espécies de plantas, incluindo soja, milho e algodão (POGUE, 2002; CAPINERA, 2008). No Brasil, a disponibilidade de plantas hospedeiras ao longo do ano, tem causado sérios problemas ao sistema produtivo devido à migração de pragas entre culturas próximas, observando-se um aumento anual das suas infestações (BUSOLI et al., 2011).

Dentre as principais técnicas de manejo de insetos-praga, a utilização de plantas geneticamente modificadas tem se mostrado uma ferramenta eficaz no controle de pragas agrícolas (BERNARDI et al., 2011). Essas plantas possuem genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner e produzem proteínas inseticidas Cry que a partir da ingestão, agem no intestino dos insetos, fazendo controle da praga-alvo. No entanto, a presença da mesma proteína em soja, milho e algodão Bt contribui para o aumento da pressão de seleção de populações de noctuídeos resistentes a essa tática de controle. Com isso, o conhecimento da dinâmica populacional dos insetos é importante, principalmente para aqueles que são praga-alvo de mais de uma cultura. Isso porque, é possível ocorrer a resistência cruzada dos insetos para Cry1Ac e Cry1Ab por exemplo, por essas proteínas atuarem nos mesmos receptores da membrana do intestino médio das lagartas (FERRÉ; VAN RIE, 2002).

As plantas são conhecidas por possuírem metabólitos secundários característicos de sua família, e esses podem ser utilizados como proteção contra herbívoros, patógenos, entre outros (OPITZ; MÜLLER, 2009). Muitos insetos se adaptaram a este mecanismo de defesa e utilizam esses compostos sintetizados pela planta, ingerindo-os e armazenando-os em seus tecidos ou tegumentos

corporais. Tal sequestro de metabólitos pode aumentar a defesa dos insetos contra os inimigos naturais e também pode estar envolvido no comportamento reprodutivo.

A determinação de compostos químicos presentes no corpo do adulto do inseto permite determinar a planta hospedeira consumida pelo inseto em sua fase larval (ORTH; HEAD; MIERKOWSKI, 2007). Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo determinar o solvente extrator mais adequado para a extração dos metabólitos secundários de folhas de soja, milho e algodão; e verificar a ocorrência de sequestro desses compostos por adultos de *S. frugiperda* alimentadas nessas culturas durante sua fase larval.

Os resultados obtidos com esse estudo devem fornecer bases importantes para o entendimento da dinâmica espacial dos lepidópteros-praga, e para fundamentar táticas de manejo, principalmente o manejo de resistência das plantas Bt.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados na extração foram de grau analítico: hexano (Honeywell HPLC), metanol (Honeywell), diclorometano (Synth PA), acetonitrila (Honeywell) e água ultrapura (Milli-Q®). Os experimentos foram realizados no laboratório de Ecologia Química e na casa de vegetação da Embrapa Soja (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada em Londrina, Paraná. O delineamento foi o inteiramente casualizado.

A casa de vegetação onde foi realizado o cultivo das plantas (soja, milho e algodão) foi mantida em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 h. As cultivares de soja e algodão e o híbrido de milho foram selecionados por tratar de genótipos não transgênicos e, por representarem os materiais mais semeados no Brasil, na safra 2015/2016, quando os experimentos foram iniciados.

CULTIVO DA SOJA

Para detectar os metabólitos secundários em lepidópteros, primeiramente, foi cultivado o genótipo de soja 'BRS 284'. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de cinco litros. Foram semeadas 10

sementes por vaso, deixando-se após desbaste, apenas cinco plantas. Para garantir alimento durante todo o desenvolvimento do inseto, foram realizados três plantios de forma escalonada (semanal), com dez vasos em cada plantio. Após atingirem estágio vegetativo V6 (FEHR; CAVINESS, 1977), os trifólios foram coletados e a assepsia das folhas foi realizada com uma diluição de 5% de solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO 2,5%), por 5 minutos. Na sequência, as folhas foram enxaguadas com água e a base do pecíolo enrolado com um algodão úmido para evitar ressecamento da folha para então ser oferecida à lagarta.

CULTIVO DO MILHO

Para avaliar a assimilação dos metabólitos secundários por *S. frugiperda*, foi utilizado o híbrido de milho Ag 9010 com 15 repetições. Foram semeadas cinco sementes por vaso, em vasos plásticos com capacidade de sete litros, mantendo após desbaste, apenas duas plantas por vaso. Após 30 dias da data do plantio, as folhas de milho foram coletadas e a assepsia das folhas realizada da mesma forma que as folhas de soja. Na sequência, essas foram enxaguadas, cortadas em pedaços menores e foi enrolado algodão úmido para evitar ressecamento da folha para então ser oferecida à lagarta.

CULTIVO DO ALGODÃO

Para o cultivo do algodão, foram semeadas oito sementes por vaso do genótipo 'FMT 701' em vasos plásticos com capacidade de cinco litros. Após o desbaste foram mantidas, apenas quatro plantas por vaso. Para garantir alimento durante todo o desenvolvimento do inseto, foram realizados quatro plantios de forma escalonada (semanal), com quinze vasos em cada plantio. Após apresentar a 6ª folha expandida, estas foram coletadas e a assepsia das folhas realizada com uma diluição de 5% de solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO 2,5%), por 5 minutos. Na sequência, as folhas foram enxaguadas e a base enrolada com um algodão úmido para evitar ressecamento da folha e oferecida a lagarta.

DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS

As lagartas utilizadas para o bioensaio foram provenientes da criação massal de insetos da Embrapa Soja, mantidas em B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$, 14 h). Essas foram mantidas agrupadas até atingirem o 3^o instar, quando, para evitar canibalismo, foram individualizadas, em potes plásticos de 200 mL. Observou-se diariamente a necessidade de manutenção e troca de alimento até a lagarta atingir a fase de pupa.

ANÁLISE QUÍMICA DOS COMPOSTOS SEQUESTRADOS PELOS INSETOS

Após emergência, os adultos foram armazenados em microtubo (Eppendorfs) de 2 mL no ultrafreezer (-80°C). Para preparo das mariposas, foram selecionados 20 espécimes, alimentadas com soja, milho e algodão. A seguir, retirou-se suas asas e pernas e, o restante do corpo (tórax e abdomen) foi imerso em um Becker com 30 mL de hexano durante 30 minutos. Tal procedimento foi realizado mais duas vezes para remoção de possíveis lipídeos presentes no corpo do inseto. Posteriormente, foram mantidas em capelas de exaustão, durante três horas para evaporação do hexano e então armazenadas em ultrafreezer (-80°C). A seguir, foram acondicionados em liofilizador Liotop L101 (Figura 5), e após 24 h, foram moídas em almofariz e pistilo.

Para verificar o solvente extrator mais adequado para a extração de metabólitos da soja, milho e algodão presentes no extrato do inseto foi realizado um teste de solventes. Para isso, três sistemas solventes foram escolhidos, sendo eles: MeOH:H₂O (4:1), MeOH:ACN:H₂O (2:2:1) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (3:1:1) (Tabela 1). Do extrato bruto moído, foram pesadas três repetições para cada sistema solvente (± 25 mg cada), totalizando nove extratos para cada cultura. Adicionou-se então 400 μL de cada solvente extrator, foi realizada a homogeneização utilizando-se vortex (Lab-dancer, IKA) por 10 segundos e colocado em ultrassom (LSUC2-500-22,5, Logen Scientific) por 25 minutos. O sobrenadante foi seco em fluxo de nitrogênio e pesado em balança analítica (AG 285 Mettler Toledo, Greifensee, Langacher, Swizerland). Para ressolubilização, foi adicionado 200 μL da fase móvel, homogeneizado em vortex por 10 segundos, e submetido a ultrassom por cinco

minutos. Na sequência, as amostras foram filtradas (PVDF de 0.22 μm , Millipore®) e transferidas para um vial específico para injeção no cromatógrafo para análise.



Figura 5. Equipamento Liotop L101 utilizado para liofilizar o corpo do inseto.

Tabela 1. Sistema de solventes utilizado para extração de folhas das culturas da soja, milho e algodão e mariposas da espécie *Spodoptera frugiperda*.

| Solvente | Proporção | Abreviação |
|--|-----------|------------|
| MeOH:H ₂ O | 4:1 | S1 |
| MeOH:ACN:H ₂ O | 2:2:1 | S2 |
| MeOH:CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O | 3:1:1 | S3 |

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS

As plantas utilizadas para a identificação dos metabólitos secundários foram cultivadas nas mesmas condições (temperatura, umidade e fotoperíodo) das plantas utilizadas para o desenvolvimento dos insetos. Após a expansão do 6º trifólio, este foi coletado em nitrogênio líquido, e as folhas, moídas

com pistilo e almofariz em nitrogênio líquido. Os extrato de folhas foram pesadas (± 100 mg) para cada sistema solvente em *vial dram* e armazenado em freezer (-20°C) até o momento de utilização. Das frações de extrato pesadas, adicionou-se $1500\ \mu\text{L}$ de cada solvente extrator (Tabela 1), homogeneizando em vortex por 10 segundos e submetido ao ultrassom por 25 minutos. O sobrenadante foi seco em fluxo de nitrogênio e a massa foi medida em balança analítica. Para ressolubilização, foi adicionado $200\ \mu\text{L}$ da fase móvel, homogeneizado em vortex por 10 segundos, e colocado em ultrassom por cinco minutos para então, serem filtradas e transferidas para um vial específico do LC-MS.

CONDIÇÕES DE ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS

A identificação dos metabólitos secundários de folhas e mariposas foi realizada no Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas – Labiomass da Universidade Estadual de Maringá (UEM), utilizando um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Nexera, Japão). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters, EUA, $1,7\ \mu\text{m}$, com $2.1\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$) a 40°C com fluxo de $0,250\ \text{mL min}^{-1}$. As fases móveis foram compostas por fase A (H_2O) e fase B (acetonitrila) ambas acidificadas com $0,1\%$ de ácido fórmico (v:v) e o gradiente utilizado foi conforme descrito na Tabela 2. As corridas cromatográficas foram de 20 minutos, sendo os quatro minutos finais, destinados à restauração da coluna para a próxima amostra.

Tabela 2. Gradiente de eluição das fases móveis com os solventes A (H_2O) e B (Acetonitrila) utilizados na separação dos extratos de folhas de soja, milho e algodão; extratos de adultos de *Spodoptera frugiperda* alimentados nas culturas.

| Etapa | Tempo (min) | Solvente A (vol %) | Solvente B (vol %) |
|-------|-------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 0 – 1 | 95 | 5 |
| 2 | 1 – 12 | 30 | 70 |
| 3 | 12 – 16 | 2 | 98 |
| 4 | 16 – 20 | 95 | 5 |

As análises de MS/MS foram realizadas em um espectrômetro de

massas de alta resolução Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) de geometria Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI) (Figura 6). O equipamento foi calibrado utilizando uma solução de formiato de sódio (solução de 10 mmol L⁻¹ em solução de isopropanol:água 1:1 (v:v) contendo 50 µL de ácido fórmico concentrado). A fonte de ionização foi ajustada no modo positivo de ionização (ESI+), com espectros adquiridos sobre uma faixa de massa de *m/z* 50 a 1800. Os parâmetros para ESI foram: tensão capilar = 4,5 kV com potencial de *end plate offset* -500 V; temperatura do gás de secagem = 180°C; fluxo de gás de secagem = 8,0 L min⁻¹ e pressão de nebulização do gás = 4 bar. Os cinco íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto MS/MS). Os dados da MS foram processados através do software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).



Figura 6. Equipamento UHPLC acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II utilizado para identificação de metabólitos.

PROCESSAMENTO DOS DADOS

Para realização do processamento de dados foi utilizado o programa computacional Statistica 7.0 para análise exploratória dos dados utilizando o método de análise de componentes principais e análise hierárquica (STATSOFT, 2007). Os gráficos dos *loadings* foram gerados usando o programa Origin Pro 8. O software R 3.5.1 (R Development Core Team, 2018) foi utilizado para realizar as contagens de

íons e separação dos mesmos conforme o solvente e a cultura que foram analisados para o diagrama de Venn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à grande quantidade de informação obtida nos testes de solvente, métodos de análise multivariada são ferramentas úteis para análise exploratória dos dados, auxiliando a filtrar as informações relevantes contidas no conjunto original de variáveis, em conjuntos de menores dimensões, sem perda de informação. Desse modo, neste trabalho serão apresentados resultados de pesquisa envolvendo a aplicação da química analítica na área de metabolômica de plantas e insetos, visando a caracterização de metabólitos das culturas da soja, milho e algodão que possam ser utilizados como possíveis biomarcadores e a verificação do sequestro dos mesmos por *S. frugiperda*.

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DE FOLHAS DE SOJA, MILHO E ALGODÃO

Com o objetivo de verificar os metabólitos característicos de cada cultura (soja, milho e algodão) e a capacidade extratora dos solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3), uma investigação composicional dos compostos extraídos nas diferentes culturas foi realizada. Na Figura 7 é apresentada os cromatogramas dos extratos de soja, milho e algodão extraídos nos diferentes solventes.

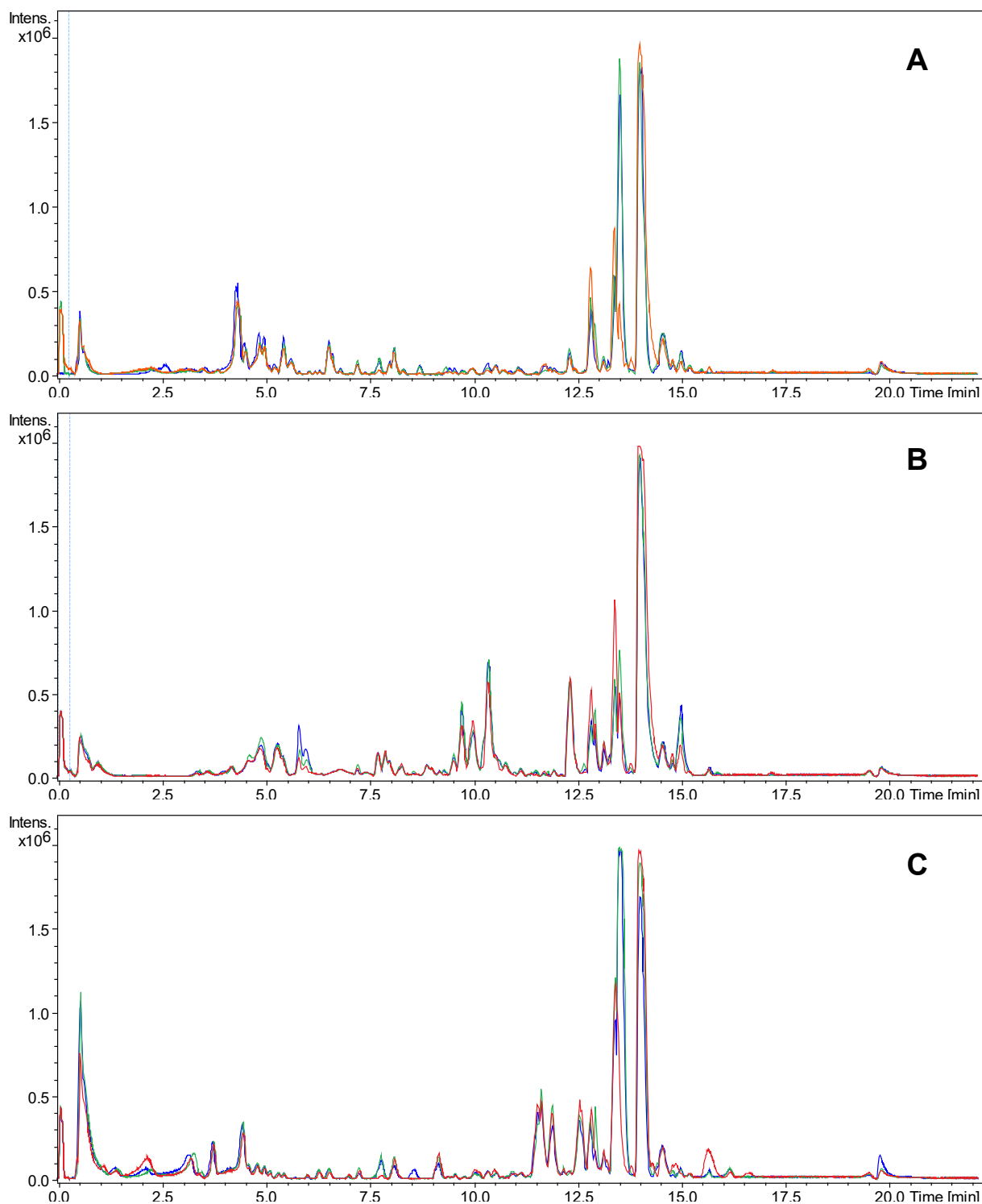


Figura 7. Cromatogramas obtidos das amostras de folha de A- soja, B- milho e C- algodão extraídas com os solventes MeOH:H₂O (azul), MeOH:ACN:H₂O (verde) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (vermelho).

Devido à dificuldade na visualização dos resultados obtidos, os valores dos íons dos espectros obtidos foram submetidos ao método multivariado pela análise de componentes principais (ACP). Para pré-processamento, os dados

foram padronizados por autoescalonamento. A matriz foi composta por 27 amostras que apresentaram 8.902 variáveis. As três componentes principais obtidas explicam 77,22% (CP1), 11,90% (CP2) e 6,53% (CP3) da variância total contida nos dados (Tabela 3). Segundo Rencher (2002), pelo menos 70% da variância total dos dados deve ser explicada pelas duas primeiras componentes principais. Neste trabalho, esse valor foi atingido com 89,12% na CP1 e CP2, a qual, essas fornecem informações da variação da composição química, importantes para a discriminação das culturas analisadas. Isso indica que realizar combinações lineares das variáveis originais de tal forma a agrupar as que fornecem informações semelhantes é importante pois, assim, é possível obter correlações significativas em um número menor de novas variáveis capazes de descrever aproximadamente toda a informação contida nos dados originais (FERREIRA et al., 2016).

Tabela 3. Componentes principais (CPs), autovalores (λ_i) e porcentagem da variância explicada, autovalor acumulado e proporção acumulada (%) pelas componentes.

| Componente Principal | Autovalor | Variância (%) | Autovalor Acumulado | Cumulativo (%) |
|----------------------|-----------|---------------|---------------------|----------------|
| CP1 | 20,84824 | 77,21572 | 20,84824 | 77,21572 |
| CP2 | 3,21234 | 11,89755 | 24,06058 | 89,11327 |
| CP3 | 1,76404 | 6,53349 | 25,82462 | 95,64675 |

* λ_i correspondem as variâncias representadas em cada eixo

Os gráficos dos escores para o sistema solvente e culturas são apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Analisando a Figura 8, no gráfico dos escores positivos da CP1 x CP2 é possível observar que os sistemas solventes MeOH:H₂O (S1) e MeOH:ACN:H₂O (S2) ficaram agrupados, indicando discriminação em relação ao sistema solvente MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3). A análise de componentes principais é utilizada para agrupar os indivíduos de uma população conforme a variação de suas características (HONGYU et al., 2016). Com isso, a separação gráfica dos extratos pode ter ocorrido devido às semelhanças nas propriedades das amostras e às suas interações com o solvente extrator. Quando comparamos os dados da Figura 9 em conjunto, podemos verificar que os três grupos formados com os solventes (Figura 8), são os mesmos formados das culturas

avaliadas. Isso significa que existem diferenças das amostras quanto ao solvente extrator utilizado e uma maior discriminação do extrato preparado em mistura com diclorometano, em relação à quantidade de compostos dos diferentes grupos funcionais extraídos. Ao analisar a projeção das amostras levando em consideração o solvente e a cultura testados, os grupos se apresentam bem distintos. A primeira componente principal, neste caso, discriminou os grupos da soja e do milho extraídos com o sistema solvente 1 e 2, enquanto que a segunda componente principal, descreveu a variabilidade dos dados de algodão.

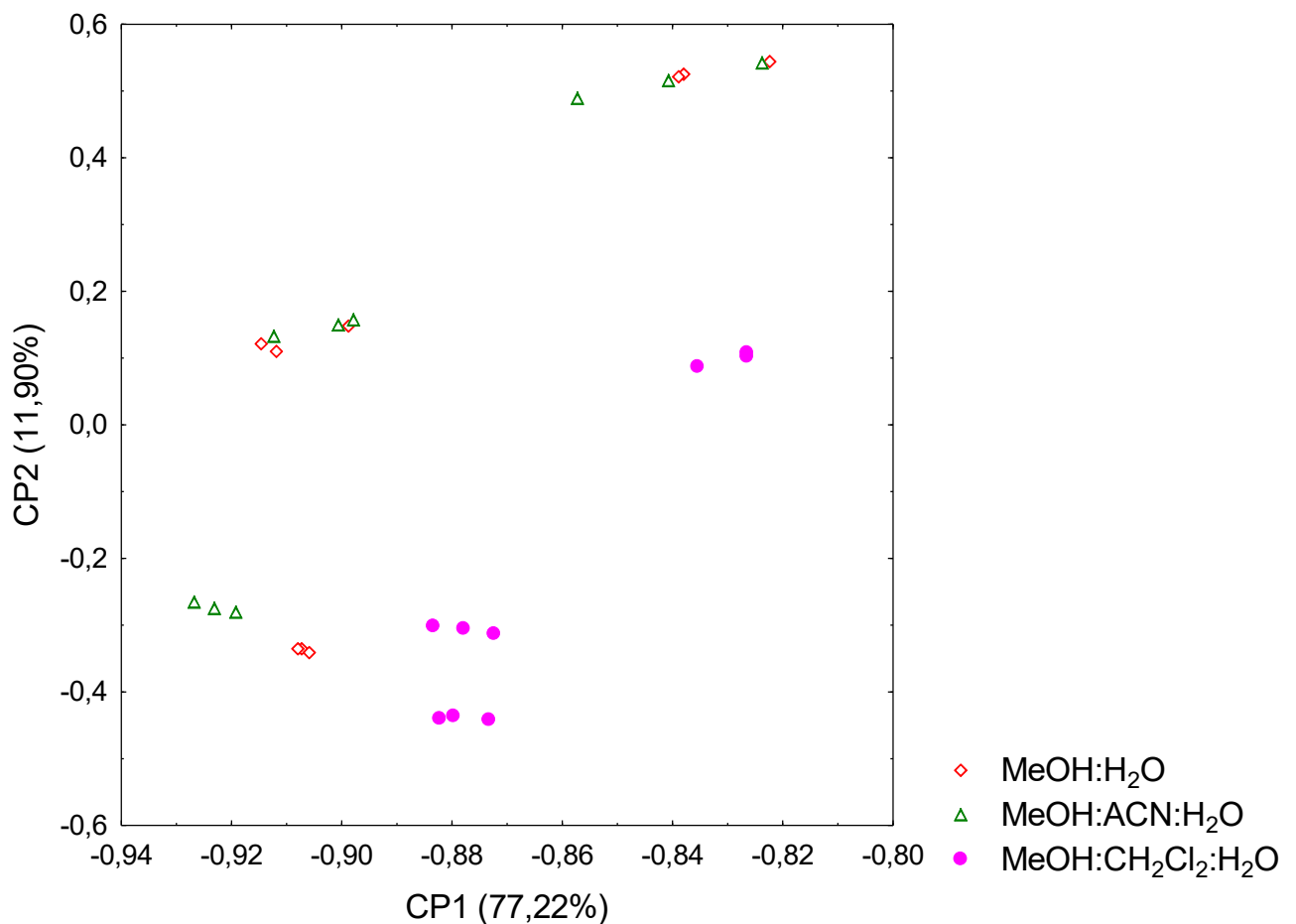


Figura 8. Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais mostrando a variabilidade entre os solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3) na extração de íons das culturas do algodão, milho e soja.

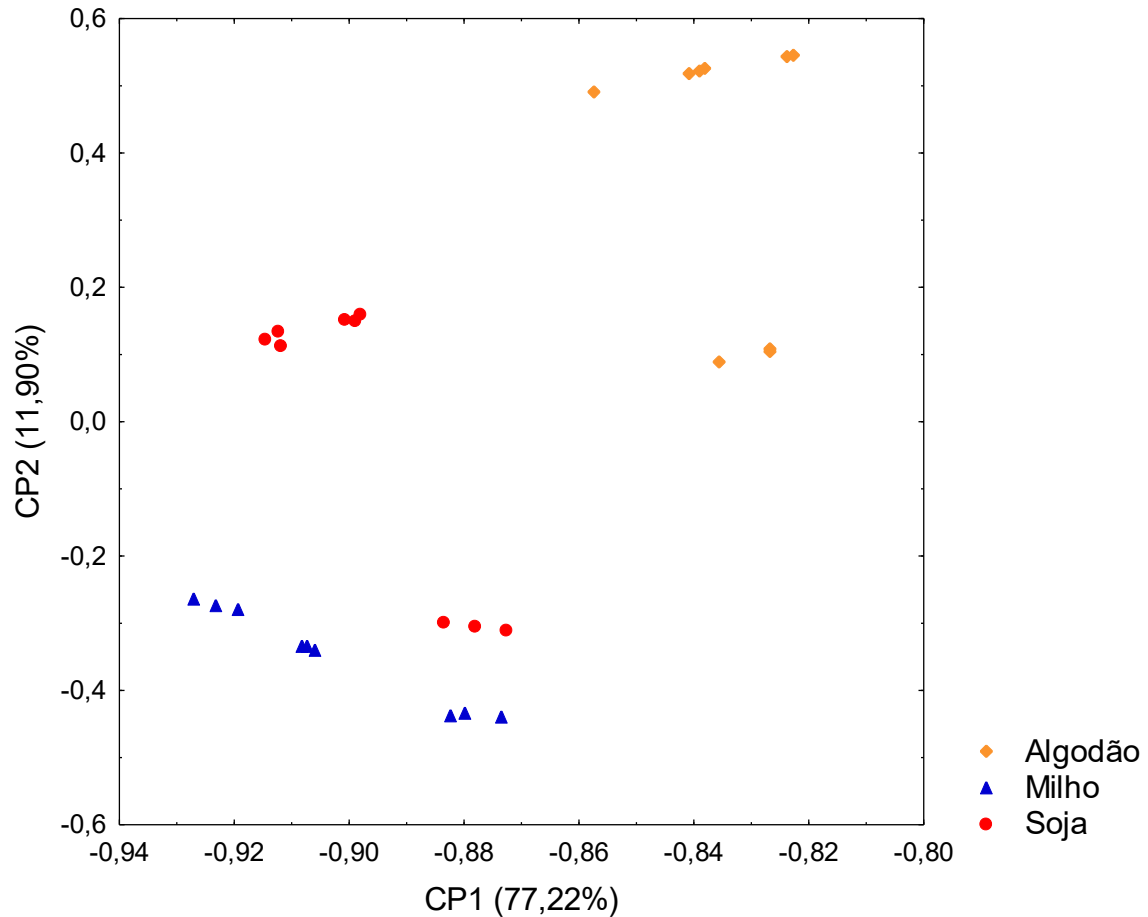


Figura 9. Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais mostrando a variabilidade entre os íons das culturas do algodão, milho e soja extraídos em diferentes solventes extratores MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3).

Após a determinação dos fatores significativos, é necessário interpretar a sua natureza química. Para isso, as Figuras 10 e 11 mostram o gráfico dos *loadings* da CP1 e CP2 respectivamente, que permite distinguir os grupos formados na ACP devido à intensidade dos íons observados conforme o tempo de retenção (minutos). Foram consideradas como relevantes as cargas que apresentaram valor superior ou igual a 0,5 ou -0,5.

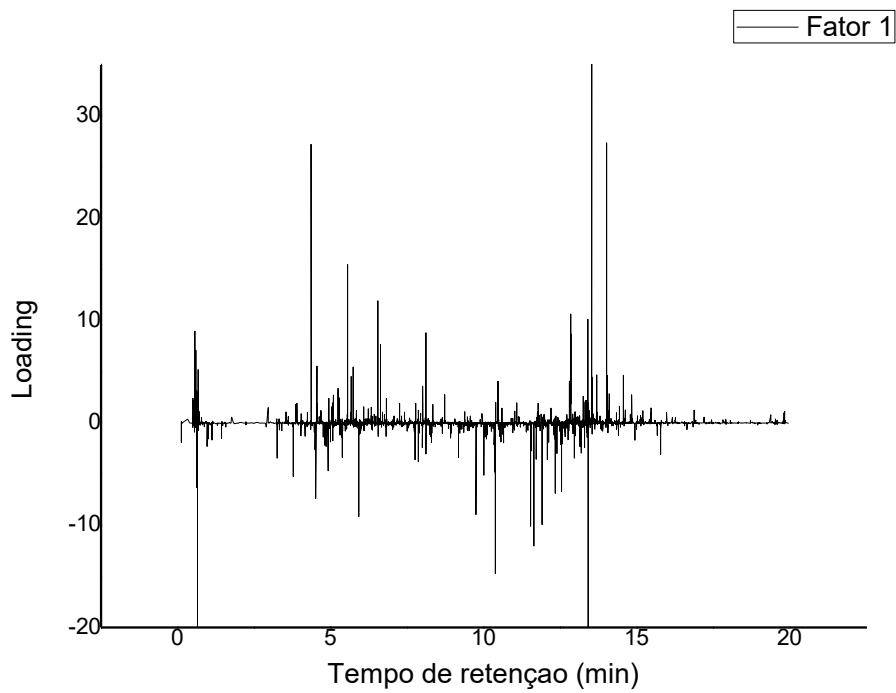


Figura 10. Gráfico dos *loadings* dos cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS da CP1 conforme seu tempo de retenção (minuto).

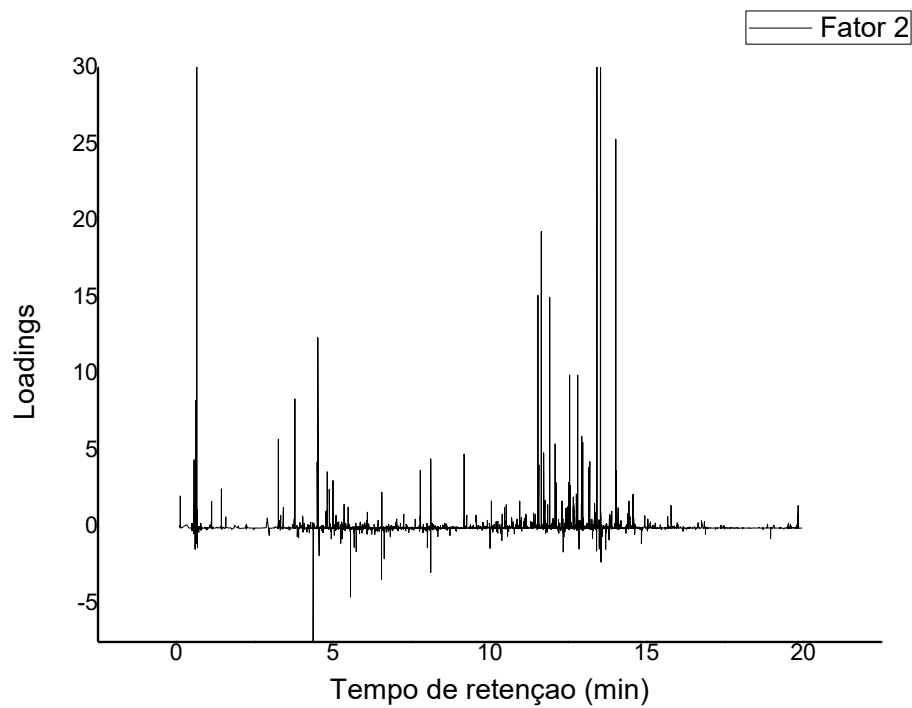


Figura 11. Gráfico dos *loadings* dos cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS da CP2 conforme seu tempo de retenção (minuto).

Na Tabela 4 encontram-se os autovalores (pesos, *loadings* ou coeficientes das componentes principais) para cada tratamento analisado. Pode-se observar que todos os tratamentos analisados em CP1, influenciaram para separação da primeira componente principal, estando representados nos escores negativos da ACP. Em relação à CP2, houve uma separação das amostras de algodão, que estão apresentadas nos escores positivos da ACP, enquanto as amostras de milho nos escores negativos. Ainda na CP2, foi possível observar uma separação das amostras de soja extraídas com MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3) com os demais solventes. Isso pode ser explicado devido MeOH:H₂O (S1) e MeOH:ACN:H₂O (S2) possuírem polaridades semelhantes. Os maiores pesos estão representados com os valores destacados em negrito.

Tabela 4 – Contribuição dos escores através da combinação dos tratamentos cultura x solvente analisados nas CP's.

| Amostra | CP1 | CP2 | CP3 |
|-----------------------|-----------------|------------|------------|
| FA S1 R1 ¹ | -0,83815 | 0,525469 | -0,040474 |
| FA S1 R2 | -0,83897 | 0,522387 | -0,097445 |
| FA S1 R3 | -0,82258 | 0,545450 | -0,109664 |
| FA S2 R1 | -0,85733 | 0,490354 | -0,099286 |
| FA S2 R2 | -0,82383 | 0,542737 | -0,093467 |
| FA S2 R3 | -0,84074 | 0,517523 | -0,096425 |
| FA S3 R1 | -0,83563 | 0,088117 | -0,518090 |
| FA S3 R2 | -0,82669 | 0,108690 | -0,531691 |
| FA S3 R3 | -0,82666 | 0,104035 | -0,529875 |
| FM S1 R1 | -0,90728 | -0,335161 | 0,020094 |
| FM S1 R2 | -0,90812 | -0,334043 | 0,024572 |
| FM S1 R3 | -0,90590 | -0,339418 | 0,011306 |
| FM S2 R1 | -0,92318 | -0,274370 | 0,081083 |
| FM S2 R2 | -0,92697 | -0,265079 | 0,088048 |
| FM S2 R3 | -0,91926 | -0,279213 | 0,081816 |
| FM S3 R1 | -0,87343 | -0,440578 | -0,131449 |
| FM S3 R2 | -0,88227 | -0,437782 | -0,122377 |
| FM S3 R3 | -0,87994 | -0,434613 | -0,111163 |
| FS S1 R1 | -0,91186 | 0,111967 | 0,338851 |
| FS S1 R2 | -0,91463 | 0,122498 | 0,352944 |
| FS S1 R3 | -0,89898 | 0,149067 | 0,384077 |
| FS S2 R1 | -0,91233 | 0,133890 | 0,353068 |
| FS S2 R2 | -0,89789 | 0,158900 | 0,382117 |
| FS S2 R3 | -0,90076 | 0,150645 | 0,376714 |
| FS S3 R1 | -0,87805 | -0,304607 | -0,069272 |
| FS S3 R2 | -0,87255 | -0,311762 | -0,080413 |
| FS S3 R3 | -0,88346 | -0,299470 | -0,059907 |

¹ Amostras de folha (F) de algodão (A), milho (M) e soja (S); Solventes (S) MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3); e Repetições (R) 1, 2 e 3.

Na análise hierárquica realizada nos diferentes extratos foliares, mostrou que o índice de similaridade entre as culturas varia conforme o solvente extrator utilizado. A cultura da soja por exemplo, é mais similar com a cultura do milho quando extraídas com o sistema solvente 3 (Figura 12). Essa proximidade observada entre as folhas de soja quando extraídas com sistema solvente 3 e à cultura do milho, provavelmente sejam devido à classes de compostos similares, já que formam um agrupamento com esta cultura. Já a cultura do algodão, é possível observar um índice de similaridade da cultura independente do solvente extrator utilizado.

Uma segunda separação foi observada devido aos diferentes solventes testados para essas cultura. A mistura MeOH:H₂O e MeOH:ACN:H₂O possivelmente extraíram classes de compostos parecidos devido à sua polaridade, que são observados pela separação desses dois solventes com o sistema solvente MeOH:CH₂Cl₂:H₂O em todas as culturas analisadas.

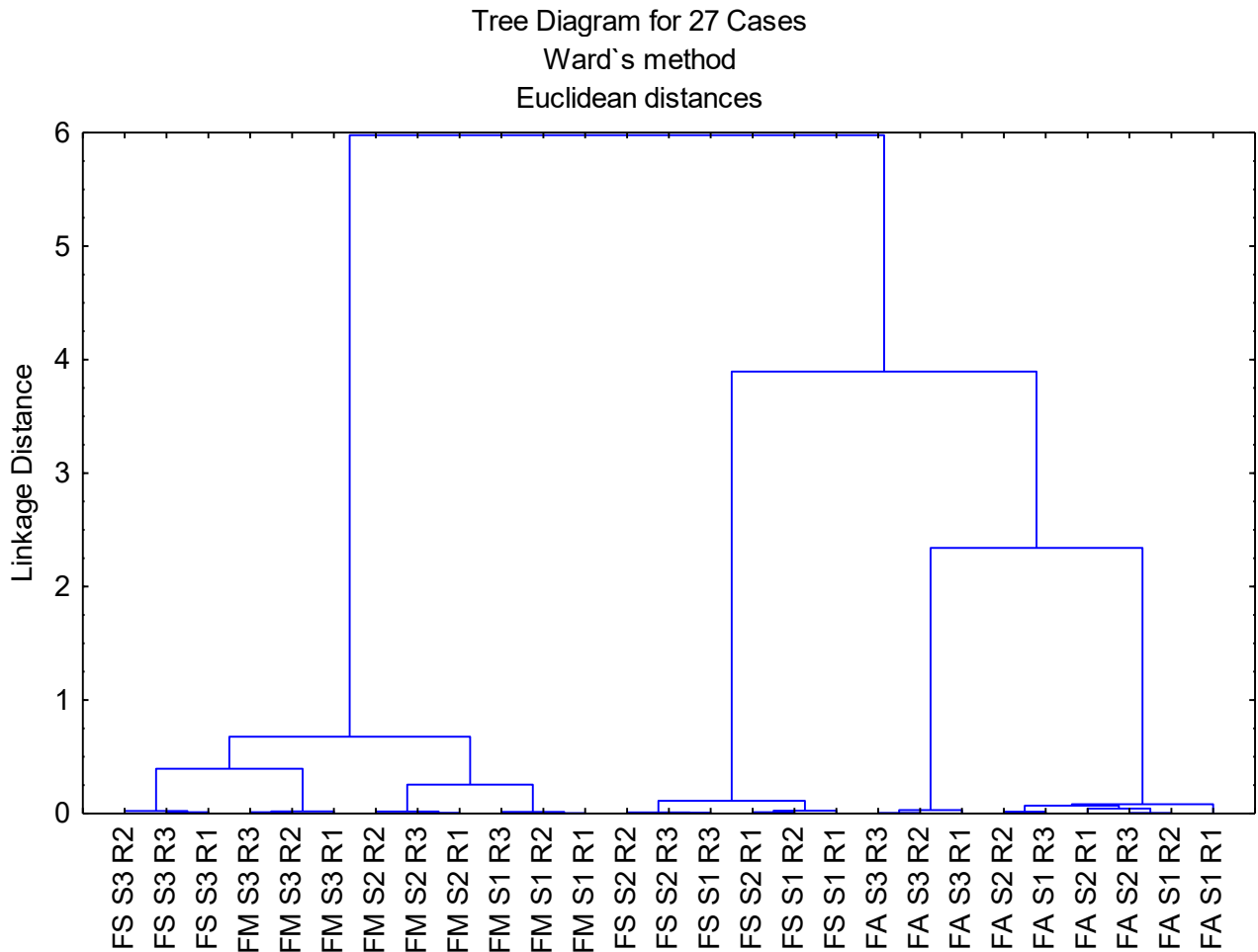


Figura 12. Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica dos dados de extratos de folhas de soja (S), milho (M) e algodão (A); solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH: CH₂Cl₂:H₂O (S3) e repetições das amostras (R).

A utilização do gráfico dos *loadings* traz informações dos íons que mais influenciaram para separação gráfica da ACP, trazendo todas as informações relevantes, independente da cultura ou solvente testados. No entanto, como o objetivo deste trabalho é identificar uma substância discriminatória e exclusiva de cada cultura avaliada, foi utilizado o diagrama de Venn. Essa ferramenta separa os íons comuns e incomuns aos diferentes solventes. O diagrama de Venn é representado com interseções e sobreposição das partes dos círculos, apresentando informações contidas nos conjuntos de dados e são chamados de silogismos (SANDIFER, 2007). Por exemplo, em relação aos dados referentes às amostras de

soja, pode ser observado que 308 íons são comuns ao S1 e S2; 116 são comuns aos S2 e S3; e 75 ao S1 e S3. Enquanto, um número maior de íons é comum aos três sistemas solventes, 1.126 (Figura 9).

No presente trabalho, o diagrama de Venn mostrou o total de íons obtidos nas três culturas sendo 2.169, em soja, 2.410, em milho e 2.363 em algodão (Figura 13). As propriedades químicas dos diferentes solventes testados, são capazes de extrair diferentes classes de compostos. Na mistura MeOH:H₂O (S1), 266 compostos específicos das folhas de soja, enquanto o solvente MeOH:ACN:H₂O (S2), extraiu 117 e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3), 161. Já na cultura do milho, observou-se com o S1, 145 compostos exclusivos do milho, o S2, 309 e o S3, 209. Por último, nas folhas de algodão 167 íons exclusivos para S1, 114 para S2 e 266 para S3. De maneira geral, não foi possível determinar qual o solvente extrator que forneceu maior quantidade de informação em apenas um solvente para as três culturas, já que, para soja, o extrator mais efetivo em termos de quantidade de íons obtidos foi com solvente 1; milho foi o solvente 2; e no algodão, sistema de solvente 3.

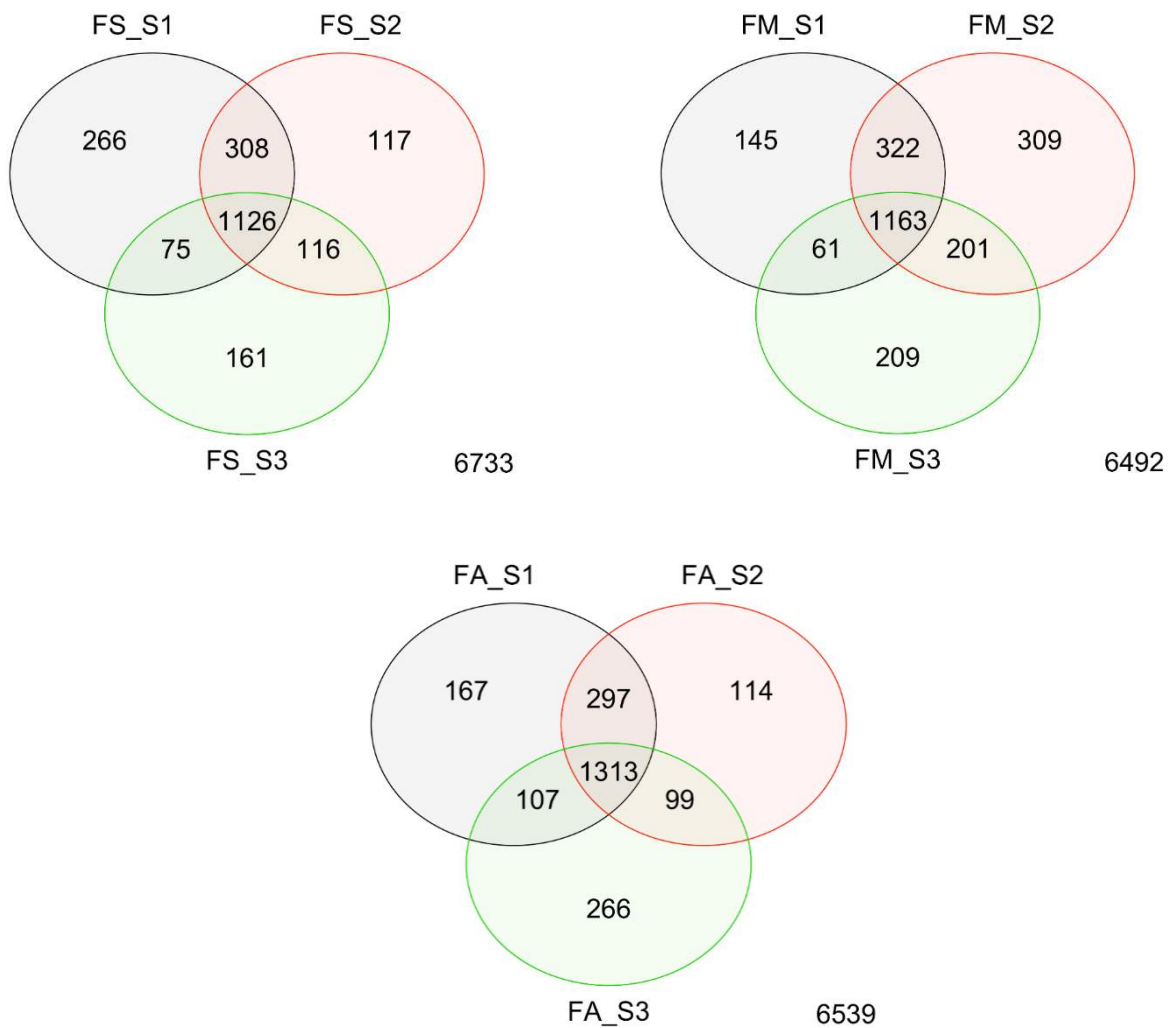


Figura 13. Diagrama de Venn representando o total de íons detectados nos extratos foliares da cultura da soja (FS), milho (FM) e algodão (FA). Os íons estão separados por cultura e solvente extrator, com os íons em comuns representados nas intersecções.

A partir do diagrama de Venn, foi possível observar os íons identificados exclusivos de cada cultura (Figura 13). No gráfico dos *loadings* apresentado nas Figuras 10 e 11, o peso de cada variável no conjunto de dados é representado, no caso, os íons que influenciaram na separação gráfica da ACP. Associando essas informações, é possível buscar por íons que influenciaram no gráfico dos *loadings* e identificá-los no diagrama de Venn. Dessa forma, a busca por uma substância com alto peso discriminatório e exclusiva da cultura da soja, milho e algodão se torna possível utilizando essas duas ferramentas estatísticas. Os íons foram identificados conforme os dois fatores utilizados na componente principal. Na

ACP dos extratos foliares (soja, milho e algodão), a CP1 e CP2 foram consideradas, com a componente 1 observou-se 93 íons com *loadings* maiores ou iguais a 0,5 e - 0,5. Desses íons, 36 foram observados apenas na cultura do algodão e 12 em soja. Ao analisar a componente 2, o número de *loadings* foi de 282 íons. Desses, 33 foram detectados apenas em soja, 33 em algodão e 41 em milho. De modo geral, os três sistemas solventes testados foram eficientes na extração das folhas, sendo a próxima etapa do trabalho, buscar pela identificação desses compostos de interesse através da sua fragmentação (MS/MS).

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SEQUESTRADOS POR *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Nas análises cromatográficas dos extratos do corpo de adultos de *S. frugiperda* alimentadas nas culturas da soja, milho e algodão também foi avaliada a capacidade extratora dos solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3). Na Figura 14 é apresentada os cromatogramas dos extratos de *S. frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão e extraídos nos diferentes solventes.

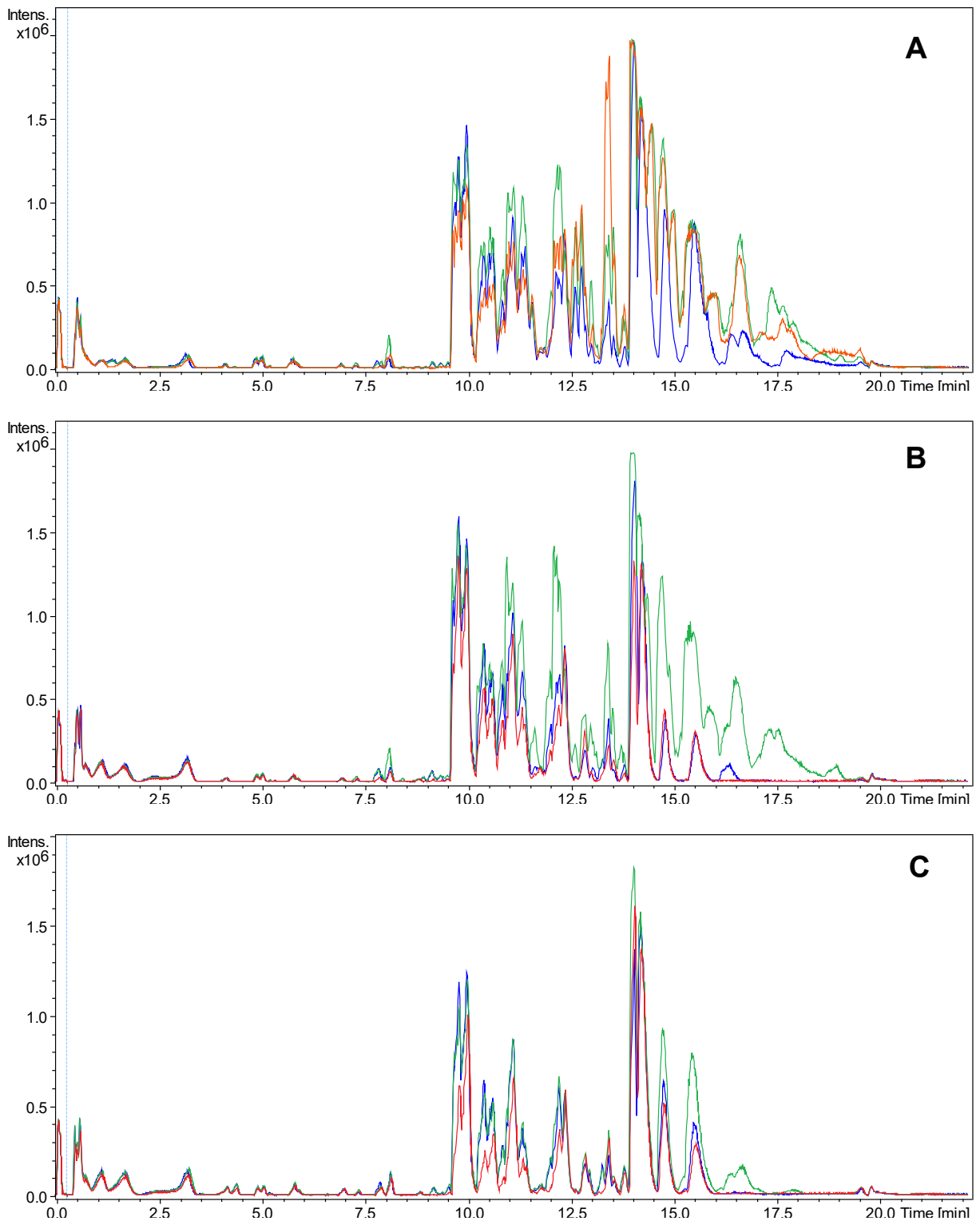


Figura 14. Cromatogramas obtidos após injeção de extratos do corpo de adultos de *Spodoptera frugiperda*, cujas lagartas foram alimentadas com folhas de soja (A), milho (B) e algodão (C). As extrações dos metabólitos do corpo dos adultos de *S. frugiperda* foram realizadas com os solventes MeOH:H₂O (azul), MeOH:ACN:H₂O (verde) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (vermelho).

Os dados obtidos na análise dos extratos do corpo de adultos de *S. frugiperda* também foram submetidos à uma análise de componentes principais. A matriz para esta análise foi composta por 27 amostras e 1.007 variáveis e os dados foram padronizados para um pré-processamento. Na Tabela 5 está apresentada a distribuição da variância entre as componentes principais. Ao analisar os autovalores, foi observado que as informações discriminatórias estão contidas nas duas primeiras CPs, sendo assim, foi considerado para este trabalho informações até a segunda componente principal. A CP1 foi responsável por quase toda variância dos dados (88,51%), totalizando com a CP2 95,16% de escore.

Tabela 5. Componentes principais (CPs), autovalores (λ_i) e porcentagem da variância explicada, autovalor acumulado e proporção acumulada (%) pelas componentes.

| Componente Principal | Autovalor | Variância (%) | Autovalor Acumulado | Cumulativo (%) |
|----------------------|-----------|---------------|---------------------|----------------|
| CP1 | 23,89746 | 88,50912 | 23,89746 | 88,50912 |
| CP2 | 1,79451 | 6,64633 | 25,69197 | 95,15546 |

Os gráficos dos escores para o sistema solvente e os diferentes extratos de *S. frugiperda* são apresentados nas Figuras 15 e 16 respectivamente. Analisando a Figura 15, no gráfico dos escores da CP1 x CP2 é possível observar que a maior parte dos dados ficaram agrupados nos escores positivos. O sistema solvente 2 ficou agrupado, indicando discriminação em relação ao sistema solvente 1 e 3. No entanto, não há uma separação muito nítida. Ao analisar os escores dos extratos de *S. frugiperda* em conjunto, podemos verificar que os grupos formados com os solventes (Figura 15), são os mesmos formados das culturas avaliadas (Figura 16). Isso indica que os insetos alimentados nas diferentes culturas, mesmo extraídas em diferentes sistemas solventes, mostram similaridade entre elas.

Os insetos alimentados em soja são os que apresentam íons com maior discriminação, enquanto que os dos insetos provenientes do milho e algodão ficam mais próximos. Nessa ACP podemos inferir de que o melhor solvente extrator para os extratos de *S. frugiperda* foi o MeOH:ACN:H₂O (S2), pois foi o que apresentou maior separação dos grupos dos insetos alimentados nas diferentes

culturas (Figuras 15 e 16).

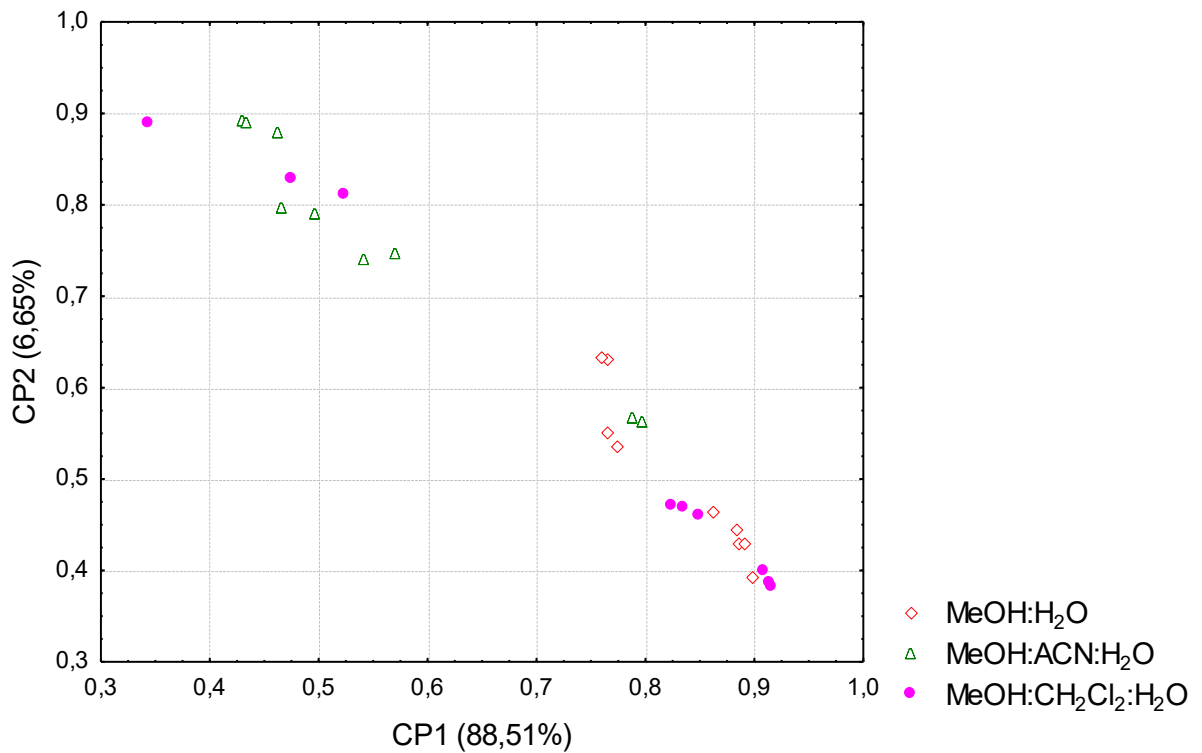


Figura 15. Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais (Varimax) mostrando a variabilidade entre os solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3) na extração de íons dos extratos de *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão.

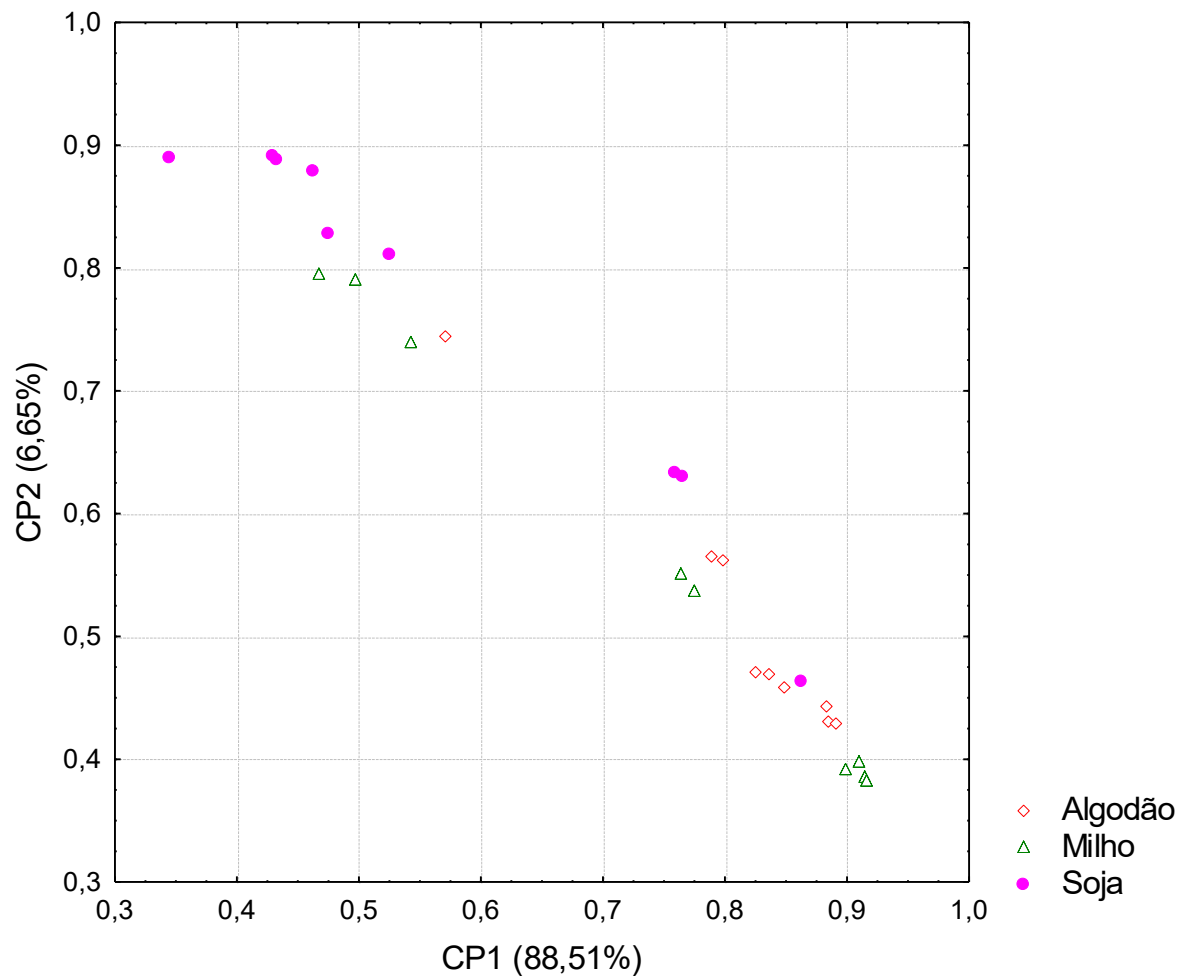


Figura 16. Escores da CP1 x CP2 da Análise de Componentes Principais (Varimax) mostrando a variabilidade entre os íons dos extratos de *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão extraídos em diferentes solventes extratores MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3).

Os *loadings* da CP1 e CP2 e os tempos de retenção são apresentados na Figura 17 e 18, onde se observa que a maior parte das informações contidas nessas componentes principais utilizadas na ACP, estão presentes a partir de dez minutos de corrida. A CP1 apresenta *loadings* com valores positivos e negativos. No entanto, no CP2, apenas um íon foi observado com valor negativo. Para classificação dos íons de interesse, foram consideradas como relevantes as cargas que apresentaram valor superior ou igual a 0,1 ou -0,1.

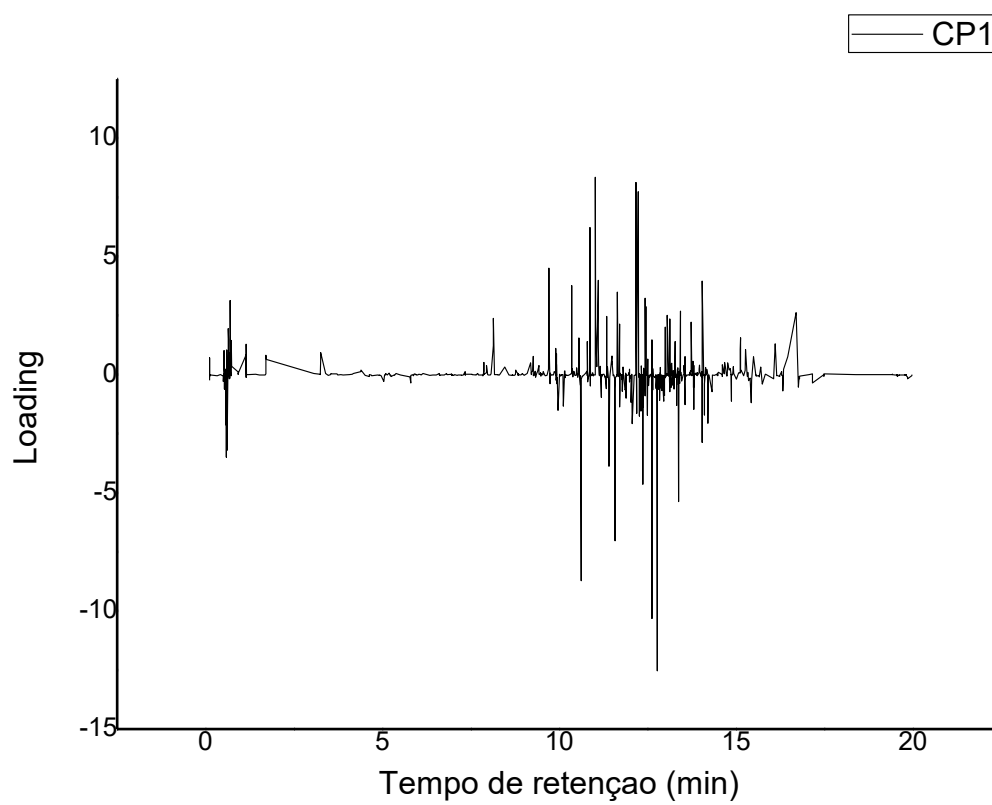


Figura 17. Gráfico dos *loadings* da CP1 conforme seu tempo de retenção (minutos).

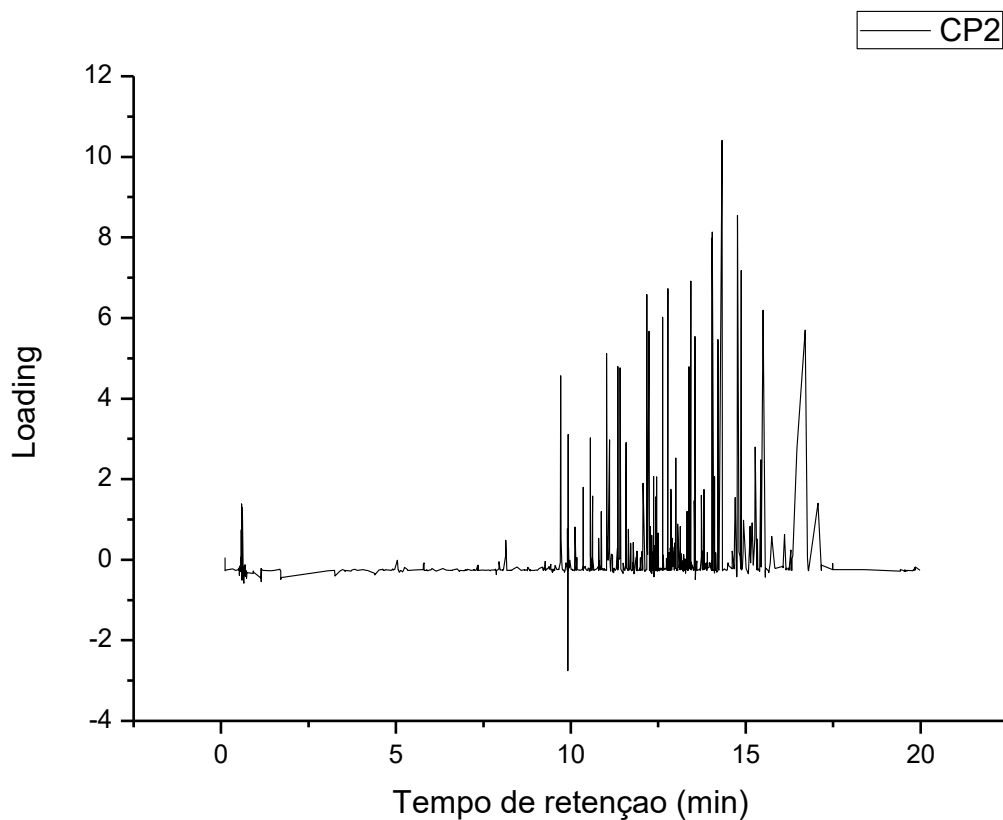


Figura 18. Gráfico dos *loadings* da CP2 conforme seu tempo de retenção (minutos).

A Tabela 6 mostra os pesos (*loadings*) para cada amostra analisada, onde se pode observar que todas as amostras apresentadas na CP1 se encontram nos escores negativos e todas apresentaram peso discriminatório para essa componente principal. Os maiores pesos correspondem aos valores destacados em negrito.

Tabela 6 – Contribuição dos *loadings* através da combinação dos tratamentos cultura x solvente analisados nas CP's.

| Variável | CP1 | CP2 |
|-----------------|-----------------|------------|
| MA S1 R1 | -0,96100 | 0,244770 |
| MA S1 R2 | -0,96313 | 0,250088 |
| MA S1 R3 | -0,96812 | 0,233771 |
| MA S2 R1 | -0,98587 | 0,087480 |
| MA S2 R2 | -0,98113 | 0,077716 |
| MA S2 R3 | -0,94675 | -0,201440 |
| MA S3 R1 | -0,95606 | 0,185293 |
| MA S3 R2 | -0,95764 | 0,201231 |
| MA S3 R3 | -0,95040 | 0,176319 |
| MM S1 R1 | -0,96007 | 0,090982 |
| MM S1 R2 | -0,96158 | 0,073331 |
| MM S1 R3 | -0,94228 | 0,281343 |
| MM S2 R1 | -0,92406 | -0,219105 |
| MM S2 R2 | -0,91902 | -0,289618 |
| MM S2 R3 | -0,89995 | -0,315167 |
| MM S3 R1 | -0,94698 | 0,298809 |
| MM S3 R2 | -0,95218 | 0,285375 |
| MM S3 R3 | -0,94348 | 0,302577 |
| MS S1 R1 | -0,97879 | 0,022159 |
| MS S1 R2 | -0,97493 | 0,016576 |
| MS S1 R3 | -0,93460 | 0,214000 |
| MS S2 R1 | -0,90464 | -0,398293 |
| MS S2 R2 | -0,90408 | -0,393945 |
| MS S2 R3 | -0,92079 | -0,366985 |
| MS S3 R1 | -0,83212 | -0,451958 |
| MS S3 R2 | -0,89282 | -0,313374 |
| MS S3 R3 | -0,92325 | -0,270881 |

¹ Amostras de mariposa (M) alimentadas nas culturas da soja (S), milho (M) e algodão (A); Solventes (S) MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3); e Repetições (R) 1, 2 e 3.

Após análise de extratos de mariposas de *S. frugiperda* alimentados nas culturas da soja, milho e algodão, utilizando-se os três solventes extratores (S1, S2 e S3), a partir da análise hierárquica dos íons obtidos por espectrometria de massas, uma matriz de 27 amostras foi construída. O dendrograma, de maneira geral, apresenta homogeneidade entre as repetições dos dados referentes aos extratos de mariposas, cujas lagartas foram alimentadas de soja, milho e algodão, independente do solvente testado (Figura 19). Para os insetos alimentados na cultura da soja, até a distância de ligação de 13, dois grupos são formados conforme solvente extrator S2 e S3. Assim, entende-se que os íons provenientes da extração dessas duas misturas são similares. Os insetos extraídos com S2 também tem comportamento próximo a soja S2 e S3 quando alimentados em milho (distância de ligação = 15).

Nas análises hierárquicas de extratos foliares (Figura 12) e extratos de insetos (Figura 19) alimentados na cultura do algodão, apresentam comportamento diferente dos demais grupos, notando um distanciamento desta cultura das demais. No dendrograma de folhas, essa separação é bem notável, já nos insetos, há uma mistura com soja em S1 e milho S1 e S3. Com isso, a similaridade nas folhas de soja e milho também é observada nos insetos.

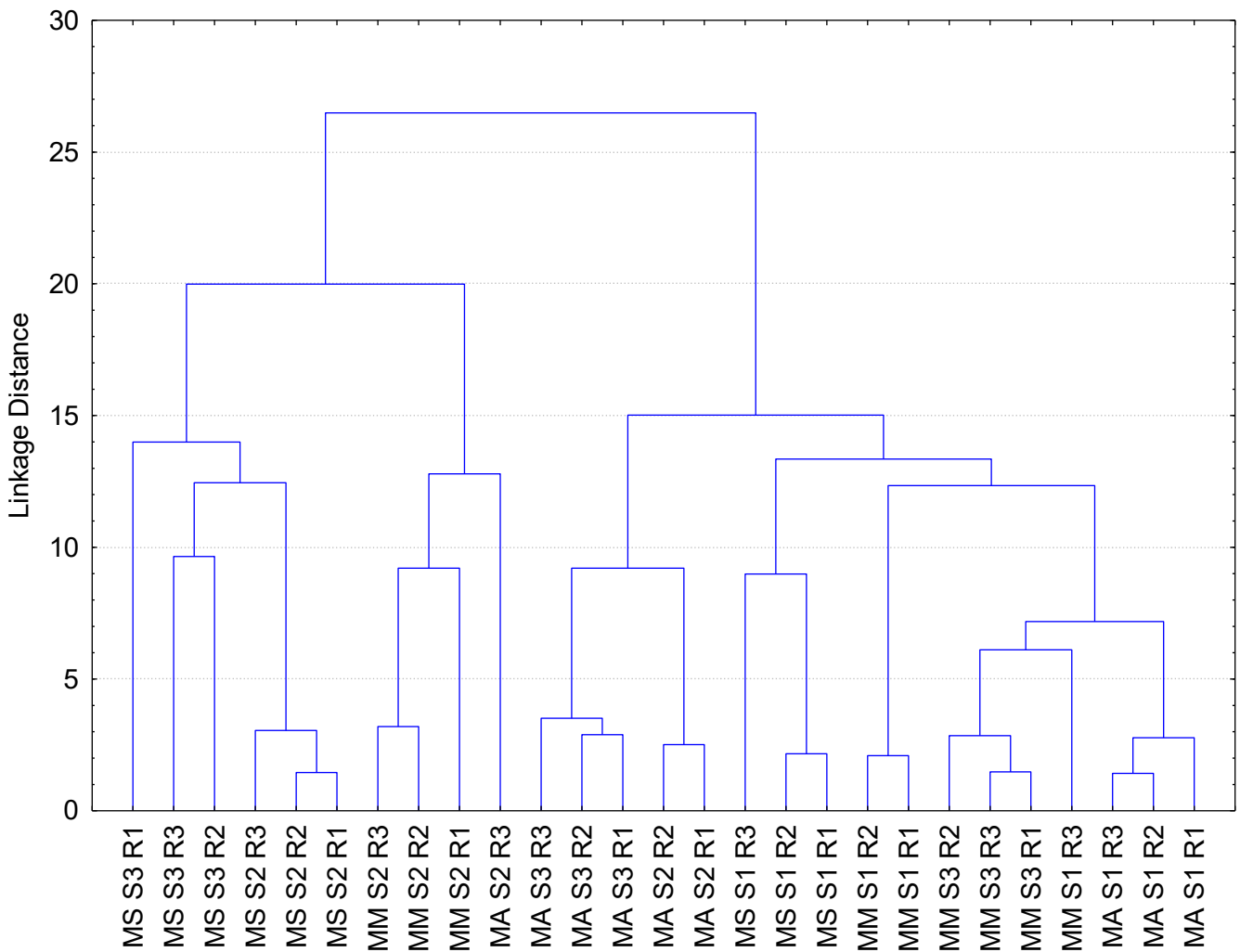


Figura 19. Dendrograma obtido a partir da análise hierárquica dos dados para os extratos de mariposa da espécie *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja (S), milho (M) e algodão (A) e seus respectivos solventes MeOH:H₂O (S1), MeOH:ACN:H₂O (S2) e MeOH:CH₂Cl₂:H₂O (S3) e repetições das amostras (R).

Nas análises dos extratos de mariposas de *S. frugiperda*, o diagrama de Venn identificou 992 íons obtidos na cultura da soja, 994 em milho e 987 em algodão (Figura 20). O solvente 1 extraiu 19 íons específicos das mariposas, que na fase imatura se alimentou de folhas de soja, o solvente 2, 10 e solvente 3, 8. Nos extratos corpóreos de *S. frugiperda*, cujas lagartas se alimentaram do milho foram observados 17 (S1), 21 (S2) e 20 (S3) íons discriminatórios e nas folhas de algodão 13 (S1), 14 (S2) e 14 (S3) íons exclusivos. De maneira geral, para as análises de extratos de mariposas, também não foi possível determinar qual o solvente extrator

que forneceu maior quantidade de informação em apenas um solvente. Para soja, o extrator mais efetivo em termos de quantidade de íons obtidos foi com S1; milho foi o S2; e no algodão, sistema S2 e S3, que discriminaram 14 íons em cada um dos solventes.

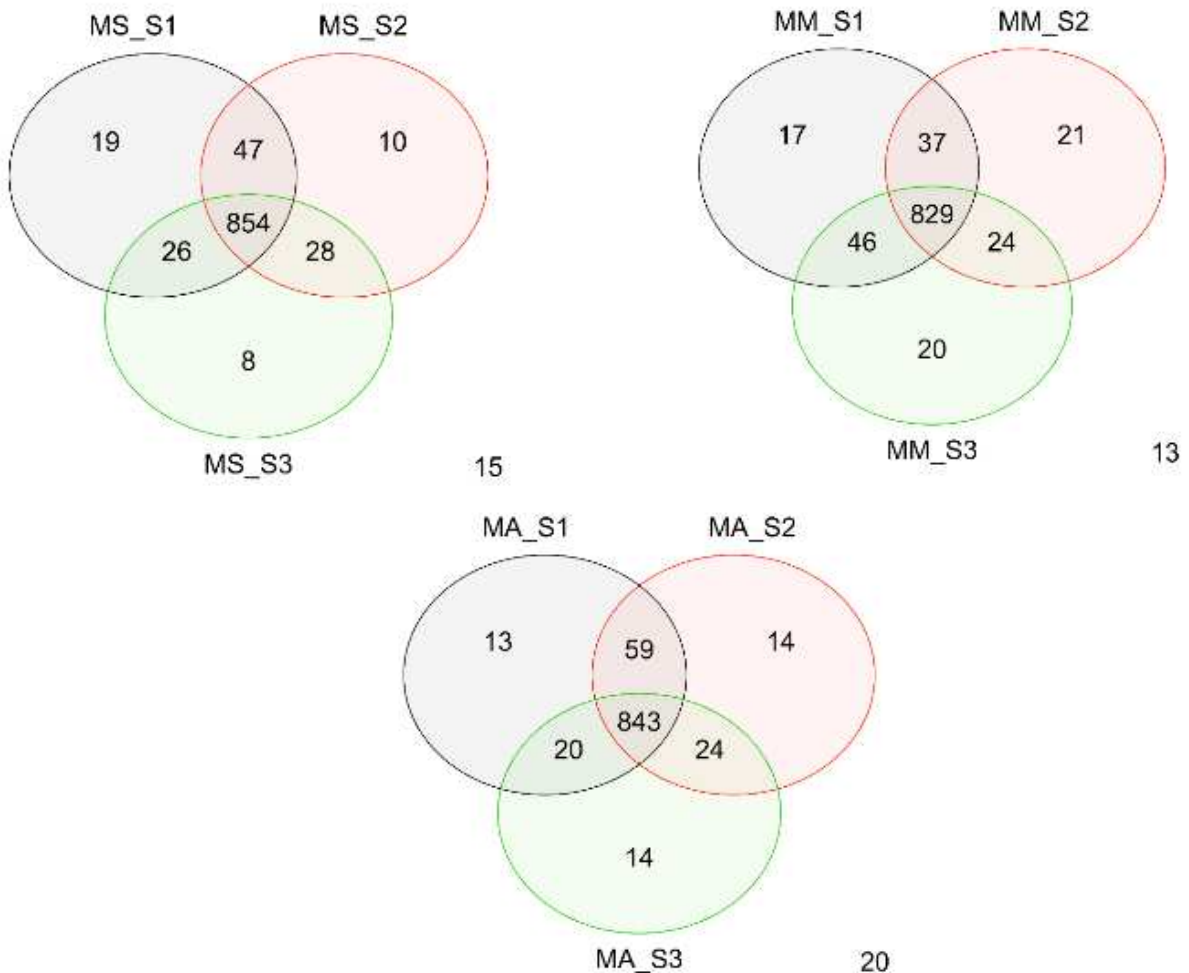


Figura 20. Diagrama de Venn representando o total de íons detectados nos extratos de mariposas da espécie *Spodoptera frugiperda* alimentados em soja, milho e algodão. Os íons estão separados por cultura e solvente extrator, com os íons em comuns representados nas intersecções.

Na identificação de íons exclusivos observados apenas em uma única cultura utilizando o diagrama de Venn, comparando-se os dados apresentados no gráfico dos *loadings* (Figura 17 e 18), o mesmo resultado obtido para os extratos foliares repetiu para os extratos de mariposa. Os íons foram identificados conforme

as duas componentes utilizadas no gráfico dos *loadings*. Nos componentes dos extratos de mariposas de *S. frugiperda* que na fase larval se alimentaram em soja, milho e algodão, a CP2 e CP3 foram utilizadas. A CP2 resultou em 887 íons com *loadings* maiores ou iguais a 0,1 e -0,1. Desses íons, 29 foram identificados apenas na cultura da soja, 16 em milho e 25 apenas em algodão. Ao analisar CP3, o número de *loadings* foi de 261 íons. Desses, apenas cinco foram identificados em soja e um em algodão. Posteriormente, a fragmentação desses compostos identificados como íons discriminatórios e exclusivos de cada cultura foram buscados. Nos insetos alimentados em soja, três íons foram fragmentados no S1, dois no S2 e cinco em S3. Para a cultura do milho, apenas um íon foi fragmentado e por último, em mariposas alimentadas na cultura do algodão, nenhum dos íons foi fragmentado.

CONCLUSÕES

A análise de componentes principais é eficiente, e permite identificar de forma robusta os íons que diferenciam por composição química a soja, o milho e o algodão.

Todos os solventes testados indicam formação de agrupamentos conforme a cultura extraída. Porém, os solventes MeOH:H₂O e MeOH:ACN:H₂O são os mais apropriados para a extração de metabólitos de folhas de soja, milho e algodão, quanto a discriminação de íons diferenciadores entre essas culturas.

O solvente extrator MeOH:ACN:H₂O é mais adequado para a separação dos extratos de mariposa da espécie *S. frugiperda* alimentadas em folhas de soja, milho e algodão. Esse solvente proporciona o maior distanciamento entre os grupos de mariposa conforme a planta utilizada na alimentação durante a fase larval.

Na análise hierárquica, tanto dos extratos foliares como das mariposas, o algodão é o que apresenta maior distanciamento de ligação em relação a soja e milho.

O total de íons detectados pela análise espectrométrica dos extratos foliares é de 2.169 em soja, 2.410 em milho e 2.363 em algodão. Dentre esses, o solvente que extrai o maior número (266) de íons específico de soja foi o MeOH:H₂O, de milho (309) é o MeOH:ACN:H₂O e do algodão (266) é o MeOH:CH₂Cl₂:H₂O. Embora em menor número devido a degradação de alguns íons e a metabolização de outros, os extratos de mariposas apresentam a mesma tendência para os solventes testados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. P. S.; WREGE, M.; MARTINS, J. F. da S.; NAVA, D. E. Simulação do zoneamento ecológico da lagarta do cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 607-612, 2009.
- ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, Cameroon, Kef, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.
- ALI, A.; LUTTREL, R. G.; PITRE, H. N.; DAVIS, F. M. Distribution of FMII armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, n. 5, p. 881-885, 1989.
- ALTMAN, D. W.; STIPANOVIC, R. D.; BELL, A. A. Terpenoids in foliar pigment glands of A, D and AD genome cottons: introgression potential for pest resistance. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 6, 447- 454, 1990.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, M. D. L. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 111-119, 2010.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. M.; SOSA-GOMEZ, D. R.; MELO, F. L.; BÁO, S. N.; RIBEIRO, B. M. Characterization of *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus isolated in Brazil during the first old world bollworm (Noctuidae: *Helicoverpa armigera*) nationwide outbreak. **Virus Reviews and Research**, v. 20, n. 1, p. 1–4, 2015.
- ATKINSON, J.; ARNASON, J.; CAMPOS, F.; NIEMEYER, H. M.; BRAVO, H. R. Synthesis and Reactivity of Cyclic Hydroxamic Acids: Resistance FMctors in the Gramineae. **ACS Symposium Series**, v. 504, p. 349-360, 1992.
- ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:

Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013, 12 p. (**Embrapa Agropecuária Oeste, Circular técnica, n. 23**).

BALDWIN, I. T.; SCHULTZ, J. C. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. **Science**, n. 221, p. 277-278, 1983.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereal L.*). **Journal of Chemical Ecology**, v.13, n. 4, p. 889-906, 1987.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; OLIVEIRA, M. D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, n. 3, p. 237–245, 2010.

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

BATES, H. W. Contributions to an insect fauna of the Amazon Valley. Lepidoptera: Heliconidae. **Transactions of the Linnean Society of London**. v. 23, n. 3, p. 495-566, 1862.

BEACH, R. M.; TODD, J. W. Foliage consumption and developmental parameters of the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) reared on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 1, p. 310-316, 1988.

BERENBAUM, M. R. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. **Journal Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 873-896, 2002.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 × MON 89788 no Brasil**. p. 116, 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G. D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 179-204, 2011.

BLUM, M. S. Detoxication, Deactivation, and utilization of plant compounds by insects. In: Plant Resistance to Insects. **American Chemical Society**, p. 265-275, 1983.

BOTTGER, G. T.; PATANA, R. Growth, development, and survival of certain Lepidoptera fed gossypol in the diet. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 5, p. 1166-1168, 1966.

BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; GARCIA, M. S.; MARTINS, J. D. S. Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 2, 1998.

BOWERS, M. D. Recycling plant natural products for insect defense. In: **Insect Defenses**. State University of New York Press. Albany, p. 353-386, 1990.

BOWERS, M. D. The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects, p. 216-244. In: ROITBERG, B. D.; ISMAN, M. B. (Eds.). **Insect Chemical Ecology: An Evolutionary Approach**. Chapman & Hall, New York, 1992.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.

BROWER, L. P. **Chemical defense in butterflies**. In: Symposia of the Royal Entomological Society of London, 1984.

BROWER, L. P.; EDMUNDS, M.; MOFFITT, C. M. Cardenolide content and palatability of a population of *Danaus chrysippus* butterflies from West Africa. **Journal of Entomology Series A, General Entomology**, v. 49, n. 2, p. 183-196, 1975.

BUENO, A. D. F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BUENO, R. C. O. DE F. Controle de pragas apenas com o MIP, **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2010.

BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; OLIVEIRA, J. R. G.; CAMILLO, M. F. Sem barreira. **Revista Cultivar**, v. 93, p. 12-15, 2007.

BURGHARDT, F.; KNUTTEL, H.; BECKER, M.; FIEDLER, K. Flavonoid wing pigments increase attractiveness of female common blue (*Polyommatus icarus*) butterflies to mate-searching males. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 7, p. 304-307, 2000.

BURGHARDT, F.; PROKSCH, P.; FIEDLER, K. Flavonoid sequestration by the common blue butterfly *Polyommatus icarus*: quantitative intraspecific variation in relation to larval hostplant, sex and body size. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 9, p. 875-889, 2001.

BUSOLI, A. C. Práticas culturais, reguladores de crescimento, controle químico e feromônios no manejo integrado de pragas do algodoeiro. Bicudo do Algodoeiro: manejo integrado. **Dourados: UFMS/EMBRAPA-UEPAE Dourados**, p. 59-52, 1991.

BUSOLI, A. C.; FRAGA, D. F.; SANTOS, L. C.; ALENCAR, J. R. C. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; JANINI, J. C.; SOUZA, L. A. VIANA, M. A.; FUNICHELLO, M. **Tópicos em Entomologia Agrícola**. 4ª edição. Jaboticabal: Editora Multipress, 2011.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. DA; CRUZ, P. L. R. DA; SOUZA, A. R. L. DE; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. Algodão Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Sete Lagoas: Embrapa Algodão e Sorgo, 2009. 22 p. (**Embrapa Algodão e Sorgo, Circular Técnica n. 135**).

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 161-168, 2015.

CARTAXO, W. V.; PEREIRA, S. R. de P.; SILVA, O. R. R. F. Informações Técnicas sobre o Cultivo do Algodoeiro na Agricultura Familiar de Goiás. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, n. 61, p. 1–36, 2013.

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de Spodoptera frugiperda (Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de Algodão em condições de campo**. 1970. 170 p. Tese de Doutorado. – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba (São Paulo).

CASMUZ, A.; JUÁREZ, M. L.; SOCÍAS, M. G.; MURÚA, M. G.; PRIETO, S.; MEDINA, S.; WILLINK, E.; GASTAMINZA, G. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 69, n. 3-4, p. 209–231, 2010.

CÉLERES. Informativo Céleres – 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/17: Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>

Acessado em: 14 janeiro de 2019.

COLEMAN, J. S.; JONES, C. G. A phyto-centric perspective of phytochemical induction by herbivores. **Phytochemical induction by herbivores**. Wiley: New York, p. 3-45, 1991.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2019. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2017. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

CONCOMI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. The octadecanoid signaling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 826-829, 1996.

CORRÊA, B. S.; PANIZZI, A. R.; NEWMAN, G. G.; TURNIPSEED, S. G. Distribuição geográfica e abundância estacional dos principais insetos-pragas da soja e seus predadores. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 6, p. 40-50, 1977.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do Algodão. Sete Lagoas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Algodão e Sorgo, 1995, 45 p. (**Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Algodão e Sorgo - Circular técnica, n. 21**).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Algodão e Sorgo, 1999, 40 p. (**Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Algodão e Sorgo - Circular Técnica, n. 30**).

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle biológico da lagarta do cartucho do Algodão *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos de *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Algodão e Sorgo, 2004, 4 p. (**Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Algodão e Sorgo - Circular Técnica, n. 114**).

CRUZ, I.; VALICENTE, F.; SANTOS, J.; WAQUIL, J.; VIANA, P. **Manual de identificação de pragas do Algodão e de seus principais agentes de controle biológico**. Editora: Embrapa, 2008.

CRUZ, I.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; VALICENTE, F. H. Pragas: Diagnóstico e controle. Arquivo do Agrônomo. Seja o doutor do seu Algodão. **Potafos, São Paulo**, v. 2, n. 1, p. 9-21, 1995.

CRUZ, J. C. C.; GARCIA, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; PINTO, L.; QUEIROZ, L. **Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 89, n. 3, p. 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110–113, 2013.

CZEPAK, C. VIVAN, L. M.; ALBERNAZ, K. C. Praga da vez. **Cultivar: grandes culturas**, Pelotas, ano 15, n. 167, p. 20-27, 2013.

DE RAAD, M.; FISCHER, C. R.; NORTHEN, T. R. High-throughput platforms for metabolomics. **Current opinion in chemical biology**, v. 30, p. 7-13, 2016.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da Soja. **Fundação MT Boletim de Pesquisa de Soja**, v. 11, n. 66, p. 155–206, 2012.

DHURUA, S; GUJAR, G. T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest management Science**, v. 67, n. 8, p. 898-903, 2011.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 205-211, 2002.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids - A gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 10, p. 394-400, 1999.

DOEBLEY, J. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. **Bioscience**, v. 40, n. 6, p. 443-448, 1990.

EKSTRÖM, G.; EKBOM, B. Pest Control in Agro-ecosystems: An Ecological Approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 1–2, p. 74–94, 2011.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2004**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 237 p.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; WARREN, G. W.; DUCK, N. B.; KOZIEL, G. M. The expression of a synthetic CryIA (b) gene in transgenic maize confers resistance to European corn borer. **Insect Resistant Maize**, p. 172, 1994.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). **Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera***. Paris: EPPO, 1981. (Bulletin, 11).

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). ***Helicoverpa zea***. In: SMITH, I. M. et al. (Eds.). *Quarantine pests for Europe*. 2. ed. Wallingford: CAB International, 1996. p. 1-6.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 2014.

FARIAS, J. R. B. et al. *Comite de Publicações da Embrapa Soja*. v. 267, p. 1516–781, 2001.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Cooperative Extension Service; Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University of Science and Technology, p. 25-26, 1977.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine Max* (L.) Merrill 1. **Crop science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 501-533, 2002.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. 2015.

FIEHN, O. **Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes**. In: *Functional genomics*. Springer, Dordrecht, 2002. p. 155-171.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **International Journal of Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155-168, 2001.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

FORMENTINI, A. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V. D.; BARROS, N. M. D.; SPECHT, A. Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay. **Ciência Rural**, v. 45, n. 12, p. 2113–2120, 2015.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**, Jaboticabal: Funep, 2007. 576 p.

FRANCO, A. A.; DOS SANTOS QUEIROZ, M.; PERES, A. R.; ROSA, M. E.; CAMPOS, A. R.; CAMPOS, Z. R. Preferência alimentar de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) por cultivares de soja. **Científica**, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2014.

FUNICHELLO, M. **Aspectos bioecológicos de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares convencionais e transgênicas de algodoeiro**. 2012. 70 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (São Paulo).

FUNICHELLO, M.; GRIGOLLI, J. F. J.; BUSOLI, A. C. Distribución vertical de huevos parasitados y no parasitados de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) por *Trichogramma pretiosum* em algodón em Brasil. In: XLVI Congresso Nacional de Entomologia, Cancún, México. **Entomología Mexicana**, Cancún, v. 10., 2011, p. 375-378.

GALBIERI, R.; SILVA, J. F. V.; ASMUS, G.; VAZ, C. M.; LAMAS, F. M.; CRESTANA, S.; TORRES, E. D.; et al. Áreas de produção de algodão em Mato Grosso: nematoides, murcha de fusarium, sistemas de cultivo, fertilidade e física de solo. **Embrapa Agrossilvipastoril-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2014.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES S. B.; VENDRAMIM, J. D. **Manual de Entomologia agrícola**. 2ª edição. São Paulo: CERES, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P. PARRA; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).

GARCIA, F. R. M. **Zoologia Agrícola: manejo ecológico de pragas**. 2ª edição. Porto Alegre: Rígel, 2002.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22629, 2011.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. FMctores influencing the evolution of resistance. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**, p. 157-169, 1986.

GIANOLI, E.; NIEMEYER, H. M. Characteristics of hydroxamic acid induction in wheat triggered by aphid infestation. **Journal of chemical ecology**, v. 23, n. 12, p. 2695–2705, 1997.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 701-726, 1998.

GRIGOLLI, J.; COSTA, L.; FRAGA, D.; SOUZA, L.; BUSOLI, A. Distribuição vertical de lagartas de *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) e de glândulas de gossipol em cinco cultivares de algodoeiro. **FMzu em Revista**, v. 8, p. 25–29, 2012.

GUTHRIE, W. D.; WILSON, R. J.; COATS, J. R.; ROBINS, J. C.; TSENG, C. T.; JARVIS, J. L.; RUSSEL, W. A. **Journal of Economic Entomology**, v. 79, p. 1492, 1986.

HAIR JÚNIOR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAN, R. L. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre: Bookman, 2005. 592 p.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. Flavonoids and insects. In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 589-618.

HASHIMOTO, Y.; ISHIZAKI, T.; SHUDO, K. Chemistry of benzoxazinoids produced by plants as phytoalexin. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 115, n. 3, p. 189-200, 1995.

HASHIMOTO, Y.; SHUDO, K. Chemistry of biologically active benzoxazinoids. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 551–559, 1996.

HEAD, G.; JACKSON, R. E.; ADAMCZYK, J.; BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J.; GORE, J.; HARDEE, D. D.; LEONARD, B. R.; LUTTRELL, R.; RUBERSON, J.; MULLINS, J. W.; ORTH, R. G.; SIVASUPRAMANIAM, S.; VOTH, R. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of stable carbon isotope ratios and gossypol residues. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, n. 3, p. 583-592, 2010.

HECKEL, D. G. Insect detoxification and sequestration strategies. **Annual Plant Reviews**, v. 47, n. 1, p. 77-114, 2014.

HELLMICH, R. L.; ALBAJES, R.; BERGVINSON, D.; PRASIFKA, J. R.; WANG, Z. Y.; WEISS, M. J. The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. In: ROMEIS, J. et al. (Eds). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Netherland: Springer Netherlands, 2008. Cap.5, p.119-158.

HENSLEY, S. D.; NEWSOM, L. D.; CHAPIN, J. Observations on the looper complex of the noctuid subfamily Plusiinae. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, n. 6, p. 1006-1007, 1964.

HERZOG, D. C.; TODD, J. W. Sampling velvetbean caterpillar on soybean. In: KOOGAN, M.; HERZOG, D. C. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer, 1980, p. 107-140.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 p.

Dissertation (PHD of Department of Botany) - The University of Reading, Reading (Berkshire).

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; HARBONE J. B.; MCAFFERY A. R. Pre-ingestive and postingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, n. 2, p. 181-194, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 2000, 70p. (**Embrapa Soja, Circular Técnica, v. 30**).

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; DE OLIVEIRA JUNIOR, G. J. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA Briefs, 2010. 275 p.

KARIM, S. Management of *Helicoverpa armigera*: a review and prospectus for Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Murree, v. 3, n. 8, p. 1213-1222, 2000.

KELL, D. B.; BROWN, M.; DAVEY, H. M.; DUNN, W. B.; SPASIC, I.; OLIVER, S. G. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 7, p. 557, 2005.

KOGAN, M. Natural chemical in plant resistance to insects. **Iowa State Journal of Research (USA)**, v. 60, n. 4, 1986.

KREYCI, P. F.; MENTEN, J. O. Limitadoras de produtividade. **Cultivar Caderno Técnico**, v. 167, p. 1–12, 2013.

KUBO, I.; HANKE, F.G. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: MILLER, J. R.; MILLER, T. A. **Insect-plant interactions**. New York: Springer-Verlag, 1986, p. 225-249.

KUDOU, S.; SHIMOYAMADA, M.; IMURA, T.; UCHIDA, T.; OKUBO, K. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), Glycitein 7-O- β -D-(6'-OAcetyl) - Glucopyranoside. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 859-860, 1991.

LIN, H.; KOGAN, M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparison of inducing FMctors. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 1852-1857, 1990.

LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y.C.; HUANG, F.; WANG, Y.; LI, H.; LI, H.; GAO, C.; ZHOU, W.; SHEN, J. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 155-161, 2010.

LONG, B. J.; DUNN, G. M.; ROUTLEY, D. G. Rapid procedure for estimating cyclic hydroxamate (DIMBOA) concentration in maize. **Crop Science**, v. 14, n. 4, p. 601-603, 1974.

LOPES, M. A. **As supersafras e a ponte verde**. Notícias Agrícolas. Disponível em: < <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,as-supersafras-e-a-ponte-verde-imp-1064912> >. Acesso em: 30 jul. 2017.

LUGINBILL, P. **The FMII armyworm**. Washington: USDA, v. 34, 1928. 91p.

MACHADO, V.; FIÚZA, L. M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biociência**, n. 38, p. 68-74, 2010.

MACLEOD, G.; AMES, J. Soy flavor and its improvement. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 219, 1988.

MANYANGARIRWA, W.; TURNBULL, M.; MCCUTCHEON, G. S.; SMITH, J. P. Gene pyramiding as a Bt resistance management strategy: How sustainable is this strategy? **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, 2006.

MARTINELLI, S.; MONTRAZI, R.B.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated

to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 519-526, 2006.

MASCARENHAS, R. N., BOETHEL, D. J. Development of diagnostic concentrations for insecticide resistance monitoring in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) larvae using an artificial diet overlay bioassay. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 897–904, 2000.

MASCARENHAS, R. N.; PITRE, H. N. Oviposition responses of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to varieties and growth stages of soybeans. **Environmental Entomology**, v. 26, n. 1, p. 76-83, 1997.

MATTHEWS, M. **Heliothinae moths of Australia: a guide to pest bollworms and related noctuid groups**. Melbourne: CSIRO, 1999. 320 p.

McCORKLE, D. A.; ROBINSON, J. R. C.; HANSELKA, D.; FUCHS, T. W.; ALLEN, C. T. The economic impact of boll weevil eradication in Texas. **The Texas Journal of Agricultural and Natural Resources**, v. 23, p. 50-63, 2010.

MENDES, S. M.; da SILVA, A. F.; CARVALHO, S. D. S.; SOUZA, C. A Buva (*Conyza* spp.): Pode ser Considerada Planta Hospedeira de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*? **Embrapa Algodão e Sorgo-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, p. 1–4, 2008.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Manejo Integrado de pragas em lavouras plantadas com Algodão geneticamente modificado com gene bt (Algodão Bt). **Embrapa Algodão e Sorgo**, Sete Lagoas, 2009.

MENSAH, R. K. Suppression of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, Canberra, v. 35, n. 4, p. 323-329, 1996.

MESQUITA, A. Lavoura furada. **Agro DBO**, v. 9, n. 42, p. 25-30, 2013.

MICHELOTTO, M.; FREITAS, R.; FINOTO, E.; MARTINS, A. L.; DUARTE, A. Algodão: tecnologia protetora. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**, n. 145, p. 36-38, 2011.

MILLER, J.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson Education, 2018.

MISSÃO, M. R. Soja: Origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, n. 1, p. 7–15, 2006.

MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; BORTOLIN, T. M.; FRONZA, E.; SOSA-GOMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT, V. F.; et al. Immature stages of *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae): Developmental parameters and host plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 271-284, 2013.

MORAES, R. R. de; LOECK, A. E.; BELARMINO, L. C. Flutuação populacional de *Plusiinae* e *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 51-56, 1991.

MOREIRA, J. DE A. N.; SANTOS, R. F. Origem, crescimento e progresso da cotonicultura no Brasil, EMBRAPA: 1994.

MORSE, W. J. History of soybean production. In: MARKLEY, K. S. Soybeans and soybean products. New York, **Interscience**, p.3-59, 1950.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F., ... YANO, S. A. C. **Artrópodes que atacam as folhas da soja**. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI. Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga, Brasília: EMBRAPA, 2012, 860p.

MÜLLER, F. T. Entomological Society London 1879, xx-xxix apud MALLETT, J.; JORON, M. **Annual Review Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 30, n. 201, 2000.

NAGOSHI, R. N. Can the amount of corn acreage predict FMI armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 1, p. 210-218, 2009.

NAVA, D. E.; PARRA, J. R. P. Development and soybean leaf consumption by *Urbanus proteus proteus* (L.). **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 661-663, 2002.

NEUPANE, F.; NORRIS, D. M. Iodoacetic acid alteration of soybean resistance to the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 19, n. 2, p. 215–221, 1990.

NEVES, R. C. S.; COLARES, F.; TORRES, J. B.; SANTOS, R. L.; BASTOS, C. S. Rational practices to manage boll weevils colonization and population growth on Family Farms in the semiárido region of Brazil. **Insects**, v. 5, p. 818-831, 2014.

NIEMEYER, H. M. Review article number 39: Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones) difference chemicals in the Gramineae. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3349-3358, 1988.

NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 57-92, 2002.

NOJOSA, G. B. A.; HENZ, G. P.; SATHLER, F. G. L. A Introdução de Pragas e seu Impacto sobre o Acesso a Mercados. In: SUGAYAMA, R. L.; SILVA, M. L.; SILVA, S. X. B.; RIBEIRO, L. C.; RANGEL, L. E. P. **Defesa Vegetal: Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectivas**. In: Belo Horizonte: SBDA, 2015. cap. 6. p. 103-124.

OHTA, N.; KUWATA, G.; AKAHORI, H.; WATANABE, T. Isoflavonoid constituents of soybean and isolation of a new acetyl daidzin. **Journal Agricultural Biological Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1415-1419, 1979.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

ORTH, R. G.; HEAD, G.; MIERKOWSKI, M. Determining larval host plant use by a polyphagous lepidopteran through analysis of adult moths for plant secondary metabolites. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 6, p. 1131–1148, 2007.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. D. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, p. 335-420, 2015.

PANSERA DE ARAÚJO, M. C. G.; DA CRUZ, I. B. M.; OLIVEIRA, A. K. Characterization and biological properties of embryonic stages of four Noctuidae (Lepidoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 1, p. 130-138, 1999.

PAPA, G. Manejo integrado de pragas. In: PAPA, G. **O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Ilha Solteira: Unesp, 2002. p. 203-231.

PEDGLEY, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, Wallingford, v. 36, n. 1, p. 15-20, 1985.

PEIXOTO, M. L. L. F.; DE ARAÚJO, R. C. P.; DE ARAUJO, E. L.; CAMPOS, K. C. Viabilidade financeira da produção de milho (*Zea mays* L.) sob o manejo integrado de pragas na Chapada do Apodi, em Limoeiro do Norte/CE. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 48, n. 2, p. 85-99, 2017.

PETSCHENKA, G.; AGRAWAL, A. A. Milkweed butterfly resistance to plant toxins is linked to sequestration, not coping with a toxic diet. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1818, p. 1–9, 2015.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARRUDA, I. C.; LARA, F. M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 1, p. 127-132p, 2003.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. Are chemical compounds importante for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*?. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1509- 1525, 2005.

PIUBELLI, G. C.; MOSCARDI, F.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Interactions among insect-resistant soybean genotypes extracts with populations of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) susceptible and resistant to its nucleopolyhedrovirus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 861–871, 2009.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1-202, 2002.

POGUE, M. G. A New Synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and Differentiation of Adult Males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 6, p. 1222–1226, 2004.

POULTON, E. B. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. v. 66, p. 161, 1914. apud MALCOLM, S. B. In: ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. (Eds.). **Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites**. Vol I. San Diego: Academic Press, 251 p. 1991.

RENCHER, A. C. **Methods of Multivariate Analysis**. A John Wiley & Sons, Inc. Publication. 2002.

ROTHSCHILD, M.; FORD, B. Heart poisons and the monarch. **Natural History**, New York, v. 79, n. 4, p. 36-37, 1970.

ROTHSCHILD, M.; VON EUW, J.; REICHSTEIN, T.; SMITH, D. A. S.; PIERRE, J. Cardenolide storage in *Danaus chrysippus* (L.) with additional notes on *D. plexippus* (L.). **Proceedings of the Royal Society**, v. 190, n. 1098, p. 1-38, 1975.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361-380, 1987.

SALA, M.; SANTIAGO, M. **Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes dietas**. 2009. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Educação São Luís, Jaboicabal, 2009.

SALVADOR, M. C.; BOIÇA JR, A. L.; DE OLIVEIRA, M. C.; DA GRAÇA, J. P.; DA SILVA, D. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? **Neotropical entomology**, v. 39, n. 5, p. 774–83, 2010.

SANCHES JÚNIOR, J. L. B.; MALERBO-SOUZA, D. T. Frequência dos insetos na polinização e produção de algodão. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.26, p.461-465, 2004.

SANDIFER, C. E. How Euler did it, MAA Spectrum. Mathematical Association of America, Washington, DC, 2007.

SANS, L. M. A.; GUIMARÃES, D. P. Época de plantio de milho. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6^a ed. 2010. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/autores.htm>. Acesso em: 24 dez. 2018.

SCOTT, J. G.; WEN, Z. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 958-967, 2001.

SCRAMIN, S.; CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L.; PAVAN, L. A.; ALVARENGA, N. Avaliação de bicos de pulverização de agrotóxicos na cultura do algodão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 43–50, 2002.

SHAHIDI, F. (Ed.). **Antinutrients and phytochemicals in food**. Washington, DC.: American Chemical Society, 1997. 344 p. (ACS Symposium Series, 662).

SHAHIDI, F.; HO, C-T. (Ed.). **Phenolic compounds in foods and natural health products**. Washington, DC.: American Chemical Society, 2005. 320 p. (ACS Symposium Series, 909).

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 576 p.

SHARMA, H. C.; NORRIS, D. M. Chemical basis of resistance in soybean to cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55, p. 353–364, 1991.

SILVA, A. G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. M.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil seus parasitos e predadores: insetos, hospedeiros e**

inimigos naturais. Parte 2: Tomo 1. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. 1968, 622p.

SIMMONDS, M. S. J. Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 21-30, 2003.

SMILOWITZ, Z. Electrophoretic patterns in hemolymph protein of cabbage looper during development of the parasitoid *Hyposoter exiguae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, n. 1, p. 93-99, 1973.

SOARES, M. M.; VASCONCELOS, E. D.; BRAZ, L. C. C.; RAMOS, J. P.; SILVA, C. R. C.; SOFIATTI, V.; SANTOS, R. C. Estimativa de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho Bt (2b655pw) em ambiente semiárido. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 223-230, 2018.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; HIROSE, E. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 90 p. (**Circular técnica, Embrapa Soja n. 269**).

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja, 2014. 100 p. (**Documentos, Embrapa Soja n. 269**).

SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, L. J., 2007. **Pragas secundárias preocupam sojicultores na safra 2003/2004**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=26&cultura=1>. Acesso em: 23 jul. 2017.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Distrito Federal: Embrapa, 2012. p. 673-723, 2012.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 260 p.

SPARKS, A. N. **A review of the biology of the FMI armyworm**. Florida Entomologist, v. 62, p. 82-87, 1979.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; DE PAULA-MORAES, S. V.; YANO, S. A. C. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 689–692, 2013.

STATSOFT, Inc. STATISTICA for windows (Computer program manual) version 7. Tulsa, Oklahoma, USA, 2007.

STORER, N. P.; KUBISZAK, M. E.; KING, J. E.; THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.

STOUT, M. J. Reevaluating the conceptual framework for applied research on host plant resistance. **Insect Science**, v. 20, n. 3, p. 263-272, 2013.

SUGIMOTO, M.; KAWAKAMI, M.; ROBERT, M.; SOGA, T.; TOMITA, M. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. **Current bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2012.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIE` RE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, 26, 199–202, 2008a.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIE` RE, Y. Field-evolved resistance to Bt toxins. **Nature Biotechnology**, 26, 1074–1076, 2008b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4^a edição. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, 5^a edição. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2010.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 11, 2013.

THEODORIDIS, G. A.; GIKA, H. G.; WANT, E. J.; WILSON, I. D. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. **Analytica chimica acta**, v. 711, p. 7-16, 2012.

THOMSON, D. L. The pigments of butterflies wings: *Melanargia galatea*. **Biochemical Journal**, v. 20, n. 1, p. 73-75, 1926.

URBAN, M. D. P.; BESEN, G. M.; GONCALVES, J. S.; SOUZA, S. A. M. Desenvolvimento da produção de têxteis de algodão no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 25, n. 12, p. 11-28, 1995.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Taxon: Glycine soja Siebold & Zucc.** Disponível em: < <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=17801>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Oilseeds: world markets and trade.** Disponível em:< <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>> .Acesso em 14 fevereiro 2019.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 33-37, 1987.

VAN RENSBURG, J. B. J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

VÁZQUEZ, W. R. C. **Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo da área foliar da soja.** Piracicaba, SP (Brazil), 1988.

VELOSO, V. R. S.; NAKANO, O. Determinação do número de estruturas frutíferas do algodoeiro danificadas por lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em diferentes épocas de desenvolvimento da cultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 13, n. 1, p. 117-126, 1983.

VENTS, J. A.; WATSON, P. J. Naturally occurring modifiers of auxin-receptor interaction in corn: identification as benzoxazolinones. **Planta**, v. 103, p. 103-107, 1978.

VILELA, P. S.; MOREIRA, A. C. S. D. O. **Complexo Soja e o Mercado de Energia no Brasil**. Assessoria Técnica – ASTEC/FMEMG, 2007.

VIRTANEM, A. I.; HIETALA, P. K. Precursors of benzoxazolinone in rye plants. I: Precursor II, the aglicone. **Acta of Chemical Scandinavian**, v. 14, p. 499- 502, 1960.

WANG, N. C.; LI, Z. H. Studies on the biology of cotton bollworm (*Heliothis armigera* Hübner) and tobacco budworm (*Heliothis assulta* Quenee). **Journal of the Shandong Agricultural University**, Taian, v. 1-2, n. 1, p. 13-25, 1984.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do Algodão (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Algodão e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2010.

WISCH, L. N. **Flutuação populacional dos principais noctuídeos e distribuição vertical de ovos e lagartas na cultura da soja**. 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná.

WU, K. M.; LU, Y. H.; FENG, H. Q.; JIANG, Y. Y.; ZHAO, J. Z. Suppression of Cotton Bollworm in Multiple Crops in China in Areas with Bt Toxin-Containing Cotton. **Science**, v. 321, n. 5896, p. 1676–1678, 2008.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES JR, J. Epidemics

of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.

YU, S. J.; NGUYEN, S. N.; ABO-ELGHAR, G. E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the FMIII armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 1, p. 1–11, 2003.

XIAYAN, L.; LEGIDO-QUIGLEY, C. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724-3736, 2008.

ZAGROBELNY, M.; OLSEN, C. E.; PENTZOLD, S.; FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; JORGENSEN, K.; BAK, S.; MOLLER, B. L.; MOTAWIA, M. S. Sequestration, tissue distribution and developmental transmission of cyanogenic glucosides in a specialist insect herbivore. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, p. 44-53, 2014.