

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

RONYCLEIDE DA SILVA SOUSA

**EMULSÕES E ESTUDO DAS FRAÇÕES QUÍMICAS DO EXTRATO DE *Annona muricata* L. (Annonaceae) PARA O CONTROLE DE *Plutella xylostella* (L., 1758)
(Lepidoptera: Plutellidae)**

Rio Largo, AL
2015

RONYCLEIDE DA SILVA SOUSA

**EMULSÕES E ESTUDO DAS FRAÇÕES QUÍMICAS DO EXTRATO DE *Annona muricata* L. (Annonaceae) PARA O CONTROLE DE *Plutella xylostella* (L., 1758)
(Lepidoptera: Plutellidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseane Cristina Predes Trindade

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart de Sant'Ana

Rio Largo, AL
2015

Folha de Aprovação

RONYCLEIDE DA SILVA SOUSA

**EMULSÕES E ESTUDO DAS FRAÇÕES QUÍMICAS DO EXTRATO DE *Annona muricata* L. (Annonaceae) PARA O CONTROLE DE *Plutella xylostella* (L., 1758)
(Lepidoptera: Plutellidae)**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de Agosto de 2015.

Prof^ª Dr^ª Roseane Cristina Predes Trindade, Universidade Federal de Alagoas
Orientadora

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Sônia Maria F. Broglio, Universidade Federal de Alagoas

Dr^ª Alice Maria Nascimento de Araújo, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMATER

Ofereço

A Deus, pois me proporcionou viver o meu sonho mais ousado.
E por isso me fez continuar, mesmo quando achei que não podia mais...

Dedico

Ao meu esposo Gilson Bernardo pelo apoio e amor incondicional, você foi sem dúvida, meu alicerce e meu incentivo nesta árdua caminhada e a toda minha família pelo incentivo e apoio.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Rolando Lourenço de Sousa e Maria Margarete da Silva, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

A minha querida avó Marinalva Avelino pela motivação e ao meu querido tio Alexandre Avelino que sempre apoiou os meus estudos.

A meus tios, tias, primos e primas, que vibraram comigo, desde a aprovação na prova, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigada pela força!

Agradeço também as minhas cunhadas e cunhados e aos meus sogros, Pedro e Marili, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho!

À Universidade Federal de Alagoas – UFAL e ao Centro de Ciências Agrárias – CECA pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Aos meus professores, que foram e são de grande importância, em especial para professora Dr^a Sônia Maria F. Broglio pela sua dedicação a Entomologia e pela amizade.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Predes Trindade, que acreditou em mim; que ouviu pacientemente as minhas considerações partilhando comigo as suas ideias, conhecimento e experiências e que sempre me motivou. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade, por ser uma profissional extremamente qualificada e pela forma humana com que conduziu minha orientação.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana, pelo apoio e por contribuir, com a realização deste trabalho.

Aos técnicos Aldy dos Santos e Margarida Maria do laboratório de Química, pela disponibilidade, simpatia e gentileza, pois sem a ajuda de vocês nada seria possível. Obrigada pela ajuda!

A Prof.^a Dr.^a Aldenir Feitosa, as alunas Isis Torres e Sheila Tavares do laboratório de Química, pelo auxílio em algumas etapas dos experimentos.

À coordenação da pós-graduação e a todos os docentes que contribuíram para meu aprendizado ao longo do curso.

A meus amigos do mestrado, pelos momentos vividos juntos, especialmente à Simone Costa, Djison Silvestre, Jardel Jean e Letice Souza, que se tornaram verdadeiros amigos e tornaram mais leve meu trabalho. Aos poucos nos tornamos mais que amigos, quase irmãos... Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

A todos os meus amigos de disciplinas pela amizade que de alguma maneira tornam minha vida acadêmica cada dia mais desafiante. Peço a Deus que os abençoe grandemente, preenchendo seus caminhos com muita paz, amor, saúde e prosperidade.

Aos meus colegas do laboratório de Entomologia Agrícola: Controle alternativo de pragas do CECA- Sherlly Telles, Anilde da Graça Maciel, Djison Silvestre dos Santos, Emerson Ferreira, Camila Alexandre, Mirandy Dias, Jéssica Rodrigues, Sávio Gomes, Pacífico Júnior, Lindinalva Santos e Gilson Bernardo.

Ao meu esposo, Gilson Bernardo, deixei você por último, porque sempre deixo o melhor para o final, e você é o melhor da minha vida. Obrigada por estar sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado graças a sua ajuda. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos membros da Banca pela contribuição ao participarem da defesa desta dissertação.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

Nada é coincidência, tudo é providência!
São João, capítulo 15, versículo 16.

RESUMO

O Brasil é um país que lidera a utilização e comercialização de agrotóxicos, devido ao seu uso indiscriminado nas lavouras, ocasionando, com isso, mecanismos de resistência e contaminação do meio ambiente e dos consumidores. A cada dia, vem crescendo os estudos com a utilização de métodos de controle alternativo de pragas, entre eles o uso de plantas inseticidas, que causam um menor efeito contaminante sobre o ambiente. A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é a principal praga de brássicas em todo o mundo, principalmente por sua fácil dispersão, curto ciclo e grande capacidade de desenvolver resistência a inseticidas. Por esse motivo, a adoção de métodos de controle alternativos é importante para a elaboração de um plano de manejo integrado para a espécie. Dentre esses métodos, tem-se o uso de extratos de plantas com ação inseticida tais como espécies da família Annonaceae, como a graviola *Annona muricata* L. (Annonaceae) que possui relatos de atividade inseticida, acaricida e vermicida. Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter uma formulação a base de uma emulsão estável do extrato etanólico de sementes de graviola, avaliar as características organolépticas, analisar a estabilidade dos sistemas formados a longo e curto prazo e avaliar sua atividade sobre a traça-das-crucíferas. Como também, realizou-se o fracionamento químico do extrato etanólico de graviola monitorados pelo reagente de Kedde para a triagem da presença de acetogeninas e para testar seus efeitos biológicos no controle da *P. xylostella*. Das cinco formas de obtenção da emulsão, apenas a emulsão 5 mostrou-se estável e homogênea conseguida pela quantidade de 3,5 g de Span, 2 g de Tween, 10 g do extrato orgânico e 85 g de H₂O. Os resultados mostraram que as emulsões armazenadas sem a presença do sol direto, mostraram-se estáveis por três meses e nas emulsões que foram submetidas a testes de estabilidade a curto prazo foi observado que quando expostas a altas temperaturas se apresentaram instável no período observado. A estimativa das CL₅₀ e CL₉₉ foi de 0,03 e 4,26%. A emulsão afetou o desenvolvimento da praga e diminuiu a viabilidade das lagartas cujos resultados encontrados para testemunha, para o controle químico e para CL₅₀ foram 98,3; 70,0 e 70,0% respectivamente. Porém, mostrou-se eficiente como repelente de oviposição e também afetou negativamente a fase embrionária cujos resultados encontrados para testemunha, para o controle químico, para CL₅₀ e para CL₉₉ foram 96,5; 79,50; 87,0; e 21,50 %, respectivamente. Com a realização do fracionamento químico foram obtidas quatro frações por meio de uma partição-líquido-líquido que foram: clorofórmica, acetato de metila, hexânica e aquosa e foram realizados testes biológicos com a traça-das-crucíferas e os resultados obtidos foram que mortalidade das lagartas de *P. xylostella* foi afetada, após a aplicação de todas as frações do extrato etanólico. Porém a fração clorofórmica foi a que apresentou uma mortalidade de 67,74% na CL₅₀ e ao aplicar a CL₉₉, 98,3%. Em seguida foi realizada uma filtração em funil com sílica e obtiveram-se mais seis frações que foram metanólica, acetato de etila, hexânica, 10% acetato + 90% hexano, 25 % acetato+ 75% hexano e 50% acetato+ 50% hexano e a mortalidade das lagartas de *P. xylostella* foi elevada em todas as frações passadas pela purificação do funil com sílica, mais a fração 25% Acetato + 75% Hexano foi a que apresentou maior mortalidade, apresentando 64,76 % na CL₁₀. Em todas as frações mais ativas foram confirmadas a presença de acetogeninas pela coloração violácea apresentada em cromatografia de camada delgada (CCD).

Palavras chave: Traça-das-crucíferas. Graviola. Formulações. Extrato orgânico.

ABSTRACT

The Brazil is a country that leads the use and marketing of pesticides due to indiscriminate use in crops, leading to resistance mechanisms and contamination of the environment and consumers. Every day, has been growing studies with the use of alternative pest control methods, including the use of insecticides, plants that cause a minor effect on the environment. The Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), is the main large plague worldwide, mainly due to its easy dispersion, short cycle and great ability to develop resistance to insecticides. For this reason, the adoption of alternative control methods is important for the development of an integrated management plan for the species. One of these methods, the use of plant extracts with insecticidal action such as species of the family Annonaceae, such as graviola *Annona muricata* L. (Annonaceae) that has reports of activity insecticide, acaricide and vermicide. With this, the aim of this study was to obtain a formulation based on stable emulsion of ethanolic extract of seeds of graviola, assess the organoleptic characteristics, analyze the stability of the systems formed in the long and short term and assess their activity on the moth-cruciferous plants. Also, the chemical fractionation of the ethanolic extract of graviola monitored by Kedde reagent for the screening for the presence of acetogenins and to test its effects on biological control of *P. xylostella*. Of the five ways of obtaining the emulsion, the emulsion only 5 showed stable and homogeneous achieved by the amount of 3.5 g, 2 g Tween Span, 10 g of the extract orgânico and 85 g of H₂O. The results showed that emulsions stored without direct sun, were stable for three months and the emulsions that were subjected to short-term stability tests it has been observed that when exposed to high temperatures were unstable in the observed period. The estimate of the LC₅₀ and LC₉₉ were 0.03 and 4.26%. The emulsion affected the development of plague and decreased the viability of caterpillars whose results found for witness, to the chemical control and LC₅₀ were 98.3; and 70.0; 70.0% respectively. However, proved effective as oviposition repellent and also negatively affected the embryonic stage whose results found for witness, to the chemical control, to LC₅₀ and LC₉₉ were 96.5; 79.50; 87.0; and 21.50%, respectively. With the completion of chemical fractionation was obtained four fractions by means of a partition – liquid – liquid that were: chloroform, Methyl acetate, hexane and biological tests were carried out and water with traces of cruciferous and the data obtained were tracked mortality of *p. xylostella* was affected after the implementation of all fractions of the ethanolic extract. However the chloroform fraction was presented a 67.74% LC₅₀ mortality and to apply the LC₉₉ a mortality rate of 98.3%. Then a filtering funnel with silica and obtained six fractions that were methanol, ethyl acetate, hexane, 10% + 90% acetate, hexane, 25% + 75% acetate 50% acetate, hexane and + 50% hexane and mortality of caterpillars of *P. xylostella* was elevated in all fractions passed by hopper with silica purification, but the fraction 25% + 75% acetate, Hexane was presented the greater mortality featuring 64.76% on LC₁₀. In all the most active fractions were confirmed the presence of the violet coloration acetogenins presented in thin layer chromatography (CCD).

Keywords: Diamondback. Graviola. Emulsion. Chemical fractions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo biológico da <i>Plutella xylostella</i> . (A) fase embrionária, (B) fase larval, (C) fase pupal e (D) fase adulta.....	18
Figura 2-	Estrutura química da uvaricina	29
Figura 3-	Estrutura química básica das acetogeninas.....	30
Figura 4-	Microscopia ótica de uma emulsão.....	32
Figura 5-	Emulsões com separação de fases e emulsão estável de óleo <i>Annona muricata</i>	62
Figura 6-	Partição líquido-líquido com diferentes solventes no extrato etanólico da semente de <i>Annona muricata</i>	88
Figura 7-	Purificação com diferentes solventes no extrato de semente de <i>A.muricata</i>	89
Figura 8-	Cromatograma do extrato etanólico (A), na fração clorofórmica (B), na fração 25% Acetato + 75% Hexano (C) e na fração acetato (D).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proporção de homogeneizadores utilizados para o preparo das emulsões do extrato etanólico orgânico da semente de <i>Annona muricata</i>	55
Tabela 2 -	Emulsões preparadas com óleo vegetal de <i>A.muricata</i> com Span 60 e Tween 80 em proporções diferentes.....	62
Tabela 3 -	Estudo da estabilidade em ambiente com sol indireto, sol direto e em ambiente escuro realizado na cidade de Rio Largo/AL entre os meses de janeiro a abril de 2015.....	64
Tabela 4 -	Avaliação das propriedades organolépticas das emulsões em curto prazo sob diferentes estresses.....	65
Tabela 5 -	Estimativa das concentrações letais da emulsão com o extrato etanólico da semente de <i>Annona muricata</i>	66
Tabela 6 -	Médias \pm DP da viabilidade e duração das fases larval e pupal e longevidade do adulto de <i>Plutella xylostella</i> tratadas com a emulsão do extrato etanólico orgânico da semente de <i>Annona muricata</i>	69
Tabela 7 -	Comparação de médias através da Viabilidade (%) \pm DP dos ovos de <i>Plutella xylostella</i> tratados com a emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de <i>Annona muricata</i> e com o produto químico Decis 25CE.....	71
Tabela 8 -	Média \pm DP de ovos de <i>Plutella xylostella</i> depositados em folhas de couve tratadas com a emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de <i>Annona muricata</i> , da testemunha e do tratamento padrão.....	73
Tabela 9 -	Avaliação das CLs referente às partições líquido-líquido, do experimento com extrato de semente de <i>A. muricata</i> analisando a mortalidade das traças das crucíferas.....	91
Tabela 10 -	Avaliação da CL ₁₀ referente às frações extraídas através da purificação com o funil de sílica, do experimento com extrato de semente de <i>A.muricata</i> analisando a mortalidade das traças das crucíferas.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGs -	Acetogeninas
CECA -	Centro de Ciências Agrárias
CCD-	Cromatografia de camada delgada
CL -	Concentração Letal
CL ₁₀	Concentração letal para matar 10% da população
CL ₅₀ -	Concentração Letal para matar 50% da população
CL ₉₉ -	Concentração Letal para matar 99% da população
CV% -	Coefficiente de Variação
DMSO -	Dimetilsulfóxido
TWEEN -	Polissorbato
DP -	Desvio padrão
GIFAP -	Grupo Internacional das Associações Nacionais de Fabricantes de Produtos Agroquímicos
IC -	Intervalo de confiança
LI -	Limite Inferior (CL ₁₀)
LS -	Limite Superior (CL ₉₉)
NS -	Não significativo
RPM -	Rotações por minuto
UFAL -	Universidade Federal de Alagoas
UR -	Umidade relativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Traças das crucíferas (<i>Plutella xylostella</i>)	16
2.1.1	Características gerais.....	16
2.1.2	Aspectos biológicos.....	16
2.1.3	Danos e prejuízos	18
2.2	Estratégias de controle	19
2.2.1	Método de controle cultural.....	20
2.2.2	Controle biológico.....	20
2.2.3	Controle Comportamental.....	21
2.2.4	Controle químico.....	22
2.2.5	Método por resistência de plantas.....	22
2.2.6	Uso de inseticidas botânicos.....	23
2.3	Uso de plantas inseticidas com potencial de controle de <i>Plutella xylostella</i>	23
2.4	Anonáceas	25
2.4.1	Importância econômica das Anonáceas.....	25
2.4.2	Anonáceas com ação inseticida.....	26
2.4.3	Estudos fitoquímicos das anonáceas.....	28
2.5	Formulações de inseticida	31
2.5.1	Emulsão.....	32
	REFERÊNCIAS	34
3	Emulsão do extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> L. (Annonaceae) no controle de <i>Plutella xylostella</i> (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae)	49
	RESUMO	49
	ABSTRACT	50
3.1	INTRODUÇÃO	51
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.2.1	Condução da cultura.....	53
3.2.2	Criação de <i>Plutella xylostella</i>	53
3.2.3	Preparo dos extratos.....	54

3.2.4	Preparo da emulsão.....	54
3.2.5	Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis.....	55
3.2.6	Testes de estabilidade normais em longo prazo.....	56
3.2.7	Testes de estabilidade acelerados em curto prazo.....	56
3.2.8	Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₉ da emulsão do extrato etanólico da semente de <i>Annona muricata</i>	57
3.2.9	Efeito da CL ₅₀ na biologia de <i>Plutella xylostella</i>	58
3.2.10	Efeito da emulsão do extrato orgânico de <i>Annona muricata</i> na fase embrionária de <i>Plutella xylostella</i>	59
3.2.11	Teste de não preferência para oviposição de <i>Plutella xylostella</i>	59
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.3.1	Emulsão.....	61
3.3.2	Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis.....	63
3.3.2.1	Testes de estabilidade normais em longo prazo.....	63
3.3.2.2	Testes de estabilidade acelerados a curto prazo.....	65
3.3.3	Testes biológicos com a emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de <i>Annona muricata</i> no controle de <i>Plutella xylostella</i>	66
3.3.3.1	Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₉ da emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de <i>Annona muricata</i> para <i>Plutella xylostella</i>	65
3.3.3.2	Efeito da CL ₅₀ da emulsão do extrato etanólico da semente de <i>Annona muricata</i> na biologia de <i>Plutella xylostella</i>	68
3.3.3.3	Efeito da emulsão do extrato orgânico de <i>Annona muricata</i> na fase embrionária de <i>Plutella xylostella</i>	70
3.3.3.4	Teste de não preferência para oviposição de <i>Plutella xylostella</i>	72
3.4	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
4	Estudo das frações químicas do extrato etanólico de <i>Annona muricata</i> L. (Annonaceae) no controle de <i>Plutella xylostella</i> (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae).....	82
	RESUMO.....	82
	ABSTRACT.....	83
4.1	INTRODUÇÃO.....	84
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	86

4.2.1	Condução da cultura.....	86
4.2.2	Criação de <i>Plutella xylostella</i>	86
4.2.3	Coleta das sementes e preparo dos extratos.....	87
4.2.4	Estudo das frações químicas do extrato etanólico da semente de <i>Annona muricata</i>	87
4.2.4.1	Partição líquido-líquido do extrato orgânico da semente de <i>Annona muricata</i>	87
4.2.4.2	Purificação do extrato etanólico da semente de <i>A.muricata</i>	89
4.2.4.3	Obtenção do reagente de Kedde.....	90
4.2.4.4	Teste para acetogeninas.....	90
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.3.1	Fracionamento da partição líquido-líquido do extrato orgânico da semente de <i>Annona muricata</i>	91
4.3.2	Purificação do extrato etanolico da semente de <i>Annona muricata</i>	93
4.3.3	Teste para acetogeninas.....	94
4.4	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas com ação inseticida constitui-se num campo de investigação aberto, amplo e contínuo. A diversidade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle de insetos, levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela das plantas foi investigada com tal finalidade (SCHMALTZ et al., 2005).

São inúmeras as plantas com potencial inseticida e dentre elas podem-se citar às espécies pertencentes à família Annonaceae com diversos trabalhos e diferentes espécies desde os anos 90. As anonáceas se destacam por apresentarem em sua composição substâncias bioativas com alta atividade sobre insetos, conhecida como acetogeninas (ALALI et al., 1999).

Já foram descritas e registradas 42 espécies de anonáceas com potencial inseticida, distribuídas em 14 gêneros (*Annona*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Cardiopetalum*, *Dennettia*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Monodora*, *Mkilua*, *Oxandra*, *Polyathia*, *Rollinia*, *Unonopsis* e *Xylopia*) com importância para as espécies *Annona muricata* L. (graviola) e *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde, pinha, ata), que atualmente são as mais utilizadas para estudos de potencial inseticida (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014). Com destaque para a graviola, do qual muitos trabalhos mostram que possui efeito inseticida para algumas espécies de insetos, nematicida e bactericida, e a sua semente, fonte promissora de material para a produção de extrato, é descartada no processo de industrialização (HERNÁNDEZ; ANGEL, 1997).

A principal vantagem relacionada ao uso de extratos vegetais em proteção de plantas, quando comparados aos produtos sintéticos, deve-se ao fato de gerar novos compostos, os quais não se tornam capazes de inativar, além de serem menos tóxicos, serem degradados rapidamente pelo ambiente, possuírem um amplo modo de ação e de serem derivados de recursos renováveis (FERRAZ; LOPES; AMORA, 2008).

Tendo em vista que, esses inseticidas naturais, geralmente apresentam uma menor durabilidade após a aplicação, e menor resistência quanto a sua conservação, nota-se a necessidade da elaboração de formulações que permitam o aumento da viabilidade desses produtos e sua disponibilização para os agricultores. Entre os diferentes tipos de formulação, pode-se optar pela emulsão, que consiste na mistura entre dois líquidos imiscíveis, utilizando métodos como agitação e adição de homogeneizadores (BAJPAI; GIRI, 2002). Com a emulsão existirá uma uniformidade que consiste em dizer que as gotículas do líquido disperso no outro apresentam diâmetros iguais, em sua grande maioria. O líquido que está disperso em

pequenas gotas é conhecido como fase dispersa, interna ou descontínua, enquanto que o segundo líquido é chamado de fase de dispersão, externa ou contínua (VOIGT, 1982; ZANIN et al., 2001 e 2002; PRISTA et al., 2003; GENNARO, 2004).

Esta pesquisa fitoquímica tem como finalidade identificar os constituintes químicos de espécies vegetais ou determinar a sua presença, quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de estudo. A análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001; GAMBETA, 2008). Esses estudos têm identificado uma série de produtos naturais em espécies de Annonaceae, com destaque para as acetogeninas (ACG), até então isoladas de um pequeno número de gêneros (*Annona*, *Asimina*, *Xilopia*, *Goniothalamus* e *Uvaria*). As ACGs possuem estruturas diversificadas e poderosas propriedades citotóxicas, com aplicações potenciais na geração de fármacos (compostos antitumorais) e de inseticidas agrícolas (COLOM et al., 2007; 2008; BLESSING et al., 2010).

As brássicas têm sua produção afetada pelo ataque de diferentes pragas, entre elas a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) um microlepidóptero que está presente em quase todas as regiões produtoras de brássicas e em praticamente todo período de cultivo da planta, sendo considerada a principal praga não só da couve, como do repolho e de outras brássicas (TORRES et al., 2006); Por causar danos graves ao limbo foliar, chegando a comprometer economicamente a cultura e dependendo do sua infestação pode levar a morte da planta (CASTELO BRANCO et al., 2001).

Desta forma, o objetivo deste estudo é de contribuir satisfatoriamente a uma melhor forma de controlar uma praga que ataca uma gama de hortaliças cultivadas em diversas regiões, através da determinação de uma formulação adequada de extratos de sementes de *A. muricata* para controlar a traça-das-crucíferas, *P. xylostella*, como uma estratégia de controle alternativo, dentro do manejo integrado da praga.

Além disso, objetivou-se estudar as frações químicas do extrato etanólico, a fim de determinar a presença de acetogeninas como princípio ativo principal, monitorado pelo reagente de kedde, com atividade biológica para *P. xylostella*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Traças das crucíferas (*Plutella xylostella*)

2.1.1 Características gerais

A traça-das-crucíferas, *P. xylostella*, é um microlepidoptero, pertencente à família Plutellidae, considerada a praga chave da cultura das brássicas (MARANHÃO et. al., 1998). É originária da região mediterrânea e se encontra disseminada em todos os continentes acompanhando a disseminação das culturas (FILGUEIRA, 1987; MONNERAT et. al., 2000) e adaptando-se as mais diversas condições climáticas (CASTELO BRANCO, 1997).

No Brasil, o seu primeiro registro foi feito na Bahia, época em que os ataques inutilizavam os cultivos de repolho da região (BONDAR, 1928). Segundo Siqueira (1981), ocorria nos estados de Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, tendo como principais hospedeiros o aipo, brócolis, cenoura, couve-flor, mostarda, rabanete e principalmente o repolho e a couve, ocorrendo durante todo o ciclo da cultura.

2.1.2 Aspectos biológicos

Gallo et al. (2002) descreveram os ovos da traça-das-crucíferas como sendo alaranjados, elípticos, aplanados e com presença de relevos ondulados (Figura 1A). Os ovos são depositados na parte abaxial das folhas podendo se encontrar isolados ou em grupos de dois ou três.

Em média o período de incubação pode variar de dois a três dias. Ao final do terceiro dia, os ovos ficam escurecidos e no quarto dia as lagartas rompem o coríon, eclodindo primeiro a cabeça (OOI; KELDERMAN, 1979). Pouco antes da eclosão as lagartas podem ser vistas sob o coríon. Em média menos de 2% dos ovos são inférteis (HARCOURT, 1957).

As lagartas medem cerca de 2 mm de comprimento após a sua eclosão e apresentam o hábito minador, cujas lagartas penetram no interior da folha passando a alimentar-se do parênquima, durante dois ou três dias. Em seguida, abandonam a galeria e passam a alimentar-se da epiderme da face inferior da folha. As lagartas de *P. xylostella*, apresentam quatro instares larvais, sendo que no último, inicia a confecção do casulo (MONNERAT et. al., 2000).

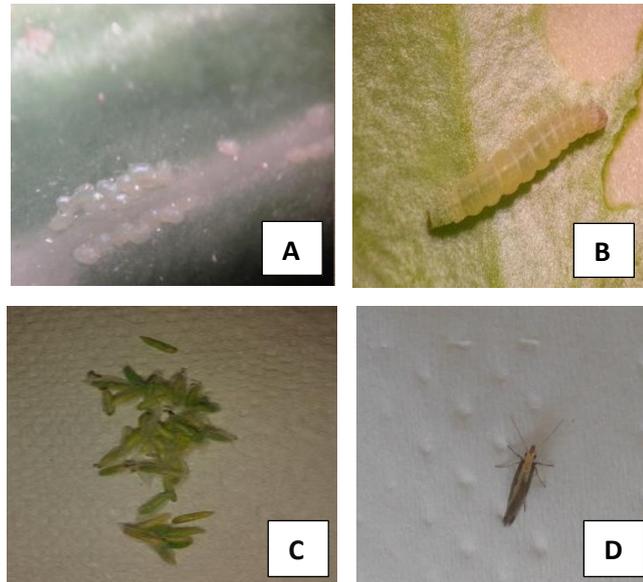
As lagartas atingem o máximo desenvolvimento com 8 a 10 mm de comprimento (Figura 1B), após nove ou 10 dias da eclosão (BIOCONTROLE, 2013). Estas apresentam coloração uniforme verde-clara, notando-se sobre o corpo alguns pequenos pelos escuros e cabeça de tonalidade pardacenta (NOGUEIRA, 1981).

Devido ao hábito alimentar do primeiro estágio larval, de se encontrar protegida dentro do interior das folhas (IMENES et al., 2002), seu controle é dificultado, uma vez que o produto não consegue entrar em contato direto com a lagarta.

Segundo Ooi & Kelderman (1979) o período larval é de cerca de seis dias, ao fim do qual a lagarta confecciona um casulo facilmente reconhecido por ser constituído de pequenas malhas, na face inferior das folhas e no último ínstar pode apresentar dimorfismo sexual, pois as lagartas que darão origem a adultos machos podem ser reconhecidas por duas manchas amareladas na parte posterior do abdome. A fêmea é mais clara que o macho, podendo ser efetuada a sexagem através do segmento abdominal anal visto que os machos exibem divisão longitudinal dorsal, característica ausente nas fêmeas (ROSARIO; CRUZ, 1986). A pupa é do tipo obtecta (ROSARIO; CRUZ, 1986) e de acordo com Medeiros et al. (2003) seu período pode variar entre 3 a 5 dias a 28° C (Figura 1C).

Após cerca de quatro dias da fase de pupa, emerge um microlepidóptero (Figura 1D) medindo 8 a 9 mm de envergadura (NOGUEIRA, 1981). Nos machos a margem posterior das asas anteriores é branca e na posição de repouso forma uma mancha alongada característica sobre a face dorsal (MONNERAT, 1995; BIOCONTROLE, 2013). Os adultos são mais ativos no final da tarde e início da noite. É nesse momento quando ocorre o acasalamento e a postura e a fêmea pode colocar os ovos por até quatro dias, podendo ovipositar de 150 a 360 ovos durante o ciclo (HARCOURT, 1954). O ciclo de vida da traça-das-crucíferas é muito influenciado pela temperatura, em condições quentes a 35°C em 11 dias, ao passo que a 15°C seu ciclo aumenta para 28 dias (DIAS et al., 2004). O número de gerações pode variar de cinco a dez por ano, dependendo das condições climáticas e da disponibilidade de alimentos (CASTELO BRANCO; FRANÇA; VILLAS BOAS, 1997; DIAS; SOARES; MONNERAT, 2004).

Figura 1 - Ciclo biológico da *Plutella xylostella*. (A) fase embrionária, (B) fase larval, (C) fase pupal e (D) fase adulta.



Fonte: Próprio autor, 2015.

2.1.3 Danos e prejuízos

A traça-das-crucíferas é uma das mais importantes pragas das brássicas e foi verificada perdas de até 60% no estado de São Paulo na produção de repolho (IMENES, 2002). Em ataques mais severos, pode ocorrer a inviabilização das áreas de cultivos, devido a um elevado dano (MORATÓ, 2000). As injúrias causadas pela traça-das-crucíferas ocorrem na fase larval, cujas lagartas, após a eclosão, penetram no interior das folhas permanecendo 2 a 3 dias alimentando-se do parênquima da folha.

O dano econômico é ocasionado pelas lagartas jovens, que raspam o tecido foliar deixando apenas a epiderme superior transparente em formato de uma pequena janela, onde, posteriormente, surgem furos no tecido da folha (CARDOSO; PAMPLONA; MICHEREFF, 2010). Após esse período abandonam a galeria e passam a consumir toda a superfície da folha, caules, brotos vegetativos de repolhos, couve e ainda das inflorescências, no caso de couve-flor e brócolis (CASTELO BRANCO; FRANÇA; VILLAS BOAS, 1997; GALLO et.al., 2002; MEDEIROS; BOIÇA JÚNIOR; TORRES, 2005).

Segundo SILVA et al. (2003), o desenvolvimento fenológico da cultura tem uma relação direta com o dano ocasionado pela *P. xylostella* que, por serem irreversíveis impõem a introdução de medidas de controle, que muitas vezes devem ser adotadas ainda no início da formação da planta, em que se deve buscar uma prevenção e um estudo para ter uma maior eficiência no método de controle adotado.

No terceiro ínstar as lagartas são mais vorazes causando mais danos que nos três demais estádios (MAU; KESSING, 2007). Furlong; Wright; Dossall (2013) relataram que os danos causados pela traça-das-crucíferas geram um prejuízo mundial de 4 a 5 bilhões de dólares anualmente, destes, 1,4 bilhão é referente ao controle dessa praga.

Por ser uma praga de ciclo curto, pode produzir em média 20 gerações anuais, o que torna difícil o seu controle na maioria das regiões produtoras e que segundo MEDEIROS et al. (2003), os ataques severos causados, principalmente, durante os períodos mais secos do ano, podem ocasionar perdas totais nos campos de produção. Os danos causados podem acarretar depreciação do produto, atraso no crescimento da planta e mesmo sua morte.

2.2 Estratégias de controle

A dificuldade de controle da traça-das-crucíferas deve-se a algumas características inerentes à praga como: a capacidade de se adaptar em diferentes ambientes, alta proliferação, gerações curtas e alta capacidade migratória. Além destes aspectos deve-se mencionar que a cerosidade das folhas das brássicas torna a ação dos inseticidas pouco eficientes e que a praga tem capacidade de desenvolver resistência aos mesmos (CASTELO BRANCO; GATEHOUSE, 1997).

Em todo mundo onde as brássicas são cultivadas, são empregadas diferentes táticas de manejo com o intuito de diminuir o ataque desta praga, seguindo, muitas vezes, a adoção do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Dentre os métodos de controle de pragas apresentados por Gallo et al. (2002) estão os métodos legislativos, culturais, controle químico e o método de resistência de plantas, controle por comportamento (MICHEREFF et al., 2000), controle biológico (MONNERAT et al., 2000) e uso de inseticidas botânicos (BOICA JUNIOR et al., 2005; TORRES et al., 2006).

2.2.1 Método de controle cultural

O método de controle mecânico, que consiste em catações manuais da praga, não se mostra viável para a *P. xylostella* em grandes propriedades. O método cultural conta com rotações de culturas, aração do solo, épocas de plantio, destruição de restos de culturas, dentre outras práticas que também não se apresenta muito viável para o controle de *P. xylostella*, pois esta apresenta alta capacidade de dispersão, adaptabilidade climática e ambiental. O mesmo pode ser dito sobre o método de controle físico, que utilizam para o controle de pragas o fogo, drenagem, inundações, armadilhas luminosas e temperatura, sendo desses, o único viável é a armadilha luminosa, porém não existem muitos trabalhos sobre esse método. Existem relatos do uso de irrigação no controle de *P. xylostella* no Havaí, que se dá pelo afogamento das lagartas, principalmente as mais jovens que são sensíveis, por aspersão (WATERHOUSE, 1987; GALLO et al., 2002; MAU; KESSIN, 2007).

2.2.2 Controle biológico

Furlong; Wright; Dosdall (2013) relataram uma série de inimigos naturais já estudados que são eficazes no controle da traça-das-crucíferas. Dentre esses inimigos há os grupos dos parasitoides, predadores, vírus, fungos patogênicos e bactérias.

O controle biológico de *P. xylostella*, quando bem implantado, pode ser uma alternativa frente às habituais recomendações de controle químico (KRNJAJIC et al., 1997). O grande número de trabalhos mencionando o complexo de parasitoides nas diferentes regiões produtoras de crucíferas demonstra a importância desses inimigos naturais para a manutenção do nível populacional dessa praga abaixo do nível de dano econômico (MITCHELL; HU GY; OKINE, 1998). Dentre esses agentes de controle biológico, os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* destacam-se pela ampla distribuição geográfica, por serem altamente especializados, como também pela comprovada eficiência no controle de pragas, sobretudo aquelas pertencentes à ordem Lepidoptera (ZUCCHI; MONTEIRO, 1997; HAJI, 1997).

O parasitoide *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner, 1978 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foi mencionado como eficiente em relação ao seu potencial de uso no controle de *P. xylostella* na França (TABONE et al., 1999). No Brasil, à exceção de BARROS; VENDRAMIM (1999), PRATISSOLI et al. (2004) e PEREIRA; BARROS;

PRATISSOLI; 2004), são escassas as pesquisas relatando aspectos biológicos desse inimigo natural parasitando ovos de *P. xylostella*.

Dentre as espécies de parasitoides que possuem uma grande eficiência para o controle de *P. xylostella* tem-se *Diadegma semiclausum* (Hellén, 1949) (Hymenoptera: Ichneumonidae) que é parasitoide larval-pupal, *Cotesia vestalis* (Haliday, 1912) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide larval, *Oomyzus sokolowskii* Kurdjumov (Hymenoptera: Eulophidae), que é um parasitoide larval-pupal, dentre muitos outros (FURLONG; WRIGHT; DOSDALL, 2013).

Furlong; Wright; Dosedall (2013) afirmaram que dentre os patógenos que atacam *P. xylostella*, podem-se citar *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911), *Zoophthora radicans* (Brefeld, 1964), *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879), e *Isaria farinosa* (Holmsk) Fr.(1832).

Resultados bastante favoráveis de controle de *P. xylostella* com *B. thuringiensis* foram observados por CASTELO BRANCO et al. (2003), chegando a 100% de mortalidade para larvas de segundo ínstar de *P. xylostella*. DIAS et al. (2004) também relataram resultados positivos para diferentes pragas, em trabalho com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e var. *aizawai*, em formulações comerciais.

2.2.3 Controle Comportamental

Pesquisas realizadas no Japão, China, Malásia, Canadá, Estados Unidos e Costa Rica evidenciaram que a traça-das-crucíferas pode ser monitorada com o uso de armadilhas com feromônio sexual. BAKER; SHELTON; ANDAROLO (1982) monitoraram as populações de *P. xylostella* com armadilhas de feromônio em culturas de repolho em Nova York, correlacionando os adultos capturados com a subsequente presença de larvas na cultura.

TANAKA et al. (1990) avaliaram a eficácia do feromônio sexual sintético de *P. xylostella* em Kyushu, por meio da contagem de adultos capturados nas armadilhas e presença de lagartas vivas na cultura e consideraram a técnica eficiente para o controle da praga. IWATA; TAKAHASHI; KANAI (1991) utilizaram feromônio sexual sintético para interferir nos acasalamentos de *P. xylostella*, obtendo redução de prejuízos em cultura de repolho no Japão. MCLAUGHLIN; MITCHELL; KIRSCH (1994) observaram que a interferência nos acasalamentos de *P. xylostella* com o uso de armadilhas de feromônio sexual sintético pode ser eficiente para proteção da cultura de repolho em áreas menores que oito hectares na Flórida.

2.2.4 Controle químico

Apesar das alternativas utilizadas para reduzir o ataque de *P. xylostella* e também minimizar os efeitos adversos causados ao meio ambiente o principal método utilizado pelos agricultores ainda é o controle químico. A maioria dos inseticidas sintéticos tem ação semelhante em organismos alvos e não alvos, representando um perigo para os insetos benéficos, animais selvagens e para homem (CHEN et al., 1996). A busca de novos compostos para o uso no manejo integrado de pragas sem problemas como a contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aumento de frequência de insetos resistentes têm despertado o interesse de vários pesquisadores com relação aos extratos vegetais (VENDRAMIM, 1997). Além disso, a fitotoxicidade, o efeito sobre outros organismos não-alvo e o aumento no custo dos agrotóxicos tornou necessária a busca por produtos biodegradáveis e seletivos (RAGURAMAN; SINGH, 1999).

2.2.5 Método por resistência de plantas

No método de controle por resistência, Furlong; Wright; Dossdall (2013) afirmaram que a indução de formação de glicosinolato pela planta se mostra eficiente como deterrente alimentar, já que proporciona um sabor “picante” à planta. Uma outra alternativa, seria a supressão da produção de isotiocianatos, que é atraente e estimulante para a oviposição, nas brássicas.

Há também a alternativa de obtenção de brássicas Bt-transgênicas. Hamilton et al. (2005), avaliaram quatro cultivares de couve (Grand Slam, Green Cornet, Savoy King e Warrior) e couve-flor (Avviso, Nautilus, Prestige e White Rock) e cinco de brócolis (Green Belt, Mascot, Shilo, Viper e Grand Mean) na preferência de oviposição e de duração da fase larval e pupal da *P. xylostella*. O experimento mostrou que não houve preferência de ovoposição entre as variedades de couve-flor e brócolis, mas que a variedade de couve Savoy King foi a que apresentou maior número de ovos. Quanto à duração das fases, mostrou que a duração foi maior nessa mesma variedade.

A utilização de cultivares resistentes tem assumido papel relevante no manejo da traça-das-crucíferas (ULMER et al., 2002) e de outras pragas importantes para essa cultura (PICOAGA et al., 2003).

A resistência de plantas à *P. xylostella* tem sido avaliada com base em duas características principais: a cerosidade da superfície foliar, determinada pelo teor de alcano, e o teor de sinigrina presente nas folhas (EIGENBRODE; SHELTON; DICKSON, 1990; EIGENBRODE, et.al., 1991; SPENCER, 1996; SPENCER; PILLAI; BERNAYS, 1999; ULMER et al., 2002). Entretanto, Eigenbrode et al. (1990) consideram que os mecanismos envolvidos nas características de resistência, relacionadas à quantidade de cera presente na superfície foliar, não são conclusivos. Normalmente, os constituintes da cera, que podem influenciar negativamente os insetos, contêm séries homólogas de alcanos, álcoois (primários e secundários), aldeídos, ácidos, cetonas, ð-dicetonas e ésteres, além de metabólitos secundários como a sinigrina (FERREIRA et al., 2005; LICHSTON; GODOY, 2006).

2.2.6 Uso de inseticidas botânicos

O crescente interesse por substâncias com propriedades deterrentes de origem vegetal para controlar os insetos como, por exemplo, a ajugarina, a azadiractina e a imperatonina, sendo esses produtos considerados de baixo impacto para o meio ambiente (SAITO; LUCHINI, 1998), de baixa nocividade ou toxicidade (SANTOS et al., 1998) e de fácil decomposição (SAITO; LUCHINI, 1998). Esses produtos levam vantagens sobre os agrotóxicos, pois não poluem, não apresentam efeitos residuais, não exigem muita precaução no manuseio (SANTOS et al., 1998). Tais compostos podem proporcionar ao agricultor de baixa renda, um método fácil, natural e econômico de manejo de insetos, utilizando as ferramentas do seu próprio ecossistema (HERNANDEZ; VENDRAMIM, 1997), porém, na opinião de SAITO; LUCHINI (1998), esses produtos vegetais não deixam de ser componentes químicos, devendo seus efeitos serem estudados.

Segundo MEDEIROS; BOIÇA JÚNIOR; TORRES (2005), produtos naturais extraídos de plantas constituem em fontes de substâncias bioativas compatíveis com programas de manejo integrado de pragas (MIP), o que pode reduzir os efeitos negativos ocasionados pela aplicação descontrolada de inseticidas organossintéticos.

2.3 Uso de plantas inseticidas com potencial no controle de *Plutella xylostella*

A utilização de produtos naturais de diferentes partes vegetais, consiste num primoroso recurso que pode vir a ser utilizado devido ao baixo custo, fácil emprego, por diminuir problemas ambientais e constituir importantes agentes no controle de pragas

(Marques; Monteiro; Pereira, 2004), inclusive *P. xylostella* (Shin-Foon; Yu-Tong 1993). Segundo Torres; Barros; Pereira (2001) a suscetibilidade de insetos aos aleloquímicos extraídos de vegetais depende do órgão e da espécie vegetal, forma de extração e espécie do inseto.

Verkerk; Wright (1993) puderam observar que a azadiractina, principal composto bioativo da planta de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) apresentam efeito ovicida para *P. xylostella* na concentração 3 de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. De acordo com CHEN et al. (1996), a oviposição de *P. xylostella* foi reduzida pelo extrato aquoso de frutos de *Melia azedarach* (L.) (Meliaceae) em 49,6; 86,6 e 93,5% em testes com chance de escolha e, em 46,2; 72,1 e 80,2% em teste sem chance de escolha, respectivamente nas, concentrações 0,5; 2 e 4%, tornando evidente que essa redução é proporcional à concentração das substâncias bioativas utilizadas.

TORRES (2000) observou o efeito de extratos aquosos de plantas em relação a *P. xylostella*, afirmando que a oviposição da praga foi diretamente correlacionada com o aumento das concentrações dos extratos, variando de 8% á 14%, independentemente da espécie vegetal utilizada, e que o efeito repelente se acentua com a quantidade de substâncias bioativas extraídas e existentes em cada extrato; os extratos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart, *A. indica* e *Cissampelos* aff. *glaberrima* foram os mais repelentes.

De acordo com Medeiros; Boiça Júnior; Torres (2005), extrato aquoso das folhas de *Enterolobium contortisilliquum* Vell. (Fabaceae), *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) e *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) apresentaram 100% de deterrência para a oviposição de *P. xylostella*, ou seja, interferiram negativamente na postura deste inseto, na concentração de 10%. Também foi estudado o efeito de dos extratos à preferência para oviposição de *P. xylostella* em discos de folhas de couve, constataram que os extratos proporcionaram efeito deterrente na oviposição da praga, com destaque para os extratos de frutos de *S. saponaria*, de frutos de *E. contortisilliquum* e folhas de *T. pallida*.

Chagas et al. (2003), verificaram que a mortalidade de *Myzus persicae* (Sulz, 1776) (Hemiptera: Aphididae) e larvas de segundo ínstar de *P. xylostella* ocasionada por extratos etanólicos e aquosos de folhas de *Prosopis juliflora* Swartz (Fabaceae) foi 90 e 28% com extrato etanólico e de 6 e 10% com extrato aquoso, respectivamente.

Estudos desenvolvidos por Torres; Barros; Oliveira (2001), mostraram a influência negativa dos extratos aquosos de *A. pyrifolium*, *A. indica* e a formulação de *A. indica* sobre a viabilidade larval deste inseto, ou seja, as lagartas que se alimentaram de folhas de couve impregnadas com estas substâncias não atingiram a fase de pupa, na concentração de 10%. Estes autores verificaram que a utilização do extrato aquoso de *Croton* sp. (Euphorbiaceae)

afetou a viabilidade pupal de *P. xylostella*, sendo que de 65% das pupas submetidas ao tratamento não houve emergência de adultos, na concentração de 10%. Observaram, ainda, que a viabilidade larval de *P. xylostella* foi reduzida, em média, 36,67% quando o mesmo extrato foi utilizado. Estes e outros estudos reforçam o potencial da utilização de produtos botânicos, especialmente obtidos a partir de espécies de *Croton* no controle da traça-das-crucíferas.

BOIÇA JUNIOR et al. (2005), avaliando o efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *P. xylostella*, com aplicação dos extratos na concentração de 10% sobre discos de folha de couve, concluíram que os extratos de *S. saponaria*. (frutos), *T. pallida* (ramos), *E. contortisilliquum* (Vell.) Morong (frutos) e *Nicotiana tabacum* L. (folhas), proporcionaram 100% de mortalidade das larvas dessa praga e a causada pelo extrato dos frutos de *S. saponaria* foi superior ao das folhas, com valores de 100,0% e 62,5% respectivamente.

Sharma et al. (2012) avaliaram extratos de *Spilanthes acmella* L. (Asteraceae) obtidos de diferentes solventes (hexano, metano e acetato de etanol) na biologia de *P. xylostella* e mostraram que em todos os casos obtiveram resultados promissores, com a CL₅₀ de 1,5 µg/L para o acetato e 5µg/L para os demais extratos.

2.4 Anonáceas

2.4.1 Importância econômica das Anonáceas

Braga Sobrinho (2010) utiliza a nomenclatura anonácea para representar um nome genérico para designar as plantas da família Annonaceae constituída por cerca de 120 gêneros e 2.300 espécies. Essas plantas englobam um grupo de frutíferas de importância econômica em diversos países como Chile, México, Austrália e Brasil (KAVATI, 1992).

No Brasil, estas culturas são encontradas desde o norte do País até o estado de São Paulo, mas foi na região semiárida do nordeste que o cultivo destas fruteiras se espalhou. No Brasil, estão registrados 29 gêneros, dentro dos quais cerca de 260 espécies sendo algumas de importância econômica. Entre as espécies de maior importância comercial destacam-se a graviola (*Annona muricata* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), cherimóia (*Annona cherimoia*, Mill.) e a atemóia, híbrido a *A. cherimoia* e *A. squamosa* (LEMOS, 2011).

De acordo com Lemos (2014), até às últimas décadas do século XX, as anonáceas foram consideradas frutas de menor importância comercial no Brasil. Somente a partir da

década de 1980, começou a surgir uma demanda de mercado para a pinha e a graviola. Neste período, somente alguns Estados do Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco) e Sudeste (São Paulo) possuíam uma significativa produção de pinha. Hoje, nos estados da Bahia, Pernambuco, Alagoas e São Paulo encontram-se plantios irrigados com bom nível tecnológico, a Bahia é o principal produtor seguido dos estados de Pernambuco e Alagoas (ARAUJO; ARAUJO; ALVES, 1999).

A gravioleira (*A. muricata*) tem como centro de origem a América Tropical, mais precisamente a América Central e vales peruanos, sendo considerada a mais tropical das anonáceas (RAMOS; PINTO; RODRIGUES, 2001). É encontrada tanto na forma silvestre como cultivada em regiões desde o nível do mar até altitudes superiores a 1.100 m, distribuídas do Caribe ao Sudeste do México e no Brasil (MORTON, 1966), bem como nas regiões tropicais e subtropicais da Europa, Ásia, África, Nova Zelândia e Austrália (RAMOS PINTO; RODRIGUES, 2001; SACRAMENTO; MOURA; COELHO JÚNIOR, 2009).

A espécie foi inserida no Brasil pelos portugueses no século XVI (CORREA, 1931) e distribuída para diversas regiões, onde passou a ser cultivada em pomares caseiros (RAMOS; PINTO; RODRIGUES, 2001), tornando-se mais tarde uma fruta de grande importância econômica para a região Nordeste.

A graviola despontou no século XXI nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco como uma alternativa interessante para a pequena agroindústria de polpas congeladas e de outros produtos industrializados, tais como: sorvetes, sucos, néctares, bebidas lácteas, etc. Seu cultivo expandiu-se então para outras regiões do Brasil e passou a ser uma opção interessante para inúmeros pequenos produtores (LEMOS, 2014).

Sabe-se que nas indústrias alimentícias utiliza-se apenas a polpa e ocorre o descarte das sementes de graviola. Portanto, a semente de graviola se torna uma matéria prima de fácil acesso, grande quantidade e sem custo de aquisição. Uma vez comprovada sua eficiência no controle de pragas, se torna um inseticida botânico adequado à preservação do meio ambiente.

2.4.2 Anonáceas com ação inseticida

Várias pesquisas sobre o efeito inseticida de extratos de diferentes espécies de anonáceas têm sido realizadas, comprovando sua ação inseticida e estes resultados justificam o fato de pesquisadores utilizarem extratos de semente de plantas, como Chien-Yih Lin et al. (2009) que demonstraram a eficiência do óleo de sementes da *A. squamosa*, cuja concentração de 0,5 % apresentou controle de 90 % nos testes realizados, para o manejo de *Bemisia*

argentifolii Bellows & Perring, 1994 (Hemiptera: Aleyrodidae), *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) e *Tetranychus kanzawai* Kishida, 1927 (Acari: Tetranychidae).

Silva; Pereira; Bento (2007) ao avaliarem o efeito do extrato de *Annona coriacea* Mart. sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick, 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0% observaram que a menor concentração causou uma mortalidade de 86,4% e que as demais concentrações causaram mortalidade de 100%.

O extrato etanólico de sementes de *A. coriacea* é capaz de interromper o desenvolvimento de ninfas e adultos de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera: Reduviidae). As concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/mL causaram de 90 a 100% de mortalidade em adultos. Para as ninfas, as concentrações maiores de 100 e 200 mg/L causaram mortalidade de 80,0 e 93,3%, respectivamente. Nas concentrações mais baixas as ninfas apresentaram anormalidades morfológicas (CARNEIRO; PEREIRA; GALBIATI, 2013).

Investigações científicas mostraram que as acetogeninas bis-THF-tri-hidroxi dos extratos de *A. cherimoia* (Annonaceae) são capazes de exibir efeitos tóxicos sobre lagartas em 50 µg/g de dieta, provocando a morte de mais de 80% das pupas e adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (ÁLVAREZ et al., 2007) e sobre ninfas de *Oncopeltus fasciatus* (Dallas, 1852) (Hemiptera: Lygaeidae) (ÁLVAREZ et al., 2008) mostraram que as acetogeninas anonacina, anonacina-A, e cis-annonacin-10-ona, provocou a morte de mais de 50% das ninfas podendo variar as concentração entre 0,1 a 15µg /dieta.

Asmanizar; Idris (2012) avaliaram o extrato de *A. muricata* e *Jatropha curcas* (Linnaeus) (Euphorbiaceae) nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0% contra o coleóptero de grãos armazenados *Sitophilus zeamays* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae), porém, somente as maiores concentrações dos extratos (5,0; 10,0 e 20,0%) obtiveram mortalidade elevada entre 70 a 100%.

Bobadilha et al. (2002) também demonstraram o efeito bioinseticida de dois extratos etanólicos de sementes de *A. muricata* e *A. cherimolia* sobre larvas de estágio IV de *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae) em que ocorreu 100% de mortalidade de larvas com o uso dos dois extratos, as avaliações eram realizadas 24 horas depois da aplicação das concentrações, que foram 0,8 e 1,20 mL / 100 mL.

A atividade inseticida do extrato hexânico de sementes de *A. muricata* também foi demonstrada por Llanos et al. (2008) sobre a mortalidade de *S. zeamays*, cuja concentração testada foi de 5000 ppm e causou 77% de mortalidade dos insetos. Já Rodrigues et al. (2014)

encontraram resultados com extrato hexânico da semente de *A. muricata* na concentração 0,5% apresenta eficiência de 98% para o manejo do pulgão-preto do feijão-caupi, *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório.

Como também, González-Esquinca et al. (2012) que observaram, a ação de extratos de *A. muricata*, *A. diversifolia* Saff. e *A. lutescens* Saff. (Annonaceae) em *Anastrepha ludens* Loew, 1873 (Diptera: Tephritidae), *in vitro* e que após 72 horas de exposição, observaram mortalidade de 87,0 a 94,0% com os extratos de *A. lutescens*, 70,0 a 90,0% com *A. diversifolia* e 63,0 a 74,0% com *A. muricata*, em quatro concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Trindade et al. (2011) também avaliaram o extrato etanólico de *A. muricata* (5 mg.mL) cujo resultado causou 100% de mortalidade em lagartas de *P. xylostella*, quando expostas por até 12 dias. Nas concentrações mais baixas, também se observou que a viabilidade foi reduzida.

2.4.3 Estudos fitoquímicos das anonáceas

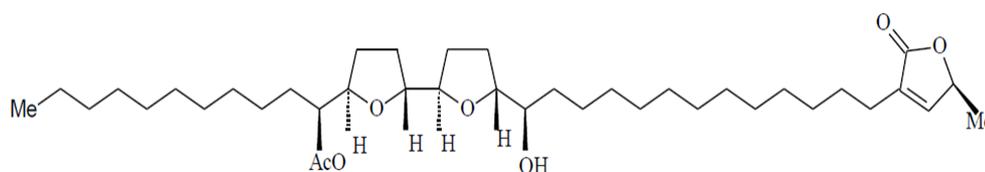
O metabolismo secundário da *A. muricata* produz grupos de fitoquímicos bioativos, onde se destacam as acetogeninas que estão presentes nas folhas, na casca do caule e nas sementes e também podemos contar com os alcaloides, compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonoides, terpenos e acetogeninas, estas são exclusivas do gênero (PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004). Outros constituintes do fruto da gravioleira são ácidos cítrico, oxálico, caféico, cumárico, esteárico, linoléico, málico, γ -aminobutírico e ácido oléico; anonol, campesterol, citrulina, dextrose, etanol, fitosteróis (β -sitosterol, estigmasterol), frutose, ipuranol, manganês, leucoantocianinas, sacarose, taninos. A transformação química qualitativa mais marcante que ocorre na maturação dos frutos da gravioleira é a decomposição de carboidratos, notadamente a conversão de amido em açúcares solúveis. Essa transformação tem efeito no sabor e na textura dos frutos (CHITARRA; CHITARRA, 1990; MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006).

A maioria dos estudos da fitoquímica de anonáceas não se concentra mais nos alcaloides, mas numa nova classe de compostos extremamente bioativos que são referidos como acetonemias anonáceas (RUPPRETCH; HUI; MCLAUGHLIN, 1990; FANG et al., 1993). As acetogeninas são metabólitos secundários obtidos pela via do ácido acético, derivados de ácidos graxos de cadeia longa exibindo expressiva atividade biológica e tem sido considerado como importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais.

As acetogeninas são metabólitos exclusivos dessa família botânica, bastante promissoras para o controle de diversos insetos (ÁLVAREZ-COLOM et al., 2010; HOE et al., 2010; TOLOSA et al., 2012). Há também estudos que atribuem a atividade inseticida de anonáceas aos terpenos (NGUEMTCHOUIN et al., 2010; ORAFIDIYA et al., 2010; ACIOLE et al., 2011; COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012) e aos alcaloides (FEITOSA et al., 2009; KABIR, 2010).

Bioquimicamente, as acetogeninas são um grupo de metabólitos secundários constituído por uma longa cadeia hidrocarbônica, geralmente, C35-C37, sustentando um anel terminal γ -lactona α,β -insaturado, às vezes rearranjado à cetolactona, comum a três anéis tetrahidrofuranos localizados ao longo da cadeia hidrocarbônica, onde podem ser encontradas também funções oxigenadas (hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos, tetrahidrofuranos e tetrahidropiranos), podendo estar presentes ligações duplas e triplas (ALALI et al., 1998; BERMEJO et al., 2005; LEITE, 2009). A primeira acetogenina isolada foi a uvaricina, em 1982, com propriedades antitumorais (Figura 2). A partir de então, o interesse por essas substâncias vem crescendo, principalmente pela variada ação biológica que apresentam e por serem candidatas promissoras para um futuro de geração de drogas contra tumores quimioterápico-resistentes (JOLAD et al., 1982; WRIGHT, 2005).

Figura 2 - Estrutura química da uvaricina

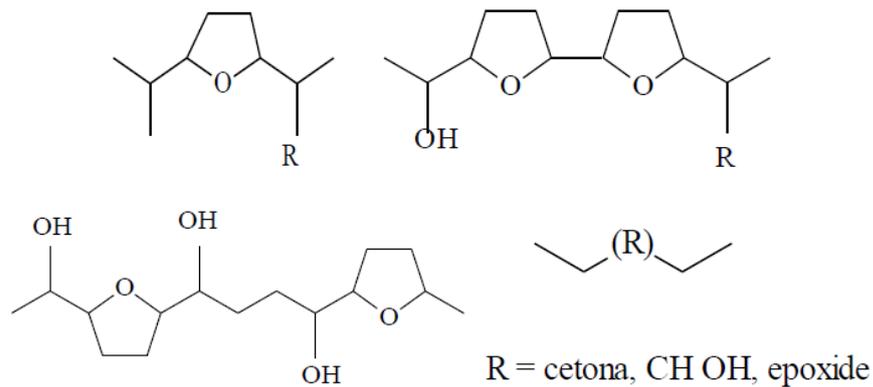


As acetogeninas são classificadas de acordo com as quantidades de anéis tetrahidrofurânicos (THF) e de subunidades de γ -lactonas. Elas podem ser mono-THF, bis-THF adjacentes, bis-THF não adjacentes, as que não possuem anéis THF e as não clássicas, acetogeninas que possuem anel tetrahidropirânico. Nas estruturas das acetogeninas podem variar o padrão do anel lactônico. Eles são classificados em γ -lactonas substituídas, cetolactonas (*cis* ou *trans*) ou anel hidroxilado (RUPPRETCH; HUI; MCLAUGHLIN, 1990).

As acetogeninas são conhecidas por serem compostos com potente citotoxicidade. Foi demonstrado que o mecanismo de ação das acetogeninas está relacionado com a nicotinamida

adenina dinucleotídeo reduzida (NADH): ubiquinonaredutase no complexo I, que é a proteína ligada à membrana do sistema de transporte de elétrons mitocondrial e à NADH oxidase ligada à ubiquinona nas membranas plasmáticas das células cancerosas (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999).

Figura 3 - Estrutura química básica das acetogeninas



Em relação aos flavonoides, são poucos os relatos em espécies de Annonaceae. Contudo, essa família se destaca pela biossíntese de derivados da via do chiquimato que é responsável pela produção da maioria dos derivados fenólicos produzidos por fontes vegetais. (SOARES et al., 2000)

Os flavonoides podem sofrer degradação em meio alcalino na presença de oxigênio e possuem intensa absorção UV, aproximadamente em 350 nm devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos; são ácidos fracos e, como são substâncias polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água (HARBORNE, 1994).

Dentre os compostos aromáticos encontrados na família Annonaceae, podem-se citar: etilbenzeno, benzeno1-etil-2-metil, trimetilbenzeno, metilbenzoato, acetato de benzila e acetato-2-fenil-etil (MARCHESE, 2009; JURGENS; WEBBER; GOTTSBERGER, 2000). Nesse contexto, algumas espécies de *Annona* são aromáticas devido à presença de óleos essenciais e seus compostos aromáticos, como os benzoatos. Dentre as análises dessa família, destacam-se o isolamento de óleos essenciais a partir das folhas *A. muricata* L. (LEBOEUF et al., 1982; ESQUINCA, 2005; LUNA, 2006; REIS, 2011).

Em *A. squamosa* e *Annona senegalensis* Pers, foram isolados monoterpenos, enquanto diterpenos foram descritos em *A. squamosa* e sesquiterpenos em *Annona bullata*. Inúmeros

compostos terpenoides foram isolados do fruto de *A. muricata* e de *Annona reticulata* (RINALDI, 2007).

2.5 Formulações de inseticida

Os agrotóxicos são constituídos por uma larga amplitude de compostos químicos ou biológicos com a função de exterminar, repelir ou controlar processos específicos. A constituição dos agrotóxicos é o ingrediente ativo, o diluente e o aditivo (SANTOS, 2000). A formulação do agrotóxico permite a união do ingrediente ativo com elementos inertes, de modo a obter uma concentração apropriada para manipulação, aplicação e dispersão do produto, além de melhorar a sua eficácia contra a espécie alvo a ser controlada. Na maioria dos casos, os compostos que constituem os ingredientes inertes são mantidos em sigilo por parte dos fabricantes de agrotóxicos (COX, 1999).

Geralmente, a aplicação direta do ingrediente ativo no ambiente não é adequada, pois a fim de minimizar as desvantagens dos produtos naturais, que apresentavam baixa estabilidade e alto custo de produção do material vegetal originado do cultivo, foram desenvolvidas as formulações, no qual foi denominada de agrotóxicos, pois unia as moléculas que possuíam o esqueleto básico dos seus constituintes químicos, mas que foram modificadas com o passar do tempo visando a maior estabilidade, quando utilizadas no campo. Assim, dava-se início à fase do uso de produtos sintéticos para o controle fitossanitário, o que aparentava ser a solução para a agricultura mundial, sendo, portanto necessária uma forma conveniente para utilização efetiva e segura. (SAITO; LUCCHINI, 1998).

As formulações líquidas são produzidas como soluções, emulsões ou suspensões, nas quais o ingrediente ativo é diluído em solventes adequados. As formulações sólidas são apresentadas na forma de pó, granulado ou isca, podendo ser aplicadas diretamente ou após processo de diluição (SUCEN, 2000).

As formulações voltadas para a comercialização são divididas em: formulações para diluição em água, para diluição em outros solventes e as de aplicação direta. O desenvolvimento de uma formulação tem como objetivo manter por determinado tempo uma emulsão estável, para garantir uma aplicação uniforme do ingrediente ativo, obtendo-se assim, a máxima eficiência do produto para o fim a que foi designado (FONSÊCA, 2005).

Segundo Gallo et al. (2002), dentre as formulações encontradas no mercado para o controle de pragas, têm-se o pó molhável, o pó solúvel, os produtos granulados, as soluções concentradas, os aerossóis, produtos gasosos, suspensões líquidas, pastas, microencapsulados

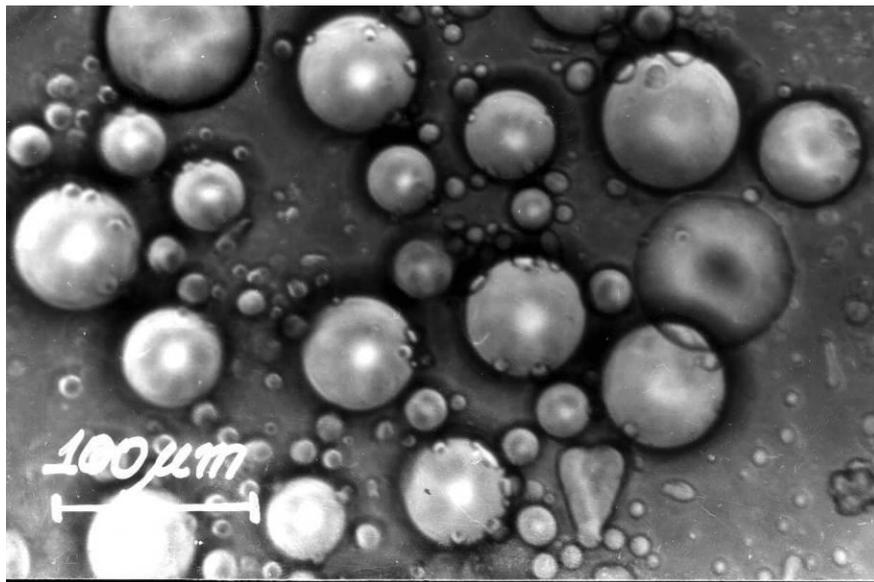
e os concentrados emulsionáveis (também chamados de emulsão concentrada ou emulsões e dispersões aquosas).

2.5.1 Emulsão

Como o extrato da semente de *A.muricata* apresenta uma alta potencialidade inseticida, em pragas agrícolas, mas a sua composição geralmente é muito oleosa, dificultando a sua aplicação no campo, surge o interesse pelas emulsões.

Emulsões são sistemas coloidais largamente utilizados pela indústria de alimentos, e consistem da mistura, dispersão ou suspensão de dois ou mais líquidos imiscíveis, geralmente, óleo e água (Figura 4). Esses sistemas apresentam uma fase dispersa, em forma de gotas esféricas e pequenas (diâmetro de 0,1 μ m a 100 μ m), e uma fase contínua (WALSTRA; VAN VLIET, 2010; MCCLEMENTS, 2011; LAM; NICKERSON, 2013). São termodinamicamente instáveis, devido à positiva e elevada energia livre (tensão interfacial) existente entre as duas fases. Entretanto, quanto menor o tamanho das gotas dispersas e maiores a densidade e a viscosidade da fase contínua, maior e melhor será a estabilidade cinética da emulsão (MCCLEMENTS, 2011; SAMAVATI et al., 2011).

Figura 4 - Microscopia ótica de uma emulsão



Fonte: ZANIN et al., 2002.

Desta forma, para conseguir confeccionar emulsões estáveis é necessário adicionar excipientes conhecidos como agentes emulsificadores ou tensoativos. Uma emulsão estável é definida como um sistema que consegue manter, de maneira homogênea, suas gotículas ou glóbulos na fase contínua. O tensoativo, neste caso, é responsável por manter um filme entre as fases (entre as gotículas e a fase externa), exercendo assim uma barreira física que impede a coalescência que pode ser definida como a junção, a união de duas ou mais gotículas. Caso este filme possua cargas, é considerado que o agente emulsificador exerce, portanto, uma barreira química (SENHORINI et.al., 2012).

Os agentes emulsificadores podem ser divididos em três classes: agentes emulsificadores naturais, sólidos finalmente divididos e agentes emulsificadores sintéticos. Dentre as classes, a mais efetiva a ser utilizada no preparo de emulsões é a última citada, pois as suas moléculas possuem propriedades tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, conhecidas como moléculas anfifílicas. Estes tensoativos sintéticos possuem propriedade anfifílica descrita pelo valor do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) ou também conhecida como equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (GENNARO, 2004).

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S. D. G. et al. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 262-268, 2011.
- ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: potente toxicity against insecticide-susceptible and - resistant german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 641-649, 1998.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 62, n.3, p.504-40, 1999.
- ÁLVAREZ, O. et al. Toxic effects annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal Pesticide Science**, v.81. p.85-89, 2008.
- ÁLVAREZ, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimólia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Pesticide Science**, v.80. p.63-67, 2007.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Insecticidal, mutagenic and genotoxic evaluation of annonaceous acetogenins. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 3, p. 391-394, 2010.
- ARAUJO, J. F.; ARAUJO, J. F.; ALVES, A. A. C. **Instruções técnicas para o cultivo da pinha** (*Annona squamosa* L.). Salvador: EBDA. Circular Técnica. n. 7. 1999. 44p.
- ASMANIZAR, A. D.; IDRIS, A. B. Evolution of *Jatropha curcas* and *Annona muricata* seed crude extracts against *Sitophilus zeamais* infesting stored rice. **Journal of Entomology**, v.9, n.1, p.13-22, 2012.
- BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. **Reactive and Functional Polymer**, v. 53, p. 125-141, 2002

BAKER, P. B; SHELTON, A. M; ANDALORO, J. T. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) in cabbage with pheromones. **Journal Economic Entomology**, v.75, p.1025-1028, 1982.

BARROS, R; VENDRAMIM, J.D. Efeito de cultivares de repolho, utilizados para criação de *Plutella xylostella*(L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p. 469-476, 1999.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**. v.22, n.2, p.269-303, 2005.

BIOCONTROLE. *Plutella xylostella*. 2013. Disponível em:
<http://www.biocontrole.com.br/?area=pragas&id=16>. Acesso em: 4 abr. 2015.

BLESSING, L D.T. et al.. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pesticide Science**, v. 83, n. 3, p. 307-310, 2010.

BOBADILLA, A. et al. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de lassemillas de *Annona cherimólia* Miller (chirimoya) y *A. muricata* Linnaeus (guanábana) sobre larvas del Vestadio de *Anopheles* sp.. **Revista Peruana de Biología**, Lima, v.22, n.2, p.64-73, 2002.

BOICA JUNIOR, A.L. et al. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, Sao Paulo, v.72, n.1, p.45-50, 2005.

BONDAR, G. Aleyrodídeos do Brasil. **Boletim do Laboratório de Patologia**, Bahia, v.5, n.2, p.1-37, 1928.

BRAGA SOBRINHO, R. Potencial de exploração de annonáceas no Nordeste do Brasil. EMBRAPA Agroindústria Tropical. **XII Agroflores – 17ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria**. 2010.

CARDOSO, M. O.; PAMPLONA, A. M. S. R.; MICHEREFF, F. M. **Recomendações técnicas para o controle de lepidópteros-praga em couve e repolho no Amazonas.** .

Circular Técnica. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010. 15 p.

CARNEIRO, A. P.; PEREIRA, M. J. B.; GALBIATI, C. Biocide activity of *Annona coriacea* seeds extract on *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 61, n. 1, p. 419-427, 2013.

CASTELO BRANCO, M. et al. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.19, n. 1, p.60-63, 2001.

CASTELO BRANCO, M. et al. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.549-552, 2003.

CASTELO BRANCO, M.; FRANCA, F.H; VILLAS BOAS, G. L. Traca-das-cruciferas *Plutella xylostella* – Artropodes de importancia economica. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, Campinas, n. 4, p. 1-3, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A. G. Insecticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v26, n.1 p. 75-79, 1997.

CHAGAS, A.C. S. et al. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.109-114, 2003.

CHEN, C. et al.. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Applied Entomology**, v.120, p.165- 169, 1996.

CHIEN-YIH LIN. et al. Control of Silverleaf Whitefly, Cotton Aphid and Kanzawa Spider Mite with Oil and Extracts from Seeds of Sugar Apple. **Neotropical Entomology**, v.38, n.4, p.531-536, 2009.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Armazenamento, pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.

COLOM, O. Á. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 81, n. 2, p. 85-89, 2008.

COLOM, O. Á. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 80, n. 1, p. 63-67, 2007.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro. Serviço de Informação Agrícola, v.2, p.484-488, 1931.

COSTA, E. V. et al. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 6, p. 907-912, 2011.

COX, C. "INERT INGREDIENTS IN PESTICIDES: WHO'S KEEPING SECRETS?" **Journal of Pesticide Reform**, v. 19, n. 3, 1999.

DIAS, D. G. S.; SOARES, C. M S.; MONNERAT, R. Avaliação de larvicidas de origem microbiana no controle da traça-das-crucíferas em couve-flor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 553-556, 2004.

EIGENBRODE, S.D.; SHELTON, A.M.; DICKSON, M.H. Two types of resistance to the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in cabbage. **Environmental Entomology**, v.19, p.1086-1090, 1990.

EIGENBRODE, S.D. et al. Characteristics of glossy leaf waxes associated with resistance to diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in *Brassica oleracea*. **Journal of Economic Entomology**, v.84, p.1609-1618, 1991.

ESQUINCA, A. R. G. **La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos: Revision**. **Ciencia y Tecnología en la Frontera**, v. 3, p. 41-52, 2005.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I; SIMÕES, C. M. **Introdução à Análise Fitoquímica**. In: SIMÕES, C. et al. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC, 3ed., p.165, 2001

FANG, X. P. et al. Annonaceous Acetogenins: an update review. **Phytochemistry Analysis**, v.1, n.4, p. 27-48, 1993

FEITOSA, E. M. A. et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 375-378, 2009.

FERREIRA, E. A. et al. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 611-619, 2005.

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas**. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **ABC da olericultura: guia da pequena lavoura**. Sao Paulo: Agronomica Ceres, 1987.

FONSÊCA, S.G.C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**. 2005. Disponível em: http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/Farmacot_Fitoterapicos.PDF. Acesso em: 30 abr. 2015.

FURLONG, M. J.; WRIGHT, D. J.; DOSDALL, L. M. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. **Annual Reviews Entomology**, v.58, p. 517-541, 2013.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. 2 ed. São Paulo: Editora Agronomica Ceres, 2002, 920 p.

GAMBETA, R. M. **Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire.** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim. Trabalho de conclusão de curso. 2008. 28 p.

GENNARO, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia.** 20 ed., p. 759-763, 2004.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. et al. In Vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, Tephritidae). **Interciencia**, v. 37, n. 4, p. 284-289, 2012.

HAJI, F. N. P. et.al. **Controle biológico da traça do tomateiro com *Trichogramma* no Nordeste do Brasil,** In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.), *Trichogramma e o controle aplicado.* Piracicaba, FEALQ, p. 319-324, 1997.

HAMILTON, A. J. et al. Effects of cultivar on oviposition preference, larval feeding and development time of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), on some *Brassica oleracea* vegetables in Victoria. **Australian Journal of Entomology** v. 44, n. 3, p. 284-287, 2005.

HARBORNE, J. B. Phenolics. In: MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V. **Natural Products. Their chemistry and biological significance.** New York: Longman scientific & Technical, 1 ed., p. 361-388, 1994.

HARCOURT, D. G. Biology of the diamondback moth, *Plutella maculipennis* (Curt) (Lepidoptera: Plutellidae), in Eastern Ontario. II. Life history, behavior, and host relationships. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v.89, p.554-564, 1957.

HARCOURT, D.G. **The biology and ecology of the diamondback moth, *Plutella maculipennis*,** Curtis, in eastern Ontario. Phd thesis. Cornell Univ., Ithaca, NY, 1954. 107 p.

HERNANDEZ, C.R. & VENDRAMIM, J.D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista Agrícola**. v.72, p.305-318, 1997.

HERNANDÉZ, C.R.; ANGEL, D.N. **Anonáceas con propiedades insecticidas**. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.M. & REBOUÇAS, T.N.H. Anonáceas produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). p. 229-239, 1997.

HOE, P. K. et al. Biological activity of *Annona muricata* seed extracts. **Malaysian Journal of Science**, Kuala Lumpur, v. 29, n. 2, p. 153-159, 2010.

IMENES, S. D. I. et al. C., Avaliação da atratividade de feromônio sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p.81-84, 2002.

IWATA, N.; TAKAHASHI, A.; KANAI, Y. Control of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.), by using a synthetic sex pheromone as a communication disruptor in cabbage fields, **Journal of Agricultural Research**. Gunma, Japan, n.8, p.19-32, 1991.

JOLAD, S. D. et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v.47, p. 3151-3153, 1982.

JURGENS, A.; WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry**, v. 55, p. 551-558, 2000.

KABIR, K. E. Larvicidal effect of an alkaloidal fraction of *Artabotrys odoratissimus* (Annonaceae) bark against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 30, n. 3, p. 167–169, 2010.

KAVATI, R. Cultivo de atemóia. In: DONADIO, L. C.; MARTINS, A. B. G.; VALENTE, J. P. (Eds.) Fruticultura tropical, Jaboticabal: FUNEP, 1992. 39-70 p.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 225-242, 2014.

KRNJAJIC, S. et al. Biological control of cabbage pests. **Acta Horticulturae**, v.462, p.119-124, 1997.

LAM, R.S.H.; NICKERSON, M.T. Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Foods Chemistry*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>>. Acesso em: 26 abr. 2015.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEITE, J. P. V. Química dos Produtos Naturais: Uma Abordagem Biossintética. *In:* (Ed.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. Ed. Atheneu, 2009. 47-97 p.

LEMOS, E.E.P. **A produção de anonáceas no Brasil**. Palestra Anonáceas - V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação, Edição especial, v. 36. p. 077-085, 2014.

LEMOS, E.E.P. Panaroma de lãs anonas cultivadas em Brasil: saramuyo, guanábana y atemoya. *In:* **Anonáceas: plantas antigas, estudos recientes**. Gonzales-Esquinca, A.R. et al. Colección Jaguar, 2011. 21-34 p.

LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 919-926, 2006.

LLANOS, C.A.H. et al. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v.34, p.76-77, 2008.

LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas**. Pernambuco, 2006. 254f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MARANHAO, E. A. DE A.; LIMA, M. P. L. de; MARANHAO, E. H. A.; LYRA FILHO, H. P. Flutuacao populacional da traca-das-cruciferas, em couve, na zona da Mata de Pernambuco. **Horticultura brasileira**. Brasília, campinas, v.16, n. 1, p. 50-50, 1998.

MARCHESE, R. M. **Atividade de constituintes micromoleculares de *Renealmia alpinia* (Rottb.) Mass (Zingiberaceae) sobre *Leishmania* (*Leishmania*) *chagassi***. Brasília, 2009. 167f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, 2009.

MARQUES, R.P; MONTEIRO, A.C; PEREIRA, G.T. Sporulation and viability of entomopathogenic fungi under mediums with different Nim oil (*Azadirachta indica*) concentrations. **Ciência Rural**, v.34, p.1675-1680, 2004.

MAU, R. F. L.; KESSING, J. L. M. ***Plutella xylostella* (Linnaeus)**. 2007. Disponível em: (<http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/plutella.htm>). Acesso em: 5 mar. 2015.

MCCLEMENTS, D.J. **Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance**. The Royal Society of Chemistry, 2011. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org>>. Acesso em: 26 abr. 2015.

MCLAUGHLIN, J.R.; MITCHELL, E.R.; KIRSCH, P. Mating disruption of diamondback moth (Lepidoptera:Plutellidae) in cabbage: reduction of mating and suppression of larval populations. **Journal Economic Entomology**, v.87, n.5, p.1198-1204, 1994.

MEDEIROS, C.A.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; TORRES, A.L. Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas, em couve. **Bragantia**, v.64, n.2, p.227- 232, 2005.

MEDEIROS, P. T. et al. **Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*)**. Circular Técnica, Brasília: Embrapa Hortícolas, 2003, 4 p.

MICHEREFF, M .F. F. et al. A. Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35 p.1919-1926, 2000.

MITCHELL, E.R.; HU GY; OKINE, J.S. Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) infestation and parasitism by *Diadegma insalure* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in collards and adjacent cabbage fields. **Florida Entomologist**, v. 80, p. 54-6, 1998.

- MONNERAT, R. G. et al. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas químicos sobre a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) e seus parasitoides. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.4, p. 723-730, 2000.
- MORATÓ, M. G. Plagas y enfermedad en el cultivo de coliflor. Descripción e control. **Vida Rural**, v. 8, n. 107, p. 1-5, 2000.
- MORTON, J. F. The Soursop of guanábana (*Annona muricata* L.) **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. v. 79, p. 355-366, 1966.
- MOSCA, J. L.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. Características Botânicas das Principais Anonáceas e Aspectos Fisiológicos de Maturação. **EMBRAPA-Documentos**, n. 106, 2006.
- NGUEMTCHOUIN, M. M. G. et al. Insecticidal formulation based on *Xylopiya aethiopica* essential oil and kaolinite clay for maize protection. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 9, p. 985-991, 2010.
- NOGUEIRA, S.B. Pragas das brassicas. In: **Cultura de brassicas**. Universidade Federal de Vicosa. 1981, 34-39 p.
- OOI, P.A.C.; KALDERMAN, W. The biology of three common pests of cabbages in Cameron Highlands, Malaysia. **Malaysian Agricultural Journal**, Kuala Lumpur, v. 52, n. 1, p. 85-101, 1979.
- ORAFIDIYA, L. O. et al. Pesticidal and antimicrobial profile of the sesquiterpene-rich leaf essential oil of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 4, n. 1-2, p. 11-16, 2010.
- PEREIRA, F.F; BARROS, R; PRATISSOLI, D. Desempenho de *Trichogramma pretiosum* Riley e *T. exiguum* Pinto & Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae) submetidos a diferentes densidades de ovos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Ciência Rural**, v.34, p. 1669-1674, 2004.

PICOAGA, A. et al. Resistance of kale populations to lepidopterous pests in Northwestern Spain. **Journal of Economic Entomology**, v.96, p.143-147, 2003.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M.; Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n.2, p. 281-293, 2004.

PRATISSOLI, D. et al. Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* em ovos da traça-das-crucíferas sob diferentes temperaturas. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p.754-757, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. **Tecnologia Farmacêutica**. 6 ed., vol. 1, p.597-669, 2003.

RAGURAMAN, S.; SINGH, R.P. Biological effects of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on an egg parasitoid, *Trichogramma chilonis*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, p.1274-1280, 1999.

RAMOS, V. H. V.; PINTO, A. C. Q.; RODRIGUES, A. A. Introdução e importância socioeconômica. In: OLIVEIRA, M. A. S. (ed.). **Graviola**. Produção: aspectos técnicos. Embrapa Cerrados (Planaltina, DF) Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2001. 9 p.

REIS, C. N. **Annona muricata: análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. Rio de Janeiro, 2011. 150f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2011.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** São Paulo, 2007. 125p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2007.

ROSARIO, C.; CRUZ, C. Life cycle of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera: Plutellidae), in Puerto Rico. **The Journal of Agricultura of the University of Puerto Rico**, Rio Piedras, v. 70, n. 4, p. 229-234, 1986.

RUPPRETCH, J. K.; HUI, Y-H.; McLAUGHLIN, J. L; Annonaceous Acetogenins: a review. **Journal of Natural Product** ., v.53, n.2, p.237-278, 1990.

SACRAMENTO, C. K.; MOURA, J. I. L.; COELHO JUNIOR, E. Graviola. In: SANTOS-SEREJO, J. A. et al. (eds.). **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 95-132 p.

SAITO, M.L.; LUCHINI, F. **Substâncias obtidas de plantas e aprocura por praguicidas eficientes e seguros ao meioambiente**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998.46 p.

SAMAVATI, V. et al. **Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate**. Journal of Texture Studies, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4603.2011.00317.x/pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2015.

SANTOS, F. **Aplicação de pesticidas em agricultura**. Departamento de Fitotecnia e Engenharia Rural, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 2000.

SANTOS, J.H.R. DOS. et al. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Fortaleza: UFC, 1998. 216 p.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v.16, p.80. 2005.

SENHORINI, G.A. et al. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization. **Ciência dos Materiais e Engenharia**, v, 32, p. 1121-1126, 2012.

SHARMA, A. et al. Insecticidal toxicity of apilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. **Scientific Research - American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p.1568-1572. 2012.

SHIN-FOON C.; Q. YU-TONG. Experiments on the application of botanical insecticides for the control of diamondback moth in South China. **Journal of Applied Entomology**. v.116, p.479-486. 1993.

SILVA, A.P. T.; PEREIRA, M. J. B.; BENTO, L. F. Extrato metanólico da semente de araticum (*Annona coriacea*) (Mart.) sobre a mortalidade da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1150-1153, 2007.

SILVA, D. M. et al. Ent-kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, p. 1570-1576, 2012.

SILVA, V. C. A. et al. Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok. **Netropical Entomology**, Piracicaba, v.32, n.4, p. 653-665. 2003.

SIQUEIRA, T. S. **Cultura de Brássicas**. Vicososa: UFV, 1981. 50 p.

SOARES, G. L. G.; ISAIAS, R. M. S.; GONÇALVES, J. M. R.; CHRISTIANO, J. C. S. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v.2, p. 103- 133, 2000.

SPENCER, J.L. Waxes enhance *Plutella xylostella* oviposition in response to sinigrin and cabbage homogenates. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.81, p.165-173, 1996.

SPENCER, J.L.; PILLAI, S.; BERNAYS, E.A. Synergism in the oviposition behavior of *Plutella xylostella*: sinigrin and wax compounds. **Journal of Insect Behavior**, v.12, p.483-500, 1999.

SUCEN. SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. **Manual de segurança química e controle de vetores**, 2000. , Disponível em:

<http://www.saude.sp.gov.br/resources/Sucen/arquivos-seguranca-do-trabalho/sequi3.pdf>.

Acesso em: 01 maio. 2015.

TABONE E. et al. Aptitude de 17 souches de *Trichogramma* a parasiter lateigne dès cruciferes *Plutella xylostella* L. em laboratoire (Lep.: Yponomeutidae). **Annales de la Société Entomologique de France**. v. 35, p. 427-433, 1999.

TANAKA, A. et al. K. Possibility of the application of synthetic sexpheromone in a small field against the Diamondbackmoth, *Plutella xylostella*. **Procedure association Plant Protection** . Kyushu, Kyushu, Japan, n.36, p.139-142, 1990.

TOLOSA, D. et al. Insecticidal effects of acetogenins from *Rollinia occidentalis* seed extract. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 12, p. 1645-1646, 2012.

TORRES, A. L. **Efeito de extratos aquosos de plantas na biologia de *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2000. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2000.

TORRES, A.L. et al. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pryrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 447-457, 2006.

TORRES, A.L.; BARROS. R; OLIVEIRA, J.V. Efeitos de Extratos Aquosos de Plantas no Desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, p.151-156, 2001.

TRINDADE; R. C. P. et al. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 223-227, 2011.

ULMER, B. et al. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. **Crop Protection**, v.21, p.327-331, 2002.

VENDRAMIN, J.D. **Plantas inseticidas**. In: CONGRESSO BRA-SILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. Resumos. Salvador, v.1, n.1, p.10, 1997.

VERKERK, R.H.J.; D.J. WRIGHT. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. **Pesticide Science**, v.37, p.83-91, 1993.

VOIGT, R. **Tratado de Tecnología Farmacéutica**. Zaragoza (Espanha): Acribia. 1982. 367-375 p.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. **Sistemas dispersos: considerações básicas**. In: DAMODARAN, S. et al. **Química de alimentos de fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 611-660 p.

WATERHOUSE, D.F. *Plutella xylostella*(Linneus) Lepidoptera: Yponomeutidae, diamondback cabbage moth. In: WATERHOUSE, D.F. NORRIS, K.R. (Ed). **Biological control: pacific prospect**. Melbourne: Inkata Pressc. v. 22, p.177-191, 1987.

WRIGHT, K. M. Groundbreaking plant from the Amazon takes on cancer, skeptics, and controversy. **Members Alert, Health Sciences Institute**, v.5, n.7, p.3-6, 2005.

ZANIN, S. M. W. et al. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v. 3, n.1. p. 13-18, 2002.

ZANIN, S. M. W. et al. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2. p. 47-58. 2001.

ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO RC. **O gênero *Trichogramma* na América do Sul**. In: PARRA JRP; ZUCCHI RA. (Ed.) *Trichogramma e o controle aplicado*. Piracicaba: FEALQ, 1997.41-66 p.

3 Emulsão do extrato etanólico de *Annona muricata* L. (Annonaceae) no controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

RESUMO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é a principal praga de brássicas em todo o mundo, principalmente por sua fácil dispersão, curto ciclo e grande capacidade de desenvolver resistência a inseticidas. Por esse motivo, a adoção de métodos de controle alternativo é importante para a elaboração de um plano de manejo integrado para a espécie. Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter uma formulação a base de emulsão estável do extrato etanólico de sementes de *Annona muricata* L. (Annonaceae), avaliar as características organolépticas, analisar a estabilidade dos sistemas formados a longo e curto prazo e avaliar sua atividade sobre a traça-das-crucíferas. Das cinco formas de obtenção da emulsão, apenas a emulsão 5 mostrou-se estável e homogênea utilizando-se as quantidades de 3,5 g de Span, 2 g de Tween, 10 g do extrato orgânico e 85 g de H₂O. Os resultados mostraram que as emulsões guardadas sem a presença do sol direto, apresentaram-se estáveis por três meses e as emulsões que foram submetidas a testes de estabilidade a curto prazo foi observado que quando expostas a altas temperaturas se apresentaram instável no período observado. A estimativa da CL₅₀ e da CL₉₉ foi de 0,03 e 4,26%. A emulsão afetou o desenvolvimento da praga e diminuiu a viabilidade das lagartas cujos resultados encontrados para testemunha, para o controle químico e para CL₅₀ foram 98,3; 70,0 e 70,0%, respectivamente. Porém, mostrou-se eficiente como repelente de oviposição e também afetou negativamente a fase embrionária cujos resultados encontrados para testemunha, para o controle químico, para CL₅₀ e para CL₉₉ foram 96,5; 79,50; 87,0; e 21,50 %, respectivamente. A formulação emulsionável é bastante promissora para ser utilizada pelos agricultores, mas ainda precisam ser realizados testes em campo.

Palavras-chave: Graviola. Traça-das-crucíferas. Formulação.

ABSTRACT

The Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), is the main large plague worldwide, mainly due to its easy dispersion, short cycle and great ability to develop resistance to insecticides. For this reason, the adoption of alternative control methods is important for the development of an integrated management plan for the species. With this, the aim of this study was to obtain a stable emulsion-based formulation of the ethanolic extract of seeds of *Annona muricata* L. (Annonaceae), assess the organoleptic characteristics, analyze the stability of the systems formed in the long and short term and assess their activity on the Diamondback moth. Of the five ways of obtaining the emulsion, only the emulsion 5 showed stable and homogeneous using the quantities of 3.5 g of Span, 2 g 10 mL Tween, orgânico extract and 85 mL of H₂O. The results showed that emulsions stored without direct sun, were stable for three months and the emulsions that were subjected to short-term stability tests it has been observed that when exposed to high temperatures were unstable in the observed period. The estimated LC₅₀ and LC₉₉ were 0.03 and 4.26%. The emulsion affected the development of Prague and decreased the viability of caterpillars whose results found for witness, to the chemical control and LC₅₀ were 98.3; and 70.0; 70.0%, respectively. However, it has been shown effective as oviposition repellent and also negatively affected the embryonic stage whose results found for witness, to the chemical control, to LC₅₀ and LC₉₉ were 96.5; 79.50; 87.0; and 21.50%, respectively the emulsionavel formulation is quite promising for use by farmers, but still needs to be carried out tests in the field.

Keywords: Graviola. Diamondback. Formulation.

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas inseticidas como controle de pragas é bem antiga, sendo o seu uso é desejável principalmente em cultivos orgânicos. Plantas inseticidas utilizadas antes da Revolução Verde voltaram a ser estudadas por características como biodegradabilidade e pouca toxicidade aos seres humanos. Dentre estes vegetais, podem ser citados os da família Annonaceae, ricos em acetogeninas (LORENZI; MATOS, 2002).

Vários estudos tem apresentado efeito inseticida dos extratos de anonáceas para diferentes lepidópteros, como para a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), em que se obteve mortalidade de 82,5% quando acrescentado em dieta artificial contendo extrato de *Rollinia silvatica* A. St.-Hil. (Annonaceae) na concentração de 100% (v/v). Para o curuquerê-da-couve, *Ascia monuste orseis* (Latreille, 1819) (Lepidoptera: Pieridae), esse mesmo extrato mostrou-se altamente eficiente em todas as concentrações de 1/1 a 1/8 (v/v), inviabilizando inclusive a condução do experimento até o final do ciclo de vida dos insetos (MAIRESSE, 2005).

Com relação à atividade frente aos percevejos, os extratos etanólico, hexânico e metanólico de *Annona coriacea* Mart, nas concentrações de 0,5 a 8,0%, ocasionaram mortalidade de 40 a 100% em ninfas de *Dichelops melacanthus* Dallas, 1851 (Hemiptera: Pentatomidae) (SOUZA; CORDEIRO; PEREIRA, 2007). Também o extrato metanólico de *Annona crassiflora* Mart, nas concentrações de 1 a 4%, causou efeito antialimentar em adultos de *Euschistus heros* Fabricius, 1798 (Hemiptera: Pentatomidae) (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009).

Dentre as espécies pertencentes a essa família têm-se a graviola (*Annona muricata* L.), cujos trabalhos mostraram que possui efeito inseticida para algumas espécies, nematicida e bactericida, e a sua semente, fonte promissora de material para a produção de extrato, é descartada no processo de industrialização (HERNÁNDEZ; ANGEL, 1997). A ação biológica pode ser encontrada nas cascas de galhos, raiz e, principalmente, em sementes (BERMEJO et al., 2005; CASTILLO-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ OSORNIO; DELGADO-HERRERA, 2010).

De acordo com TRINDADE et al. (2011), o extrato etanólico de *A. muricata* (5 mg.mL) causou 100% de mortalidade em lagartas de *P. xylostella*, quando expostas por até 12 dias. Nas concentrações mais baixas, também se observou que a viabilidade foi reduzida No controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) em

laboratório, o extrato alcoólico das sementes de *A. muricata* (2%) também apresentou eficácia de 100% (BROGLIO-MICHELETTI et al., 2009).

A crescente preocupação ambiental tem feito os estudos se intensificarem a busca por moléculas de baixa toxicidade aos organismos não alvos, de rápida degradação e de eficácia comprovada para o controle que se deseja efetuar, visando à substituição dos agrotóxicos sintéticos altamente tóxicos (PRATA, 2002). Entre as moléculas que apresentam tais características se destacam os produtos naturais, alternativa promissora que, evolutivamente, passaram a ser produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa contra insetos fitófagos (FERREIRA; CORREIA; VIEIRA, 2001).

Tendo em vista que esses inseticidas naturais, geralmente apresentam uma menor durabilidade tanto após a aplicação, quanto em sua conservação, nota-se a necessidade da elaboração de formulações que possibilitem o aumento da viabilidade desses inseticidas e sua obtenção para os agricultores. Entre os tipos de formulação, pode-se optar pela emulsão, que consiste na mistura entre dois líquidos imiscíveis, utilizando métodos como agitação e adição de homogeneizadores (BAJPAI; GIRI, 2002).

A traça-das-crucíferas *P. xylostella* é considerada na Ásia e nas Américas uma praga que causa sérios danos aos cultivos de brássicas, sendo a principal praga do repolho (CASTELO BRANCO; MEDEIROS, 2001; MACHADO; SILVA; OLIVEIRA, 2007).

Furlong; Wright; Dossall (2013) relataram que os danos causados pela traça-das-crucíferas geram um prejuízo mundial de 4 a 5 bilhões de dólares anualmente, desses, 1,4 bilhão é referente ao controle dessa praga.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter uma formulação a base de emulsão estável do extrato etanólico de sementes de *A. muricata*, avaliar as características organolépticas, analisar a estabilidade dos sistemas formados a longo e curto prazo e avaliar sua atividade sobre a traça-das-crucíferas, além de obter uma nova estratégia de controle alternativo, dentro do manejo integrado da praga.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia: Controle Alternativo de Pragas do Centro de Ciências Agrárias em Rio Largo, AL e no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas, em Maceió, AL.

3.2.1 Condução da cultura

Sementes de couve Georgia, *Brassica oleracea* var. *acephala* (Brassicaceae), foram semeadas, em bandeja de isopor contendo substrato comercial Bioplant® indicado para preparo de sementeira e mantidas em casa de vegetação. Após 35 dias, as mudas foram transplantadas para local definitivo em canteiros de alvenaria preenchidos com mistura de terra preta e torta de filtro na proporção 1:1. Foram adotados tratos culturais segundo Filgueira (2008), exceto a utilização de inseticidas. Folhas de couve foram utilizadas para os experimentos a partir de 40 a 55 dias após o transplântio.

3.2.2 Criação de *Plutella xylostella*

A criação e multiplicação de *P. xylostella* foram realizadas no Laboratório de Entomologia: Controle Alternativo de Pragas, sob condições de temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 67 ± 2 % e fotofase de 12h.

Os adultos foram liberados em gaiolas plásticas transparentes circulares (12 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com abertura lateral fechada com tela antiáfídeo, nas quais eram colocados um pote plástico coberto com espuma umedecida, sobre o qual, colocava-se um disco de folha de couve medindo 8 cm de diâmetro para servir de substrato à postura e uma esponja embebida com solução açucarada a 10%, na parte superior da gaiola, para alimentação dos adultos. Os discos de folhas eram substituídos diariamente, e os discos retirados eram mantidos em placas de Petri de 8 cm de diâmetro até a eclosão das lagartas.

Lagartas recém eclodidas eram transferidas para recipientes plásticos (20 cm de comprimento x 10 cm de largura x 5 cm de altura) contendo várias folhas de couve. As folhas eram trocadas diariamente até as lagartas atingirem a fase de pupa. As pupas foram

transferidas para tubos de vidro de fundo chato (8,5 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro), fechados com filme plástico transparente. Em cada recipiente foram realizados pequenos furos para que houvesse possibilidade de troca de ar. A cada 24 horas, após a emergência, os adultos foram transferidos para as gaiolas.

3.2.3 Preparo dos extratos

As sementes de graviola foram obtidas no município de Anadia – AL, em fábrica de processamento de frutas para confecção de polpa de frutas, acondicionadas em sacos de papel Kraft, secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60°C por 48 horas, moídas em moinho tipo Wiley e acondicionado em recipiente hermeticamente fechado.

O extrato da semente de graviola foi preparado no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

Para o preparo do extrato orgânico primeiramente o pó da semente de graviola foi submetida à extração a frio com hexano [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] em percolador de aço inoxidável. Foram utilizados 2,5 L de hexano em 2,6 kg de pó. Essa extração foi rápida com uma duração de 2 horas, pois foi realizada apenas uma lavagem no pó, e em seguida foi filtrada. O extrato foi submetido à evaporação do solvente com o auxílio de rotavapor a 50°C sob pressão reduzida. Após esse procedimento, o extrato hexânico foi colocado em frasco de vidro previamente pesado e etiquetado e acondicionados aberto para a evaporação máxima do solvente. Após a obtenção do extrato hexânico, sobre a torta resultante da extração com hexano, foi realizado a extração com etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) seguindo a mesma metodologia anterior, porém modificando o solvente, que foram 2L de etanol, permanecendo no pó por 48 horas e o número de repetições, já que foi realizado apenas um ciclo para o extrato hexânico e três ciclos para o etanólico (as mesmas sementes foram utilizadas três vezes seguidas).

3.2.4 Preparo da emulsão

O preparo das emulsões, de água juntamente com o extrato etanólico, foi realizado no Laboratório de Controle alternativo de Pragas seguindo a metodologia descrita por Senhorini (2010), que consistiu em misturar as fases aquosa e oleosa após um pré-aquecimento das duas

fases a uma temperatura de 60°C por um período de 10 minutos e após a junção das duas fases houve um novo aquecimento por mais 15 minutos. Antes da mistura das fases, elas receberam compostos para aumentar a estabilidade da emulsão. A fase oleosa recebeu o tensoativo monoesterato de sorbitano (Span) e a fase aquosa recebeu o componente hidrossolúvel monooleato de sorbitano (Tween). Foram testadas diferentes concentrações do Tween e do Span para verificar o tratamento com melhor estabilidade da emulsão (Tabela 1).

Após o preparo das emulsões em suas diferentes concentrações de Tween e Span com os extratos orgânicos etanólico, as emulsões foram agitadas manualmente e colocadas em repouso em tubos de vidro para a observação da estabilidade no decorrer do tempo por um período de 24 horas.

Tabela 1 - Proporção de homogeneizadores utilizados para o preparo das emulsões do extrato etanólico orgânico da semente de *Annona muricata*.

Emulsão	Span (g)	Tween (g)	Extrato (g)	H ₂ O (g)
1	4,0	1,0	10	85
2	3,5	1,5	10	85
3	3,0	2,0	10	85
4	0,0	5,0	10	85
5	3,5	2,0	10	85

Fonte: Adaptação de Senhorini (2010)

3.2.5 Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis

As emulsões estáveis, sem separação de fases, foram avaliadas por meio de suas características organolépticas (estabilidade física), levando-se em consideração parâmetros físicos como aspecto ou aparência das emulsões. Este estudo teve por objetivo observar o comportamento do produto final por um determinado período, para determinar o prazo de vida útil (*shelf-life*) do mesmo (ZANIN et al., 2001). As emulsões estáveis desenvolvidas

neste trabalho foram avaliadas por três meses. Dentre as características avaliadas foram consideradas: homogeneidade, brilho, macio, fino e opacidade.

Foram realizados testes de estabilidade normais a longo prazo e acelerados de curto prazo. Todos os testes foram feitos em triplicata e após 24 horas do preparo de todas as formulações, período este necessário para que o sistema fosse considerado estável (sem separação de fases).

3.2.6 Testes de estabilidade normais em longo prazo

Nos testes de estabilidade normais, três frascos de vidro contendo 10 mL foram postos em ambiente sob a direta ação solar, três frascos em ambiente com sol indireto e três em ambiente escuro, para formulação que apresentou uma melhor estabilidade em um período de 24 horas. O teste para ambiente com sol indireto foi realizado no interior do laboratório de pesquisa, o teste em ambiente escuro foi realizado uma caixa escura sem luminosidade, o teste da luz direta foi realizado em um local próximo ao laboratório deixado sobre a luz do sol todos os dias. Todo dia, durante três meses, os frascos foram observados, com exceção dos que permaneceram em ambiente escuro, e as características desejáveis, citadas acima, foram observadas (Senhorini 2010).

3.2.7 Testes de estabilidade acelerados em curto prazo

Nos testes de estabilidade acelerados, três frascos de vidro contendo 10 mL da formulação do extrato de *A.muricata* foram postos em estufa a 50°C por 24 horas, em geladeira a 10°C durante 24 horas e foram submetidos a centrifugação durante 50 minutos a 3500 rpm. Decorrido o tempo requerido, as mesmas características citadas acima foram observadas (Senhorini 2012).

3.2.8 Estimativa da CL₅₀ e CL₉₉ da emulsão do extrato etanólico da semente de *Annona muricata*

Foram realizados testes preliminares com diferentes concentrações da emulsão do extrato para determinar valores próximos do Limite Superior (LS), que matasse próximo de 100%, e o Limite Inferior (LI) do extrato, que matasse próximo a testemunha, para ser estimado as concentrações letais.

Após a determinação dos limites do extrato foram avaliadas seis diferentes concentrações: 0,004; 0,01; 0,02; 0,07; 0,18 e 0,5%, correspondentes à sequência a_1 , $a_1 \cdot q$, $a_1 \cdot q^2$, $a_1 \cdot q^3$, $a_1 \cdot q^4$ e $a_1 \cdot q^5$, obtida através da fórmula (BLISS, 1934):

$$q = \left(\frac{a_n}{a_1} \right)^{\frac{1}{n+1}}$$

onde: q = razão da progressão geométrica (pg); n = número de concentrações a extrapolar; a_n e a_1 = limites superior e inferior, respectivamente, da pg (concentrações que provocam mortalidade de cerca de 95% e semelhante à testemunha, respectivamente determinadas através de testes preliminares). As concentrações foram preparadas no momento da utilização através da diluição em água do extrato concentrado. Em seguida os resultados obtidos foram submetidos à análise de Probit pelo programa computacional SAS para estimativa da CL₅₀ e da CL₉₉.

Para a realização dos bioensaios foram obtidos discos de 8 cm de diâmetro de folhas de couve, os quais foram imersos por 30 segundos, nas respectivas suspensões. Para o tratamento testemunha, água destilada pelo mesmo período.

Os discos tratados e não tratados com os extratos foram distribuídos sobre uma superfície coberta com papel toalha, onde permaneceram ao ar livre para evaporação do excesso de água. Lagartas recém-eclodidas foram colocadas em placas de Petri de 15cm de diâmetro, contendo um disco tratado sobre papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, mantidos em laboratório (temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h). A partir do terceiro dia da montagem do experimento, iniciou-se a avaliação da mortalidade larval.

Nesse experimento, foram realizados dez repetições por tratamento contendo seis lagartas em cada repetição e sete tratamentos, o experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado.

3.2.9 Efeito da CL₅₀ na biologia de *Plutella xylostella*

Inicialmente, foram obtidos discos de 8 cm de diâmetro de folhas de couve, os quais foram imersos por 30 segundos, nas respectivas suspensões, conforme os procedimentos recomendados pelo Grupo Internacional das Associações Nacionais de Fabricantes de Produtos Agroquímicos (GIFAP) para lagartas que se alimentam de folhas de hortaliças (Guedes et al., 1995). Para o tratamento testemunha, água destilada pelo mesmo período.

Os discos tratados e não tratados com os extratos foram distribuídos sobre uma superfície coberta com papel toalha, onde permaneceram ao ar livre para evaporação do excesso de água. Lagartas recém-eclodidas foram colocadas em placas de Petri de 15cm de diâmetro, contendo um disco tratado sobre papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, mantidos em laboratório (temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h). A partir do terceiro dia da montagem do experimento, iniciaram-se as avaliações da mortalidade larval, a qual foi realizada a cada dois dias onde era realizada a troca das folhas velhas por folhas novas.

Nesse experimento, foram realizados dez repetições por tratamento contendo seis lagartas em cada repetição e três tratamentos, o experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado. Para a testemunha foi utilizado um tratamento sem nenhum produto, o segundo tratamento foi o padrão a base de Decis 25CE (deltametrina), e o terceiro tratamento foi com a CL₅₀ da formulação do extrato etanólico de *A. muricata*. Quando as lagartas se transformavam em pupas, eram coletadas diariamente e individualizadas em tubos de vidro, observando-se diariamente a emergência dos adultos. Para efeito, foram avaliadas as seguintes variáveis biológicas: duração e viabilidade das fases larval, e pupal e longevidade de adultos.

3.2.10 Efeito da emulsão do extrato orgânico de *Annona muricata* na fase embrionária de *Plutella xylostella*

Dois casais da traça-das-crucíferas com até 12 h de idade foram selecionados para a oviposição e colocados em gaiolas plásticas idênticas àquelas da criação. Após 24 horas de exposição aos adultos, os discos foram retirados das gaiolas e, de acordo com a metodologia de Torres et al. (2006), cortou-se os discos para que ficassem com 20 ovos em cada repetição. Em seguida, os ovos foram imersos nos extratos nas concentrações letais (CL₉₉ e CL₅₀), e na testemunha, além do tratamento químico com o produto Decis 25CE (deltametrina), na concentração recomendada de 33 mL para 100L de água.

O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições tendo cada uma o mínimo de 20 ovos da praga. Diariamente foi analisado o número de lagartas eclodidas, sendo confrontado com o número de ovos em que se observaram o córion transparente, indicativo de ter ocorrido a eclosão. Essas avaliações ocorreram durante cinco dias e foram realizadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica de 10x. A análise estatística foi realizada pela comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2015).

3.2.1 Teste de não preferência para oviposição de *Plutella xylostella*

Para os testes com chance de escolha, discos de folhas de couve ‘Georgia’ com 8 cm de diâmetro foram imersos nos extratos nas concentrações letais (CL₉₉ e CL₅₀), na testemunha e no tratamento químico por 30 segundos e postos sobre papel toalha para secagem ao ar livre; em seguida, divididos em partes, obtendo-se quatro círculos menores (com 3 cm de diâmetro) com dimensões semelhantes.

Assim, foi formado um conjunto, constituído por quatro discos dispostos alternadamente sobre papel de filtro levemente umedecido com água destilada, sendo dois tratados com os extratos (um com a CL₅₀ e outro com a CL₉₉), outro com a testemunha e um tratado com o químico DECIS 25CE (deltametrina). Esse conjunto foi colocado em gaiolas idênticas às utilizadas na criação de *P. xylostella*. Quatro casais de *P. xylostella* com até 12 horas de idade, provenientes da criação, foram introduzidos nas gaiolas e mantidos por 24

horas para oviposição sendo alimentados com solução açucarada a 10%, embebida em esponja presa na parte superior da gaiola.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (CL₅₀, CL₉₉, Químico e Testemunha) com dez repetições para o experimento com a emulsão do extrato etanólico. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa ASSISTAT versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2015).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Emulsão

Após o preparo de diferentes combinações de Span 60 e o Tween 80, as emulsões 2, 3 e 5 ficaram estáveis após 24 horas em repouso, ou seja, não ocorreu separação de fases, tendo apresentado aparência leitosa e cremosa. A de número 4 apresentou separação de fases como pode ser observado na Figura 5. As emulsões 2 e 3 apresentaram relativa homogeneidade, com a presença de poucos grumos (aspecto de coalhada), sendo este considerado um resultado bom. Porém, a emulsão mais estável foi a 5, na qual apresentou-se homogênea, ausente de grumos, considerado este um resultado excelente (Tabela 2 e Figura 5-E).

Essa estabilidade observada no presente trabalho foi semelhante à apresentada por Senhorini (2010) que encontrou no preparo das emulsões do óleo de *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), seguindo o mesmo protocolo, das cinco emulsões testadas (Tabela 1), sendo que apenas a emulsão 4 (a que não utilizou Span, e usou 5g de Tween) não estabilizou e separaram rapidamente as fases.

Trabalhos com a utilização de emulsões de nim já foram realizados, como no de Araújo Junior; Marques; Oliveira (2009), os quais avaliaram a emulsão de Natuneem a 1 e 2%, com resultados de 81 e 90 % de mortalidade do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt., 1843) (Hemiptera: Aphididae).

A obtenção de uma emulsão estável é uma característica importantíssima, pois viabiliza a utilização desse tipo de formulação na prática pelo agricultor, pois não ocorrerá quebra das fases durante a aplicação do produto no campo. Como também, sabe-se que o tensoativo Span 60 ou monoesterato de sorbitol, é um surfactante não iônico, utilizado na solubilização de óleos em água e o Tween 80 ou polissorbato 80, é também um surfactante não iônico. Ambos são bastante utilizados como estabilizantes em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos, com grande possibilidade, portanto, de causarem pouca influência nos testes de toxicidade frente aos testes biológicos (SENHORINI, 2010).

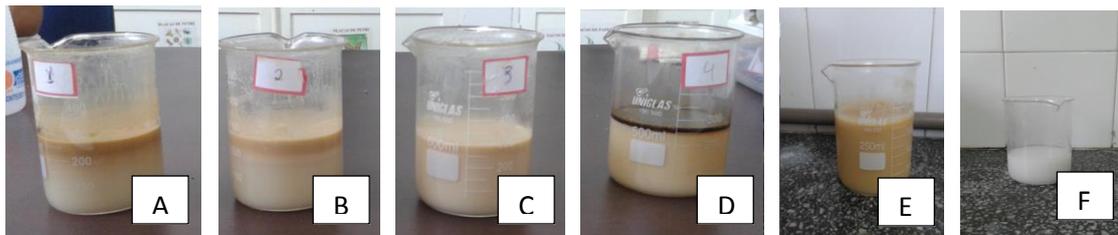
É importante destacar, que uma emulsão contendo os mesmos constituintes, exceto o extrato etanólico de *A. muricata* (testemunha) também foi preparada (Figura 5-F) e apresentaram-se transluzentes com uma coloração esbranquiçada.

Tabela 2 - Emulsões preparadas com óleo vegetal de *A.muricata* com Span 60 e Tween 80 em proporções diferentes.

Emulsão	Span (g)	Tween (g)	Observação após 24 hs	Aspecto	Resultado
1	4,0	1,0	Instável	Separado	Ruim
2	3,5	1,5	Instável	Relativamente homogêneo	Médio
3	3,0	2,0	Instável	Relativamente homogêneo	Médio
4	0,0	5,0	Instável	Separado	Ruim
5	3,5	2,0	Estável	Homogêneo	Excelente

Fonte: Adaptação de Senhorini (2010)

Figura 5 - Emulsões com separação de fases, emulsão 1-A, emulsão 2-B, emulsão 3- C, emulsão 4-D e a emulsão 5-E apresentando-se mais estável com o extrato etanólico de *Annona muricata* e o 5-F o aspecto da emulsão obtida sem o óleo (“testemunha”)



Fonte: Autoria própria (2015)

3.3.2 Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis

3.3.2.1 Testes de estabilidade normais em longo prazo

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios anteriores foram feitos os testes de estabilidade com a melhor emulsão que se apresentou estável por um período de 24 horas. Com relação à estabilidade física das emulsões, em termos de aparência e de aspecto, as mesmas, tanto expostas em ambientes com sol indireto ou escuro apresentaram a mesma estabilidade durante os três meses estudados, quanto a não separação de fases aquosa e oleosa. Porém, quando a emulsão foi exposta a ambiente com sol direto a sua qualidade foi alterada, tornando-a heterogênea, ou seja, com separação das fases, com brilho opaco e aparência fina devido a presença da fase oleosa do produto (Tabela 3).

De acordo com a literatura, para avaliação do aspecto ou aparência do produto final, é preciso definir primeiramente as características que se deseja (ZANIN et al., 2001). Portanto, dentre estas características organolépticas, é desejado que as emulsões apresentem, como qualidades aceitáveis, homogeneidade, brilho, macio, fino e opacidade. Dentro destas qualidades, o produto final que se apresentar heterogêneo, opaco, fibroso, grosso e opalescente, são considerados defeitos sérios encontrados nas emulsões formuladas. Por outro lado, homogêneo, brilhante, macio, fino e translúcido ou perolado constitui-se em características desejáveis para este tipo de produto (ZANIN et al., 2001).

Os resultados encontrados com a emulsão do extrato etanólico de *A. muricata* diferiram dos resultados encontrados com o extrato de *C. guianensis* estudados por Senhorini (2010), cujas emulsões avaliadas em ambiente com sol indireto, sol direto e em ambiente escuro foi observado que elas mantiveram seu aspecto físico homogêneo, brilhante, macio, fino e opaco.

Se nas três condições de armazenamento das emulsões, apenas a que foi estocada em ambiente que tende a elevar a temperatura e ter muita exposição da luz solar, foi a que alterou as características organolépticas do produto, pode-se inferir que a emulsão não deve ser armazenada sob a luz solar e a altas temperaturas, pois pode comprometer não só a estabilidade, mas também, ocorrer a degradação do princípio ativo do extrato.

Tabela 3 - Estudo da estabilidade em ambiente com sol indireto, sol direto e em ambiente escuro realizado na cidade de Rio Largo/AL entre os meses de janeiro a abril de 2015.

Características avaliadas	Três meses de avaliação (sol indireto e ambiente escuro)	Três meses de avaliação (sol direto)
Homogeneidade	Homogêneo	Heterogêneo
Brilho	Brilhante	Opaco
Macio	Macio	Macio
Fino	Grosso	Fino
Opacidade	Opalescente	Opalescente

Fonte: Autoria própria (2015)

Essa mesma recomendação também foi observada num trabalho realizado por Scott; Kaushik (2000), cujos autores colocaram o extrato de azadiractina em exposição à luz do sol e observaram uma meia vida de 36 à 48h, demonstrando maior sensibilidade do composto à luz. De acordo com Mordue (Luntz); Morgan; Nisbet (2005), uma das maiores preocupações das empresas é formular produtos que impeçam a degradação da azadiractina por hidrólise e fotodegradação. Além de que a atividade da azadiractina pode ser reduzida 60 % após quatro horas de exposição ao sol (MARTINEZ, 2002; CORREIA et al., 2009).

Como também, Caboni et al. (2006) avaliaram a degradação da azadiractina (formulação Oikos®) em laboratório e determinaram uma meia vida de 0,8 dias. Os autores determinaram que a luz (ou radiação solar) é o principal responsável pela degradação do composto.

Essa alternativa de se trabalhar com formulações de extratos vegetais para solucionar problemas de cobertura e melhor eficiência de aplicação também foi evidenciada por Forim et al. (2010), numa proposta de nanoencapsular produtos naturais, como o óleo de nim, propiciando maior estabilidade e proteção das moléculas, fundamentalmente para manter a ação inseticida desses produtos em condições de campo, já que os processos de degradação, de intensidade variável ao longo do tempo, dependem de fatores ambientais como a temperatura, umidade e radiação.

3.3.2.2 Testes de estabilidade acelerados a curto prazo

Os testes de estabilidade acelerados em curto prazo mostraram que a estabilidade física das emulsões estudadas, em termos de aparência e de aspecto foi alterada apenas quando foram expostas a ciclos de estresse relacionados a um aumento drástico na temperatura dos sistemas (Tabela 4). Estas alterações sofridas quanto as suas características avaliadas são consideradas como defeitos sérios e não aceitáveis, como já relatado, nos testes de estabilidade normais em longo prazo.

No mesmo trabalho realizado por Senhorini (2010) com extrato de *C. guianensis* foi encontrado que a aparência e o aspecto da emulsão foram alterados quando expostas a altas temperaturas e a submissão das rotações, diferindo da emulsão de *A. muricata* apenas na agitação do produto por rotação em centrífuga.

Tabela 4 - Avaliação das propriedades organolépticas das emulsões em curto prazo sob diferentes estresses.

Características avaliadas	Curto prazo (Geladeira a 10 °C)	Curto prazo (Centrífuga a 3500ppm)	Curto prazo (Estufa a 50 °C)
Homogeneidade	Homogêneo	Homogêneo	Heterogêneo
Brilho	Opaco	Brilhante	Brilhante
Macio	Macio	Macio	Macio
Fino	Fino	Fino	Grosso
Opacidade	Opalescente	Opalescente	Opalescente

Fonte: Autoria própria (2015)

Tendo em vista que os inseticidas naturais, geralmente apresentam uma menor durabilidade tanto após a aplicação (BLEICHER, 2012), quanto em sua conservação, se faz necessário desenvolver formulações para que tenham a mesma fixação e a mesma eficiência que os produtos químicos. Esses extratos de plantas podem ter várias fases, o mais simples sendo o óleo-em-água. Portanto, formulações como alguns nanopesticidas, incluindo nanoemulsões têm um tamanho de partícula de 100-200 nm, e exibem propriedades úteis, tais como a rigidez, a permeabilidade, a cristalinidade, estabilidade térmica a solubilidade e biodegradabilidade (BORDES; POLLET; AVÉROUS, 2009).

Os nanopesticidas também podem oferecer grande área de superfície específica e, portanto, aumento da afinidade para o alvo. Além disso, as nanoformulações devem degradar-se rapidamente com teores de resíduos abaixo dos critérios reguladores nos gêneros alimentícios (Khot et al., 2012). Seguindo o mesmo princípio, as emulsões devem ser estáveis e uniformes a fim de favorecer uma boa cobertura no campo da atividade inseticida do extrato vegetal, sem deixar resíduos no ambiente e em baixas concentrações.

3.3.3 Testes biológicos com a emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de *Annona muricata* no controle de *Plutella xylostella*

3.3.3.1 Estimativa da CL₅₀ e CL₉₉ da emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de *Annona muricata* para *Plutella xylostella*

A estimativa das concentrações letais da emulsão do extrato etanólico da semente de graviola se ajustou ao modelo de Probit com o valor de $p = 0,1182$. Pela análise, a CL₅₀ (IC_{95%}) estimada para a emulsão do extrato da semente de graviola foi 0,03% (podendo variar entre 0,02 e 0,04) e a CL₉₉ (IC_{95%}) foi de 4,26% (podendo variar entre 1,83 a 14,69) (Tabela 5).

Tabela 5 - Estimativa das concentrações letais da emulsão com o extrato etanólico da semente de *Annona muricata*

Emulsão	n ¹	GL ²	Inclinação ±EP	CL ₅₀ (IC _{95%}) ³ (mL.mL ⁻¹)	CL ₉₉ (IC _{95%}) ³ (mL.mL ⁻¹)	X ²	p ⁴
Extrato Etanólico	60	4	1,10 ± 0,11	0,03 (0,02 - 0,04)	4,26 (1,83 – 14,69)	7,35	0,11

* EP: Erro-padrão; CL: Concentração letal; X²: Qui-quadrado.

¹ n: Número de insetos utilizados no teste.

² GL: Graus de liberdade.

³ IC: Intervalo de confiança.

⁴ P: Probabilidade > 0,05

Fonte: Autoria própria (2015)

A estimativa das concentrações letais determinadas no trabalho de Gomes (2013), com o mesmo extrato etanólico de graviola utilizado nesse trabalho, foi de 0,01 e 0,08%, para CL₅₀

e CL₉₉, respectivamente. Percebe-se que esses valores encontrados pelo referido autor foram menores do que as concentrações encontradas nesse estudo. O que se pode especular é que ao se preparar a formulação, torna-se necessário um aquecimento para garantir a estabilidade da emulsão, e com isso, pode-se ter havido uma perda da atividade dos compostos bioativos com a temperatura de 50°C, fazendo com que, as concentrações letais fossem maiores, de 0,03 e 4,26%, para as CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente. Deve-se levar em consideração também, que a emulsão formulada a partir do extrato bruto foi de apenas 10%, e, portanto, uma maior concentração foi necessária para conseguir matar as lagartas de *P. xylostella*.

A ação inseticida de formulações de extratos de plantas no controle de *P. xylostella* já é conhecida na literatura, porém, a estimativa da concentração letal, é um parâmetro de extrema importância nos estudos toxicológicos porque determina a potencialidade em termos de melhor concentração letal para ser utilizada como planta inseticida. Dentre esses estudos, o mais comum é com formulações do óleo de nim como foi evidenciado por Torres; Barros; Oliveira (2001), os quais testaram o extrato aquoso e uma formulação comercial da amêndoa da semente de nim a 10 % e verificaram que os extratos mataram 100% das lagartas. Por Priyono; Hassan (1993) que mostraram a eficácia da formulação de óleo de nim (azadiractina: 2,5%) em brócolis nas concentrações de 1,8; 2,4 e 3,0L/ha e por Verkerk; Wright (1993) que avaliaram a atividade das formulações de nim AZT (30mg/mL⁻¹) e NEEem-AZAL(3mg/mL⁻¹) e AZ (azadiractina sintética) com mortalidade entre 50,0 e 90,0% numa concentração de 1 µg de AZ mL⁻¹ em 13 dias de avaliação. A formulação de AZT causou a mortalidade de lagartas e reduziu a alimentação e o peso das lagartas.

Com relação à estimativa das concentrações letais, Torres et al. (2006), apresentaram resultados similares no controle de *P. xylostella* onde a CL₅₀ estimada para lagartas de primeiro ínstar foi de 0,06% com extrato aquoso de *A. indica*. Estudos da CL₅₀ de extratos aquosos de *A. indica* para *P. xylostella* foram também realizados por SOMBATSIRI et al. (1986), que obtiveram concentrações letais de 0,84% e 8,6%, para o segundo e quarto ínstars larvais respectivamente, o uso dessas concentrações maiores podem ser justificados pelo uso das lagartas maiores.

Como também, Marcomini (2009) utilizou formulação de óleo de nim (Organic Neem[®]) e estimou a CL₅₀ de 0,74% em dieta artificial e 0,64% em plantas de milho para *S. frugiperda*. Essa diferença observada entre espécies de insetos se deve, ao menos em parte, ao tamanho das lagartas, demonstrando a importância das estimativas de CL₅₀ para a espécie em estudo.

Quanto a eficácia de emulsões de nim resultados encontrados por Silva (2005) mostrou que ao avaliar nanocápsulas e emulsão de nim a 1% sobre *S. frugiperda* constatou que houve mortalidade de 90 a 100% das lagartas em tempo inferior a seis dias. E resultados de Fernandes et al. (2010) proporcionaram uma alternativa no controle de populações de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), uma vez que a emulsão de nim na concentração de 10% apresentou uma mortalidade de 10,2% de eficiência, isso mostra a importância do uso de uma formulação, podendo reduzir as populações das pragas e conseqüentemente os problemas ocasionados ao homem e meio ambiente, podendo ser uma tática viável, além disso com viabilidade econômica. Tendo em vista que esses inseticidas naturais, geralmente apresentam uma menor durabilidade tanto após a aplicação, quanto em sua conservação, nota-se a necessidade da elaboração de formulações que possibilitem o aumento das suas viabilidades.

3.3.3.2 Efeito da CL₅₀ da emulsão do extrato etanólico da semente de *Annona muricata* na biologia de *Plutella xylostella*

A emulsão do extrato etanólico de *A. muricata* e o tratamento químico apresentam uma viabilidade larval de *P. xylostella* com percentuais em torno de 70%, diferindo estatisticamente da testemunha pelo teste de Tukey (F= 5,89 ; p<0,0074), que apresentou 98,33% de viabilidade mostrando que esses tratamentos foram mais expressivos na mortalidade das lagartas recém-eclodidas, tornando-as incapazes de passar para a fase de pupa (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias \pm DP da viabilidade e duração das fases larval e pupal e longevidade do adulto de *Plutella xylostella* tratadas com a emulsão do extrato etanólico orgânico da semente de *Annona muricata*

	Viabilidade larval (%) \pm DP	Duração larval (dias) \pm DP	Viabilidade pupal (%) \pm DP	Duração pupal (dias) \pm DP	Longevidade adulto (dias) \pm DP
Testemunha	98,33 \pm 5,27 a	9,8 \pm 1,03 a	80,00 \pm 13,15 a	3,50 \pm 0,53 a	3,4 \pm 0,52 a
Padrão	70,00 \pm 25,82 b	8,7 \pm 0,67 b	66,66 \pm 19,25 a	3,10 \pm 0,74 a	3,2 \pm 0,79 a
Emulsão CL₅₀	70,00 \pm 25,82 b	8,7 \pm 0,67 b	66,66 \pm 19,25 a	3,10 \pm 0,74 a	3,2 \pm 0,79 a
CV%	26,81	8,96	24,54	20,87	21,73

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

*DP = Desvio Padrão

CV% = Coeficiente de variação

Fonte: Autoria própria (2015)

A duração larval diferiu estatisticamente a 1% no teste de Tukey ($F=6,11$; $p<0,0064$), como pode ser observado na Tabela 6, cujos tratamentos com a emulsão do extrato etanólico e o tratamento químico diferiram da testemunha, porém não diferiram entre si. Essa duração larval mais curta nos tratamentos, em torno de um dia, se deu em detrimento à mortalidade das lagartas ter ocorrido logo no início do desenvolvimento, causando uma pequena diferença na duração da fase, portanto, um resultado diferente do que geralmente é relatado nos estudos com plantas inseticidas, onde há uma tendência de prolongamento da fase larval. Como no estudo de Roel; Vendramim (2000) com o efeito do extrato acetato de etila de *Trichila pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *S. frugiperda* e concluíram que doses menores que não provocaram a mortalidade total, afetaram a sobrevivência e alongaram a fase larval do inseto.

Quanto à viabilidade e duração pupal, não foram observadas diferenças significativas, apresentando uma viabilidade de 80 % para testemunha e para os demais tratamentos de 66,66% e na duração pupal uma média de três dias (Tabela 6).

Embora não tenha havido influência dos extratos na duração da fase de pupa de *P. xylostella*, é importante salientar que o atraso ou a completa inibição dessa fase têm sido observado em outras espécies de insetos tratados com extratos de *A. indica* ou seus derivados e metabólitos, bem como de outras meliáceas, a exemplo do ocorrido em *S. frugiperda* (RODRIGUEZ; VENDRAMIM, 1997) e *Spodoptera exempta* Walker, 1856 (Lepidoptera: Noctuidae), (TANZUBIL; MCCAFFERRY, 1990). Essa discrepância pode ser decorrente da

aplicação dos extratos ter sido feita apenas no primeiro ínstar larval, conseqüentemente ter havido tempo suficiente para a degradação das substâncias tóxicas dos extratos até a pupação, já que foi realizada apenas uma aplicação da emulsão do extrato etanólico de *A. muricata*.

Na longevidade do adulto as médias foram iguais para os tratamentos com a emulsão do extrato etanólico e para tratamento químico apresentando 3,2 de duração ($F=0,26$; $p=0,07694$). A testemunha apresentou um período de longevidade de 3,4 dias não diferindo estaticamente dos demais tratamentos (Tabela 6).

Embora os tratamentos não tenham diferido estatisticamente é importante ressaltar uma diminuição das médias encontradas na longevidade dos adultos no tratamento com a emulsão do extrato etanólico e no tratamento com o controle químico, pode estar relacionado ao menor consumo alimentar na fase larval, comprometendo a melhor formação da pupa, pois pupas menores têm grande possibilidade de produzirem adultos menores e mais fracos, com menor capacidade de competição para desenvolver as atividades vitais da espécie, como afirma Rodríguez; Vendramim (1997).

Isso se torna importante no manejo da cultura, pois a utilização do produto natural poderá ser uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente, contribuindo diretamente no contexto do manejo integrado de pragas. Porém é importante relatar que, embora trabalhos científicos apontem para correlação direta entre maior eficiência de controle e o aumento das concentrações dos extratos, experimentos realizados em campo muitas vezes diferem dos de laboratório por não apresentarem controle total sobre as variáveis, pois são conduzidos em uma situação real com interações complexas com o ambiente.

3.3.3.3 Efeito da emulsão do extrato orgânico de *Annona muricata* na fase embrionária de *Plutella xylostella*

A viabilidade dos ovos de *P.xylostella* foi afetada, após a aplicação da emulsão do extrato etanólico de *A. muricata*, pois apenas $21,50 \pm 10,55$ % dos ovos foram viáveis, ao aplicar a CL_{99} . O experimento se mostrou diferente significativamente a 1% de probabilidade para o teste de Tukey ($F=98,25$; $p<0,0001$), sendo que apenas o tratamento da emulsão com a CL_{50} (87,0%) não diferiu estatisticamente da testemunha, que apresentou $96,50 \pm 5,29$ % de ovos viáveis (Tabela7).

Tabela 7 - Comparação de médias através da Viabilidade (%) \pm DP dos ovos de *Plutella xylostella* tratados com a emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de *Annona muricata* e com o produto químico Decis 25CE.

Tratamentos	% Lagartas eclodidas \pm DP*
Testemunha	96,50 \pm 5,29 a
Padrão	79,50 \pm 15,17 b
Emulsão CL ₅₀	87,00 \pm 9,77 ab
Emulsão CL ₉₉	21,50 \pm 10,55 c
CV% **	15,16

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$);

*DP= Desvio padrão; **CV%= Coeficiente de variação; *** CL₅₀ e CL₉₉ = concentração letal.

Fonte: Autoria própria (2015)

O tratamento com o inseticida químico Decis, mesmo sem ter diferido da testemunha, ainda apresentou uma viabilidade de ovos considerada alta com uma média de $79,50 \pm 15,17\%$. Esse resultado mostra uma eficácia da emulsão, pois conseguiu inibir a perpetuação da praga mais eficientemente que o inseticida químico recomendado. Isso mostra, possivelmente, uma provável resistência adquirida do inseto ao produto químico, pois no Brasil, a resistência de *P. xylostella* a deltametrina, foi relatada por Castelo Branco; Amaral (2002) e Oliveira et al. (2011).

Os efeitos de extratos de plantas na sobrevivência da fase embrionária de lepidópteros também são pouco conhecidos, em especial a ação ovicida dos compostos bioativos (TRINDADE et al., 2000). Porém, Torres et al. (2006) obtiveram dados semelhantes na avaliação da fase embrionária de *P. xylostella* quando os ovos foram submetidos a três extratos de plantas que foram *A. indica* na concentração 0,06% (m/v), *M.azedarach* na concentração 12,5% (m/v) e *A. pryriifolium* na concentração 7% (m/v) as lagartas apresentaram uma mortalidade de 100, 100 e 40% respectivamente, esses resultados foram obtidos após a avaliação realizada aos dez dias do confinamento.

Porém, Machado; Silva; Oliveira (2007) destacaram que o efeito ovicida pode variar de acordo com a espécie do inseto e com as características das substâncias utilizadas, pois algumas plantas que apresentam atividade inseticida ocasionam baixo ou nenhum efeito sobre os ovos. Tal fato pôde ser verificado no experimento realizado com os diferentes extratos aquosos de 10% p/v de Erva de Santa Maria, *Chenopodium ambrosioides* (Linnaeus)

(Amaranthaceae), Eucalipto Cheiroso, *Corymbia citriodora* (Hill & Johnson) (Mrytaceae), Crisântemo, *Chrysanthemum leucanthemum* (Linnaeus) (Asteraceae) e *A. indica* (Nim) sobre a porcentagem de lagartas eclodidas de *S. frugiperda*, ou seja, não apresentaram ação ovicida (MAZZONETTO et al., 2013).

Nesse experimento, notou-se que a inviabilidade da fase embrionária pela emulsão do extrato foi correlacionada com as concentrações dos mesmos, mostrando assim, que a ação ovicida aumenta à medida que se aumenta a concentração da emulsão. Isso quer dizer, que a concentração estimada para matar as lagartas de *P. xylostella*, também afeta os ovos da praga e, isto é importante, quando o produto for adotado no campo favorecendo a um controle de diferentes fases da praga.

3.3.3.4 Teste de não preferência para oviposição de *Plutella xylostella*

A CL_{99} da emulsão do extrato etanólico diferiu a 1% de probabilidade no teste de Tukey, ($F=23,17$; $p<0,0001$), de todos os outros tratamentos. Notou-se que as porções das folhas de couve tratadas com o extrato apresentaram menores quantidades de ovos, mostrando assim, que o extrato, interfere na escolha de oviposição da traça-das-crucíferas, e que o aumento da concentração do extrato proporcionou menores quantidades de ovos (Tabela 8).

Esse comportamento também foi encontrado por Medeiros; Boiça Junior; Torres (2005) que avaliaram extratos de frutos de *S. saponaria* e de *E. contortisilliquum* e folhas de *Tradescantia pallida* (Commelinaceae) na concentração de 10% na repelência de oviposição da *P. xylostella*, obtendo repelência de oviposição de até 100%. Valores próximos podem ser observados com o uso da concentração letal do extrato etanólico da semente de graviola, em concentrações bem menores, que obteve repelência de oviposição de quase 100% para as concentrações letais de ambos os extratos, o aumento dessa concentração pode ocasionar uma deterrência de 100%.

Tabela 8 - Média \pm DP de ovos de *Plutella xylostella* depositados em folhas de couve tratadas com a emulsão do extrato orgânico etanólico da semente de *Annona muricata*, da testemunha e do tratamento padrão.

Tratamento	Nº ovos \pm DP*
Testemunha	23,50 \pm 5,33 a
Padrão	23,80 \pm 7,78 a
CL ₅₀ ***	21,50 \pm 7,90 a
CL ₉₉ ***	3,70 \pm 3,12 b
CV%**	35,05

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

*DP= Desvio padrão

**CV%= Coeficiente de variação

***CL₅₀ e CL₉₉ = concentração letal que mata 50% e 99% dos indivíduos, respectivamente.

Fonte: Autoria própria (2015)

Jesus et al. (2011) obtiveram um número médio de ovos de *P. xylostella* por disco de couve a 10% de cada extrato testado, onde a média total de ovos após 4 dias de análise foram respectivamente de 280,00; 313,33; 231,16 e 252,50, nos diferentes tratamentos, não diferiram significativamente entre si, mas todas diferindo da testemunha, que teve uma média de 556,83, mas um aspecto observado foi que os extratos *A. indica* (Nim), *S. saponaria* (Sabão de soldado), *D. mollis* (Faveira) e *S. adstringens* (Barbatimão) apresentaram efeito deterrente para a oviposição de adultos.

Em outro estudo, foi observado que, Medeiros; Boiça Júnior; Torres (2005) obtiveram altos valores de porcentagem média de deterrência na oviposição de *P. xylostella* para extratos aquosos a 10% de folhas de *N. tabacum* (99,5%) e de *A. indica* (89,1%).

Da mesma forma, porém testando extratos em concentrações mais baixas, TORRES et al. (2006) obtiveram porcentagem média de repelência de 10,4%, testando extratos aquosos de amêndoas de *A. indica* e 16,0% de frutos de *M. azedarach*. Por outro lado, LIANG et al. (2003) observaram que três inseticidas comerciais à base de nim (Agroneem, Ecozin e Neemix) não apresentaram ação como deterrentes na oviposição de *P. xylostella*.

Segundo Gupta; Thorsteinson (1960), a oviposição de diversos lepidópteros geralmente é mediada por mecanismos sensoriais, mecânico e químico-receptores e, com isso, a emulsão do extrato etanólico de *A. muricata*, libera algum volátil repelente para a oviposição.

Outro resultado semelhante encontrado foi por Dequech et al. (2009) onde os extratos aquosos a 10% de folha de cinamomo, de ramo de cinamomo e de pó-de-fumo, além de DalNeem® a 10%, reduziram a oviposição de *P. xylostella* em folhas de couve em pelo menos 50% em relação à testemunha. Outro estudo importante é o de Charleston et al. (2005), que avaliaram o extrato de cinamomo e nim sobre a preferência de oviposição de *P. xylostella*, mostrando que o extrato de cinamomo diferiu da testemunha com 75% de deterência de oviposição enquanto que o nim não diferiu da testemunha.

3.4 Conclusões

O desenvolvimento de uma formulação emulsionável se apresenta viável para o extrato etanólico de *A. muricata*.

A melhor emulsão encontrada foi a emulsão 5 contendo, 3,5 g de Span, 2,0 g de Tween, 10 g do extrato orgânico etanólico de *A. muricata* e 85 g de água.

A emulsão do extrato etanólico de *A. muricata* deve ser armazenada em um local fresco, arejado e ao abrigo da luz para ter uma boa durabilidade por um período de três meses.

A emulsão do extrato etanólico de *A. muricata* afeta a biologia de *P. xylostella* apenas na fase larval.

A emulsão do extrato etanólico de *A. muricata* apresenta efeito ovicida e é repelente para a oviposição.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO JUNIOR, J.M.; MARQUES, E.J.; OLIVEIRA, J.V. Potencial de Isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do Óleo de Nim no Controle do Pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 520-525, 2009.
- BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. **Reactive and Functional Polymer**, v. 53, p. 125-141, 2002.
- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 269-303, 2005.
- BLEICHER, E. **Manejo de pragas agrícolas com inseticidas alternativos**. Fortaleza: PET Agronomia – UFC. 2012. 34 p.
- BLISS, C.I. The method of probits. **Science**, Washington, v.79, p.38-39, 1934.
- BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L., Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**. v.34, 125–155, 2009.
- BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 44-48, 2009.
- CABONI, P. et al. Residues e persistence of neem formulations on strawberry after field treatment. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 10026-10032, 2006.
- CASTELO BRANCO, M.; AMARAL, P.S.T. Inseticidas para controle da traça-das-rucíferas: como os agricultores os utilizam no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 410-415, 2002.
- CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M. A. Impacto de inseticidas sobre parasitoides da traça-das-crucíferas em repolho no Distrito Federal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2001.

- CASTILLO-SÁNCHEZ, L. H. C.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J. J.; DELGADO-HERRERA, M. A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, n. 3, p. 445-462, 2010.
- CORREIA, A.A. et al. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 83-91, 2009.
- CHARLESTON, D. S. et al. Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. **Bulletin of Entomological Research**, v.95, p. 457-465, 2005.
- DEQUECH, S.T.B. et al. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.551-554, 2009.
- FERNANDES, J.I. et al Eficácia larvicida de uma emulsão contendo 10% de óleo de nim (*azadirachta indica*) no controle de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32 p. 25-30, 2010.
- FERREIRA, J.T.B.; CORREA, A.G.; VIEIRA, P.C; **Produtos Naturais no Controle de Insetos**, Edufscar, 2001. 30 p.
- FILGUEIRA, FA.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa. MG: Universidade Federal de Viçosa, 3. ed. 2008. 421 p.
- FORIM, M.R. et al. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. **Analytical Methods**, London, v. 2, p. 860–869, 2010.
- FURLONG, M. J.; WRIGHT, D. J.; DOSDALL, L. M. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. **Annual Reviews Entomology**, v.58, p. 517-541, 2013.
- GOMES, I. B. **Toxicidade e Formulação de Extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae) para o Controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**.

2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 2013.

GUEDES, R.N.C. et al. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae). **Journal Ecology Entomology**. v.31, p. 145-150, 1995.

GUPTA, P. D.; THORSTEINSON, A. F. Food plant relationships of the diamondback moth (*Plutella maculipennis*Curt.). II. Sensory regulation of oviposition of the adult female. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.3, p.305-314, 1960.

HERNANDÉZ, C.R.; ANGEL, D.N. **Anonáceas con propiedades insecticidas**. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H. Anonáceas produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). p. 229-239, 1997.

JESUS, F.G. et al. Efeito de plantas inseticidas no comportamento e biologia de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.78, n.2, p. 279-285, 2011.

KHOT, L. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. **Crop Protection**. v.35, p.64–70, 2012.

LIANG, G.M. et al. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v.22, n.2, p.333-340, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, L.A., SILVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M.. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **O Biológico**, v.69, p.103-106. 2007.

MARCOMINI, A.M. **Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MAIRESSE, L.A.S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005. 330 f. Tese (Doutorado em Produção vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MARTINEZ, S.S. (Ed.). **O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002.142 p.

MAZZONETTO, F. et al. Ação de inseticidas botânicos sobre a preferência alimentar e sobre posturas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuide) em milho. **Entomo Brasilis**.v.6, 2013.

MEDEIROS, C.A.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; TORRES, A.L.Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traçadas-crucíferas, em couve. **Bragantia**, v.64, n.2, p.227-232, 2005.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; MORGAN, E.D.; NISBET, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier, p. 117-135. 2005.

OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, M. J. Efeito antialimentar do extrato metanólico de *Annona crassiflora* Mart. sobre o percevejo marrom *Euchistus heros* (Fabr. 1798) (Heteroptera: Pentatomidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 2633-2636, 2009.

OLIVEIRA, A.C. et al. Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p. 154-159, 2011.

PRATA, F. **Comportamento do Glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. Tese Doutorado, 2002.148f. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PRIJONO, D.; HASSAN, N. Laboratory and field efficacy of neem (*Azadirachta indica* A.Juss) extracts against 2 broccoli pests. **Journal of plant diseases and protection**, v.100, n.4, p. 354-370, 1993.

RODRÍGUEZ, H.C.; VENDRAMIM, J.D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Agricultura**, v. 72, p. 305-318, 1997.

ROEL A.R.; VENDRAMIM, J.D. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 799-808, 2000.

SCOTT, M.; KAUSHIK, N.M. The toxicity of neem insecticide to populations of Culicidae and other aquatic invertebrates as assessed *in situ* microcosms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 39, p. 329-336, 2000.

SENHORINI, G.A. et al. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization. **Ciência dos Materiais e Engenharia**, v. 32, p. 1121-1126, 2012.

SENHORINI, G. A. **Micropartículas poliméricas de PHBV e emulsões contendo extrato vegetal de *Carapa guianensis***: desenvolvimento, caracterização e aplicação. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SILVA, A. D. **Ação inseticida de óleo de Nim, *Azadirachta indica* nas formulações de nanocápsula, pó molhável e concentrado emulsionável sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2005.106f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Agronomia. São Paulo, Jaboticabal. 2005

SILVA, F de A.S.; AZEVEDO, C.A.V.de A. ASSISTAT, **Assistência estatística**. Versão 7,7 beta 2015.

SOMBATSIRI, K. et al. In: **INTERNATIONAL NEEM CONFERENCE**, Nairobi, Kenya. v.3. p.195-203, 1986.

SOUZA, E. M.; CORDEIRO, J. R.; PEREIRA, M. J. B. Avaliação da atividade inseticida dos diferentes extratos das sementes de *Annona coriacea* sobre *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851). Resumos do V CBA – Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1150-1153, 2007.

TANZUBIL, P.B.; MCCAFFERY, A. R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, v.9, p.383-386, 1990.

TORRES, A.L. et al. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pryrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*.

Bragantia, v. 65, n. 3, p. 447-457, 2006.

TORRES, AL.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical**

Entomology, v.30, p. 151-156, 2001.

TRINDADE, R.C.P. et al. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, p.407-413, 2000.

TRINDADE; R. C. P. et al. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 223-227, 2011.

VERKERK, R.H.J.; WRIGHT, D. J. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. **Pesticide Science**, v.37, p.83-91, 1993.

ZANIN, S. M. W. et al. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 47-58. 2001.

4 Estudo das frações químicas do extrato etanólico de *Annona muricata* L. (Annonaceae) no controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

RESUMO

Estudos fitoquímicos têm identificado uma série de produtos naturais em espécies de Annonaceae, com destaque para as acetogeninas. Com isso, objetivou-se neste trabalho realizar o fracionamento do extrato etanólico de *A. muricata*, a fim de verificar a presença de acetogeninas como princípio ativo principal, monitorado pelo reagente de Kedde, com atividade biológica para *P. xylostella*. Realizou-se uma partição líquido-líquido com a utilização de solventes em ordem crescente de polaridade. Em seguida, com a fração mais ativa obtida em teste de ação biológica, fez-se uma filtração em funil com sílica, sendo todas as frações ativas monitoradas pelo reagente de Kedde para a triagem da presença de acetogeninas. Na partição, a fração clorofórmica foi a que apresentou uma maior percentagem de mortalidade com 67,74% na CL₅₀ e ao aplicar a CL₉₉ uma mortalidade de 98,3%. Na filtração obtiveram-se seis frações que foram: metanólica, acetato de metila, hexânica, 10% acetato + 90% hexano, 25 % acetato + 75% hexano e 50% acetato+ 50% hexano, com médias de mortalidade de 38,23; 53,16; 38,24; 43,26; 64,76 e 43,18%, respectivamente. Todas as frações ativas, extrato bruto, fração clorofórmica, acetato e 25 % acetato+ 75% hexano, apresentaram coloração violácea no teste com o reagente de Kedde em cromatografia de camada delgada (CCD), positiva para acetogeninas. Desta forma, conclui-se que o princípio ativo responsável pela atividade biológica do extrato etanólico da semente de *A. muricata* para *P. xylostella*, trata-se de acetogeninas.

Palavras-chave: Semente de graviola. Traça-das-crucíferas. Partição. Purificação.

Cromatografia

ABSTRACT

Phytochemical studies have identified a number of natural products in species of Annonaceae, with emphasis on the acetogeninas. With this, the aim in this work accomplish the fractionation of the ethanolic extract of *A. muricata*, in order to determine the presence of acetogeninas as main active ingredient, monitored by kedde reagent, with biological activity to *P. xylostella*. A liquid-liquid partition with the use of solvents in increasing order of polarity and then, with the most active fraction obtained in test of biological action, a filtering funnel with silica, being all active fractions by Kedde reagent for the screening for the presence of acetogeninas. In the partition, the chloroform fraction was presented a higher percentage of mortality with 67.74% on LC50 and when applying the LC₉₉ a mortality rate of 98.3%. In filtering six fractions were obtained that were methanol, Methyl acetate, hexane, 10% + 90% acetate, hexane, 25% + 75% acetate 50% acetate, hexane and + 50%, hexane, with mortality of 38.23; 53.16; 38.24; 43.26; 64.76 and 43.18%, respectively. All active fractions, crude extract, chloroform, acetate and fraction 25% + 75% acetate, hexane, violet coloration with test submitted the Kedde reagent in thin layer chromatography (CCD), positive for acetogeninas. Thus, it is concluded that the active ingredient responsible for the biological activity of ethanolic extract from the seed of *A. muricata* to *P. xylostella*, it is acetogeninas.

Keywords: Extract. Graviola. *Plutella xylostella*. Partition. Purification. Chromatography

4.1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais têm uma longa e bem sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos exibem complexa interação com o meio ambiente e produzem metabólitos utilizados para sua sobrevivência. Como consequência do papel biológico para os organismos produtores, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de aplicação biológica (PUPO et al., 2006).

Se for considerada a existência de mais de 250.000 plantas no planeta (SILVA-AGUAYO, 2012) e que só continuam existindo, graças a mecanismos de defesa, físicos, morfológicos e principalmente químicos, tem-se a mão um vasto material para a descoberta de novos inseticidas botânicos. Já o Brasil, segundo Maciel et al. (2010), apresenta enorme riqueza botânica, com 56 mil espécies de plantas. Nas últimas décadas, a investigação sobre a interação entre as plantas e os insetos revelou a potencial utilização de metabólitos secundários de plantas para esta finalidade (KAMARAJ et al., 2010).

Dentre as plantas com potencial inseticida, têm-se às espécies pertencentes à família Annonaceae com diversos trabalhos com diferentes espécies desde os anos 90. As anonáceas se destacam por apresentarem em sua composição substâncias bioativas com alta atividade sobre insetos, conhecida como acetogeninas (ACGs) (ALALI et al., 1999).

O Brasil tem se sobressaído como um respeitável produtor e consumidor de frutas, e a graviola *Annona muricata* L. (Annonaceae), é empregada, principalmente, na indústria de polpas alimentícias para refrescos, geleias, doces e sorvetes. A literatura etnofarmacológica registra vários usos medicinais baseados no senso comum, que lhe atribui várias propriedades, embora a eficácia e a segurança de suas preparações não tenham sido todas, ainda, comprovadas cientificamente (PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2004; REIS, 2011).

Estudos fitoquímicos têm identificado uma série de produtos naturais em espécies de Annonaceae, com destaque para as (ACGs), até então isoladas de um pequeno número de gêneros (*Annona*, *Asimina*, *Xilopia*, *Goniothalamus* e *Uvaria*). As ACGs possuem estruturas diversificadas e poderosas propriedades citotóxicas, com aplicações potenciais na geração de fármacos (compostos antitumorais) e de inseticidas agrícolas (COLOM et al., 2007; 2008; BLESSING et al., 2010).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou determinar a sua presença, quando não se dispõe de estudos químicos

sobre a espécie de interesse. A análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001; GAMBETA, 2008).

Estudos químicos com a *A. muricata* conduziram ao isolamento de compostos de diversas classes, tais como acetogeninas, alcaloides, terpenoides, carboidratos, polifenóis, lipídeos e aminoácidos, e algumas dessas substâncias estão associadas ao sequestro dos radicais livres formados nos processos degenerativos (ANGELO; JORGE, 2007; VILANOVA et al., 2013). Todavia, nos últimos anos, as pesquisas fitoquímicas acerca desta espécie se dirigiram ao isolamento de compostos da classe das ACGs, principalmente a partir das folhas (LUNA, 2006; RIBEIRO et al., 2010).

Em virtude dos relatos do potencial das ACGs sobre diferentes pragas, faz-se necessária a intensificação dos estudos relacionados a essa classe de compostos, possibilitando, dessa forma, a descoberta de possíveis moléculas novas que possam ser utilizadas na síntese de compostos inseticidas com qualidades superiores (CASIDA; QUISTAD, 1998).

A espécie *Plutella xylostella* L., ou traça-das-crucíferas, é considerada praga-chave das brássicas em todo o mundo (GODIN; BOIVIN, 1998), podendo atacar couve, couve-flor, brócolis, entre outras (GALLO et al., 2002). A importância econômica da praga está relacionada ao seu hábito alimentar. As larvas de primeiro instar minam as folhas enquanto as de segundo e terceiro estádios consomem todo o tecido foliar, com exceção da epiderme superior. Já as larvas de quarto instar se alimentam de todas as partes das folhas (CASTELO BRANCO et al., 1997), causando sérios prejuízos aos agricultores. O seu controle vem sendo realizado principalmente com o uso de inseticidas químicos sintéticos, no entanto, estes produtos vêm selecionando populações resistentes da praga (TALEKAR; SHELTON, 1993; CASTELO BRANCO et al., 1997). Além disso, estes produtos ainda promovem danos irreparáveis ao meio ambiente, como contaminação do alimento, toxicidade aos mamíferos e persistência no solo (GONÇALVES et al., 2001).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar as frações químicas do extrato etanólico de *A. muricata*, a fim de determinar a presença de acetogeninas como princípio ativo principal, monitorado pelo reagente de kedde, com atividade biológica para *P. xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório: controle alternativo de pragas do Centro de Ciências Agrárias e no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais (LPqRN) , ambos da Universidade Federal de Alagoas.

4.2.1 Condução da cultura

Sementes de couve cultivar Georgia, *Brassica oleracea* var. *acephala* (Brassicaceae), foram semeadas em casa-de-vegetação, em bandeja de isopor contendo substrato comercial Bioplant® indicado para preparo de sementeira. Após 35 dias, as mudas foram transplantadas para local definitivo em canteiros de alvenaria preenchidos com mistura de terra preta e torta de filtro na proporção 1:1. Foram adotados tratos culturais segundo Filgueira (2008), exceto a utilização de inseticidas. Folhas de couve foram utilizadas para os experimentos a partir de 40 a 55 dias após o transplântio.

4.2.2 Criação de *Plutella xylostella*

A criação e multiplicação de *P. xylostella* foram realizadas no Laboratório de Entomologia: controle alternativo de pragas, sob condições de temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 67 ± 2 % e fotofase de 12h.

Os adultos eram liberados em gaiolas plásticas transparentes circulares (12cm de diâmetro x 15cm de altura) com abertura lateral fechada com tela antiáfídeo. Em cada gaiola foi colocado um pote plástico coberto com espuma umedecida, sobre o qual, foi colocado um disco de folha de couve medindo 8 cm de diâmetro para servir de substrato à postura, no sentido de simular a folha em condições de campo, e uma esponja embebida com solução açucarada a 10%, na parte superior da gaiola, para alimentação dos adultos. Os discos de folhas eram substituídos diariamente, e mantidos em placas de Petri de 8 cm de diâmetro até a eclosão das lagartas. Lagartas recém-eclodidas, oriundas de posturas realizadas em folhas de couve, foram transferidas para recipientes plásticos maiores (20 cm de comprimento x 10 cm de largura x 5 cm de altura) contendo várias folhas de couve. As folhas foram trocadas

diariamente até as lagartas atingirem a fase de pupa. As pupas foram transferidas para tubos de vidro de fundo chato (8,5 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro), fechados com filme plástico transparente. Em cada recipiente foram realizados pequenos furos para que houvesse possibilidade de troca de ar. A cada 24 horas, após a emergência, os adultos foram transferidos para as gaiolas.

4.2.3 Coleta das sementes e preparo dos extratos

As sementes de graviola foram obtidas no município de Anadia – AL, em fábrica de processamento de frutas para confecção de polpa de frutas, acondicionadas em sacos de papel Kraft, secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60°C por 48 horas, moídas em moinho tipo Wiley e acondicionado em recipiente hermeticamente fechado.

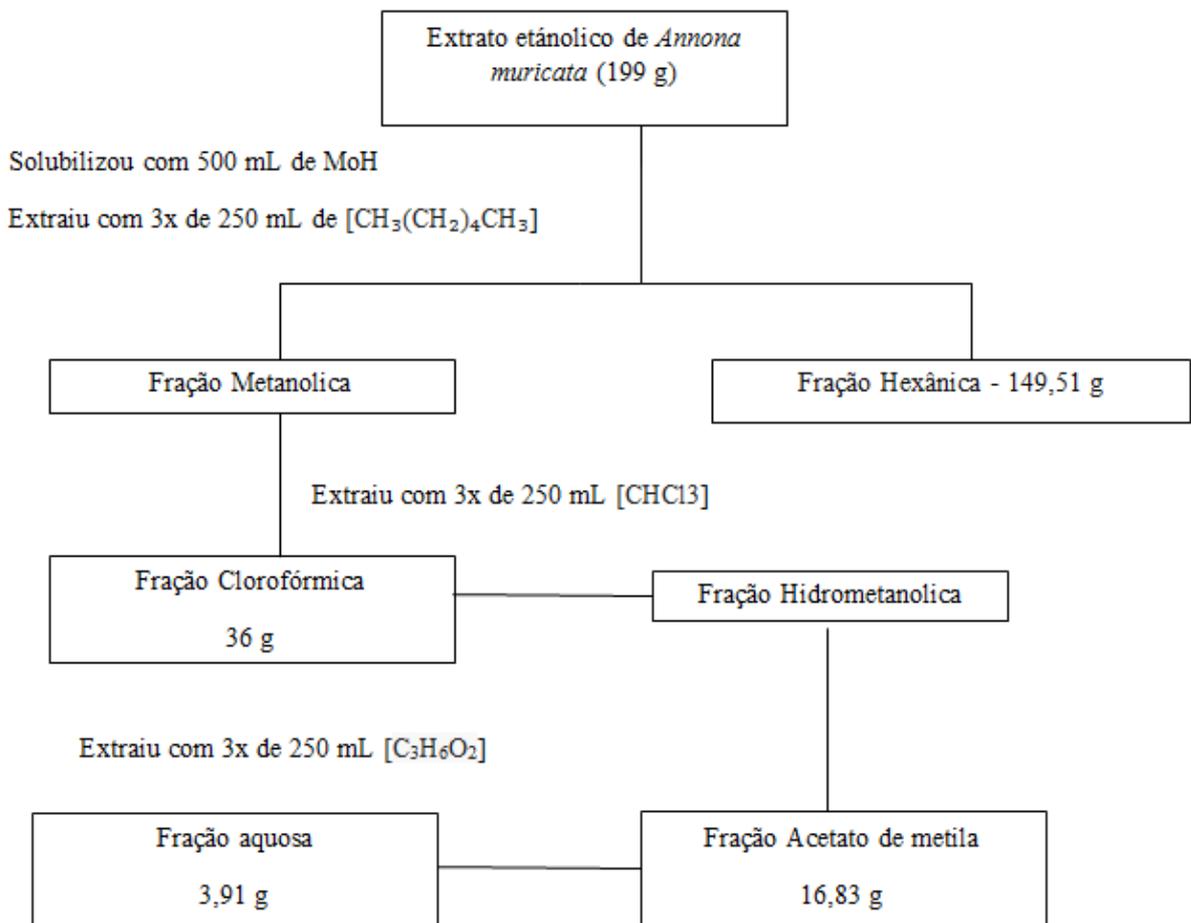
O pó da semente de graviola foi submetido à extração a frio com hexano [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] em percolador de aço inoxidável. Foram utilizados 2,5 L de hexano em 2,6 kg de pó. Essa extração foi rápida com uma duração de 2 horas, pois foi realizada apenas uma lavagem no pó, e em seguida foi filtrada. O extrato foi submetido à evaporação do solvente com o auxílio de rotavapor a 50°C sob pressão reduzida. Após esse procedimento, o extrato hexânico foi colocado em frasco de vidro previamente pesado e etiquetado e acondicionado aberto para a evaporação máxima do solvente. Após a obtenção do extrato hexânico, sobre a torta resultante da extração com hexano, foi realizado a extração com etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) seguindo a mesma metodologia anterior, só modificando o solvente, que foram 2L de etanol, permanecendo no pó por 48 horas e o número de repetições, já que foi realizado apenas um ciclo para o extrato hexânico e três ciclos para o etanólico (as mesmas sementes foram utilizadas três vezes seguidas). Porém após os testes realizados anteriormente, foi verificado que o extrato que possui uma maior atividade inseticida foi o extrato etanólico, sendo necessária uma análise mais profunda para isolar e identificar os constituintes químicos que se encontram presente nesse extrato.

4.2.4 Estudo das frações químicas do extrato etanólico da semente de *Annona muricata*

4.2.4.1 Partição líquido-líquido do extrato orgânico da semente de *Annona muricata*

Na partição líquido-líquido, o extrato etanólico foi ressuspensão em metanol utilizando-se um funil de separação e solventes orgânicos de polaridades crescentes, hexano $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]$, clorofórmio $[\text{CHCl}_3]$ e acetato de metila $[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2]$, como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Partição líquido-líquido com diferentes solventes no extrato etanólico da semente de *Annona muricata*.



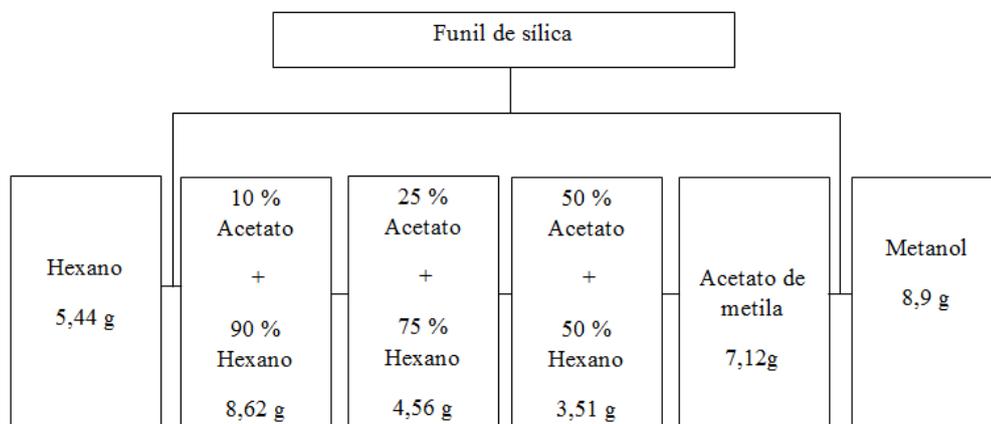
Cada fração obtida da partição foi testada com lagartas recém eclodidas de *P. xylostella* com a CL_{50} (0,02 mL. mL⁻¹) e CL_{99} (0,1 mL. mL⁻¹) estimadas pela análise de Probit realizada por Gomes (2013). Os experimentos foram realizados com discos de 8 cm de diâmetro de folhas de couve, contendo seis lagartas, os quais foram imersos por 30 segundos, nas respectivas suspensões, e para o tratamento testemunha, os discos foram imersos em água destilada pelo mesmo período e com dez repetições cada tratamento.

Os discos tratados e não tratados com os extratos foram distribuídos sobre uma superfície coberta com papel toalha, onde permaneceram ao ar livre para evaporação do excesso de água. Lagartas recém-eclodidas foram colocadas em placas de Petri de 15cm de diâmetro, contendo um disco tratado sobre papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, acondicionados em laboratório (temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h). A partir do terceiro dia da montagem do experimento, iniciaram-se as avaliações da mortalidade larval.

4.2.4.2 Purificação do extrato etanólico da semente de *A.muricata*

Mediante os resultados obtidos no bioensaio anterior, a fração mais ativa da partição líquido-líquido de *A. muricata* foi submetida a um novo fracionamento feito com um funil de separação contendo sílica. A fração foi pesada e 36 g do material foram adicionados a sílica em medida aleatória em uma cápsula de porcelana misturando-se os conteúdos até secarem através da obtenção de um pó. Em seguida, colocou-se esse material em um funil de 1L de capacidade juntamente com mais sílica, e algumas misturas de solvente, obtendo-se, assim, mais seis frações (Figura 7).

Figura 7 - Purificação com diferentes solventes no extrato de semente de *A.muricata*.



Cada fração obtida da filtração foi testada com lagartas recém-eclodidas de *P. xylostella* seguindo mesmo procedimento experimental anterior, porém com CL_{10} (0,004 mL.mL⁻¹), estimada pela análise de Probit realizada por Gomes (2013).

4.2.4.3 Obtenção do reagente de Kedde

Seguindo a metodologia descrita por LUNA (2006), o reagente de Kedde foi obtido por dissolução de 5,6 g de hidróxido de potássio em água destilada até obtenção de 50 mL de solução, seguido da adição de 1 g de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 50 mL de metanol. Esse reagente é específico para revelação de subunidades \square -lactonas α , β -insaturadas presentes em alguns tipos de acetogeninas.

4.2.4.4 Teste para acetogeninas

A amostra vegetal, de cada fração bioativa, foi solubilizada em metanol e submetida à cromatografia em camada delgada (CCD). Com o auxílio de capilares a amostra foi aplicada em placa de sílica tendo como eluente acetato e metanol (AcOEt:MeOH) na proporção de 3:1. Após eluição o cromatograma foi revelado com reagente de Kedde, sendo a cor violácea positiva para o teste da presença de acetogeninas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Fracionamento da partição líquido-líquido do extrato orgânico da semente de *Annona muricata*

A mortalidade das lagartas de *P.xylostella* foi afetada, após a aplicação de todas as frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato etanólico de *A. muricata*. Porém, a fração clorofórmica foi a que apresentou uma mortalidade maior, embora não tenha diferido estaticamente das demais frações, apresentando $67,74 \pm 17,09$ % ao aplicar a CL₅₀ e, não diferindo da fração com acetato de etila ao aplicar a CL₉₉ com $98,3 \pm 5,37$ % de mortalidade (Tabela 9). O experimento mostrou diferença significativamente a 1% de probabilidade para o teste de Tukey ($F=14,85$; $p<0,001$), para os testes realizados com a CL₅₀ e para os testes realizados com a CL₉₉ também se mostrou significativo a 1% de probabilidade para o teste de Tukey ($F=104,7$; $p<0,001$).

Tabela 9 - Avaliação das CLs referentes às partições líquido-líquido, do experimento com extrato de semente de *A.muricata* analisando a mortalidade das traças das crucíferas.

Partições	CL ₅₀ (0,02%) ±DP*	CL ₉₉ (0,1%) ±DP*
Testemunha	5,1 ± 8,21 b	5,10 ± 8,21 d
F. Clorofórmica	67,74 ± 17,09 a	98,3 ± 5,37 a
F. Acetato de metila	58,13 ± 21,02 a	91,54 ± 11,92 ab
F. Hexânica	63,18 ± 24,48 a	36,65 ± 10,43 c
F. Aquosa	61,52 ± 30,44 a	79,82 ± 20,48 b
CV%	30,01	19,89

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de

Tukey ($P \leq 0,05$)

*DP= Desvio padrão

Cunha et al. (2006) observaram que extratos em clorofórmio ou diclorometano são capazes de apresentar atividade inseticida sobre diversas espécies de insetos, mesmo tendo sido obtidos de estruturas e de espécies de plantas inseticidas distintas.

Apesar dos dois solventes (hexano e clorofórmio) possuírem polaridades diferentes, o solvente em clorofórmio pode ter extraído compostos medianamente polares devido a forças de atração intermolecular de alguns compostos apolares com compostos de polaridade intermediária. No entanto, dentro de um mesmo grupo químico poderão ser constatadas substâncias com diferentes bioatividades sobre *P. xylostella*.

Foi possível verificar que a fração clorofórmica na concentração mais elevada CL₉₉ causou um efeito inseticida com mortalidade bastante elevada das lagartas, porém à medida que se testou a concentração subletal (CL₅₀) a atividade inseticida foi diminuindo devido a menor taxa da mortalidade dos insetos. Isso poderia ser atribuído à presença de compostos tóxicos não específicos, ou de substâncias com propriedades fago-inibidora e inibidoras do crescimento existentes nas folhas de *A. muricata*. Esse fato corrobora com resultados de Ratnayake et al. (1992), os quais mostraram que as acetogeninas de anonáceas apresentam propriedades fago-inibidora em doses baixas e podem ser fatais em doses elevadas.

Os solventes usados para a extração de acetogeninas são variados, tais como: água (PÉREZ-PACHECO et al., 2004), etanol (BOBADILLA et al., 2002), acetona (KHALEQUZZAMAN; SULTANA, 2006), clorofórmio (PARVIN et al., 2003), éter de petróleo (ÁLVAREZ et al., 2008) e hexano (FONTANA et al., 1998). A partir desta informação, pode-se inferir que acetogeninas podem variar de muito polares, tais como as extraídas pela água e etanol, a não polar, que é extraído por hexano.

Valores obtidos por Decio et al. (2013) foram muito próximos ao encontrado neste estudo para os solventes diclorometano e dimetilsulfóxido (7,29%), bem como no estudo realizado por Sanada-Morimura; Matsumura (2011) para acetona e metanol. Vários são os estudos do efeito de solventes (acetona, água deionizada, diclorometano dimetilsulfóxido, metanol e etanol) utilizados na ressuspensão de extratos vegetais sobre os diferentes táxons de insetos (CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2010).

Da mesma forma que a *A. muricata*, outras espécies de anonáceas contêm componentes tóxicos, principalmente acetogeninas, que dão a planta propriedades inseticidas. Neste trabalho, foi possível mostrar que os extratos das sementes de *A. muricata* exibem um efeito inseticida significativo. Com o objetivo de melhor avaliar o potencial da *A. muricata*

como uma alternativa para inclusão em um programa de manejo de pragas, estudos mais detalhados da fitoquímica dos metabólitos secundários desta planta, são necessários.

4.3.2 Purificação do extrato etanólico da semente de *Annona muricata*

A mortalidade das lagartas de *P. xylostella* foi elevada, em todas as frações passadas pela purificação do funil com sílica, mesmo estando na CL₁₀ cuja concentração é baixa de 0,004% (Tabela 10). Porém, a fração de 25% Acetato + 75% Hexano foi a que apresentou uma mortalidade maior com uma média de $64,76 \pm 10,67$ % ao aplicar a CL₁₀ e o resultado foi significativo a 1% de probabilidade para o teste de Tukey ($F=4,55$; $p<0,001$).

Tabela 10 - Avaliação das CL₁₀ referente às frações extraídas através da purificação com o funil de sílica, do experimento com extrato de semente de *A.muricata* analisando a mortalidade das traças das crucíferas.

Frações do funil de sílica	CL ₁₀ (0,004 %) ± DP*
Testemunha	13,3 ± 17,18 b
Metanol	38,23 ± 8,21 ab
Acetato	53,16 ± 13,23 a
Hexânico	38,24 ± 21,97 ab
10% Acetato + 90% Hexano	43,26 ± 8,96 ab
25% Acetato + 75% Hexano	64,76 ± 10,67 a
50% Acetato + 50% Hexano	43,18 ± 10,67 ab
CV%	44,17

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

*DP= Desvio padrão

As lagartas mortas pela ação dos extratos apresentaram escurecimento acentuado e tamanho reduzido. Muitas delas morreram durante a ecdise, por não conseguirem liberar totalmente a exúvia, que tipicamente permanece presa à parte posterior do abdome, produzindo a coloração escura observada. Essas alterações morfológicas podem ter sido resultantes do efeito de componentes químicos no sistema hormonal do inseto. Mordue; Blackwell (1993), também observaram sintomas semelhantes em lagartas submetidas a diferentes doses de azadiractina, e atribuíram essas alterações à redução na concentração do ecdisônio ou atraso da sua liberação na hemolinfa.

Extratos de sementes de *A. squamosa* também demonstraram possuir propriedades inseticidas (GRITSANAPAN, 1997; CATARINO; EZEQUIEL, 1999). Através do fracionamento monitorado pela atividade biológica do extrato das sementes, Londershausen et al. (1991) estabeleceram que dois dos princípios ativos eram as acetogeninas anonina I e anonacina A.

O uso potencial de espécies de *Annona* para o controle de pragas foi demonstrado por Prates et al. (1999) que avaliaram a atividade inseticida das sementes de araticum (*A. crassiflora*) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) uma praga do milho. Extratos de araticum ocasionaram 100% de mortalidade das lagartas 12 dias após a eclosão, indicando que a planta pode ser uma fonte potencial de inseticidas naturais no controle dessa praga.

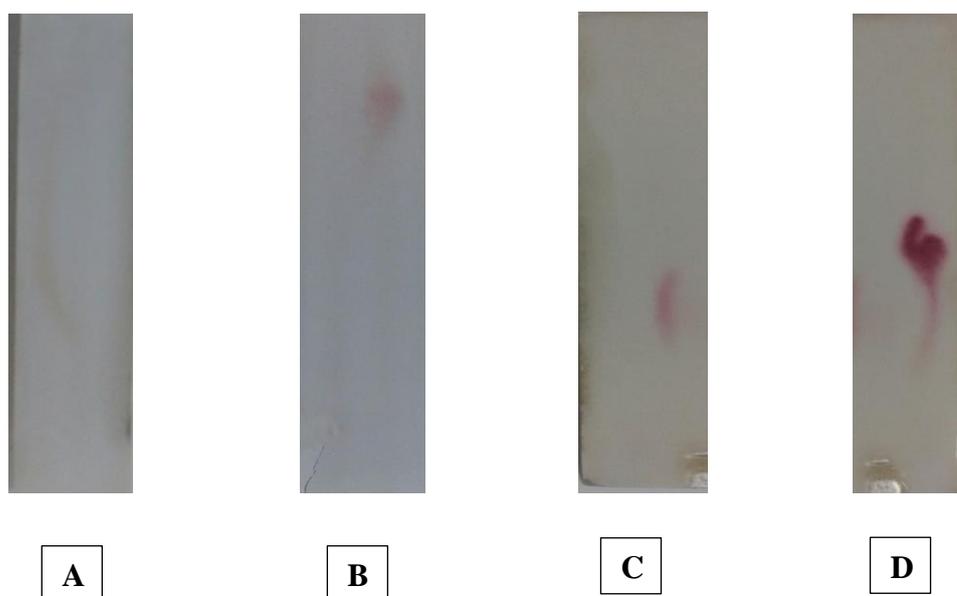
Através dos resultados obtidos, a utilização dos extratos de graviola seria uma ferramenta adicional para o controle das traça-das-crucíferas. No entanto, novos estudos deverão ser realizados, principalmente em campo. Segundo Castillo-Sánchez et al. (2010), são escassos os trabalhos relacionados às anonáceas em ambiente real e com insetos benéficos.

4.3.3 Teste para acetogeninas

Através da formação de coloração violácea nas placas de CCD foi possível detectar a presença de acetogeninas (Figura 8) nas amostras bioativas do extrato etanólico bruto na fração clorofórmica e nas frações purificadas de acetato e a 25% Acetato + 75% Hexano. Também foi possível perceber que, com o avanço da purificação das frações químicas, a coloração violácea foi ficando mais ativa, devido a concentração do princípio ativo.

Com esse resultado positivo, é possível concluir que o que pode ter ocasionado as mortes das lagartas de *P. xylostella* foram as acetogeninas que estão presentes nas sementes de graviola, pois, Chang et al. (2003) encontraram oito acetogeninas mono-THF: muricina H, muricina I, cis-anomontacina, anonacina, anonacinone, anomontacina, murisolina, xilomaticina e uma bis- THF: anocatacina A em *A. muricata*.

Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico (A), na fração clorofórmica (B), na fração 25% acetato + 75% hexano (C) e na fração acetato (D).



Resultados semelhantes também foram encontrados por Cavé et al. (1997), que nos extratos de *Annona cornifolia*, frações e grupos resultantes foram submetidos à análise por CCD, cujas placas foram pulverizadas com reagente Kedde e indicou um resultado positivo para γ -lactonas α , β -insaturadas, comumente encontradas em acetogeninas.

De acordo com Ugoline (2012) a cromatoplaça foi pulverizada com a solução A, seguida imediatamente da solução B. Este reagente detecta lactonas de cinco membros α , β -insaturadas, apresentando como resultado positivo o desenvolvimento na CCDS de manchas de coloração violeta, resultado semelhante quando foi registrado a presença da coloração violeta apresentada na pelo teste realizado através de CCD no presente trabalho.

A fração hexânica do extrato de *A. cornifolia* foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se como eluentes hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol com gradiente de polaridade crescente, sendo obtidas 166 frações que foram reunidas em 15 grupos com base em seu perfil por cromatografia em camada delgada de sílica, cujo grupo 9 (frações 30-44; 596 mg) indicou, após revelação com reagentes de Dragendorff e Kedde e análise do espectro no IV, a presença de acetogeninas (SANTOS; PIMENTA; BOAVENTURA, 2007) que se assemelham, com os resultados encontrados com o extrato etanólico de *A. muricata* que também foi utilizado o reagente de kedde e apresentou uma coloração violeta confirmando a presença de acetogenina.

Segundo Luna (2006) cinco frações derivadas da cromatografia em coluna de sílica da folha de *A. muricata* definidas como compostos AM2, AM3, AM4, AM5 e AM6 foram todos isolados sob a forma de um material com aspecto de cera. O isolamento desses compostos foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa, uma vez que a cromatografia em coluna aberta não foi eficiente na separação desses compostos. E também mostrou uma revelação positiva com o reagente de Kedde que indicou a natureza dessas substâncias como acetogeninas.

4.4 Conclusões

A fração clorofórmica apresenta uma mortalidade mais elevada da partição líquido-líquido;

Na purificação em funil com sílica, a fração 25% Acetato + 75% Hexano é a mais ativa;

Através da formação de coloração violácea revelada em CCD é possível detectar a presença de acetogeninas em todas as frações ativas biologicamente, sendo intensificada com o avanço da purificação.

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins: recente progress. **Journal of Natural Products**. v. 62, n.3, p.504-540, 1999.
- ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: potente toxicity against insecticide-susceptible and - resistant german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 641-649,1998.
- ÁLVAREZ, O. et al. Toxic effects annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, v.81, p. 85- 89, 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos** – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, n.1, p.1-9, 2007.
- BLESSING, L.T. et al. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 83, p. 307-310, 2010.
- BOBADILLA, M. et al. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller (chirimoya) y *Annona muricata* Linnaeus (guanábana) sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. **Revista Peruana de Biología**. v. 9, p. 64-73, 2002.
- CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Gold age of insecticide research: past, present or future. **Annual Reviews Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 1-16, 1998.
- CATARINO, P.S.; EZEQUIEL, M.D. Control de moscas de la fruta com extractos de anona *Annona squamosa* L. (ANNONACEAE). In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS, II, Chiapas. Proceedings**. Chiapas: Universidade de Chiapas, p.85-86, 1999.
- CASTELO BRANCO, M.; FRANCA, F.H; VILLAS BOAS, G. L. Traca-das-cruciferas *Plutella xylostella* – Artropodes de importancia economica. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, Campinas, n. 4, p. 1-3, 1997.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L. H. C. et al. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, n. 3, p. 445-462, 2010.

CAVÉ, A. et al. Acetogenins from Annonaceae. In: CAVÉ, A. et al. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. New York: Springer-Wien, p.81-289, 1997.

CHANG, F. R. et al. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**. v. 69, p.241-246, 2003.

COLOM, O.A. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 80, p. 63-67, 2007.

COLOM, O.A. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 81, p. 85-89, 2008.

CUNHA, U. S. et al. Frações de *Trichilia pallens* com atividade inseticida sobre *Tuta absoluta*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1579-1585, 2006.

DECIO, P. et al. Toxicological and histopathological effects of hydramethylnon on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers. **Micron**, New York, v. 45, p. 22-31, 2013.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I; SIMÕES, C. M. **Introdução à Análise Fitoquímica**. In: SIMÕES, C. et al. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC, 3 ed. 2001.165 p.

FILGUEIRA, FA.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa. MG: Universidade Federal de Viçosa, 3. Ed. 2008. 421 p.

FONTANA, J. D. et al. Selective Polarity- and adsorption- guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, p.67-76, 1998.

GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. 2 ed. São Paulo: Editora Agronomica Ceres, 2002, 920 p.

GAMBETA, R M. **Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire**. 2008. 28 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim. 2008.

GODIN C.; BOIVIN, G. Lepidopterous pests of Brassica crops and their parasitoids in southwestern Quebec. **Environmental Entomology**, v.27, n.5, p.1157-1165, 1998.

GOMES, I. B. **Toxicidade e Formulação de Extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae) para o Controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 2013.

GONÇALVES, M.E.C. et al. Extratos aquosos de plantas e o comportamento do ácaro verde da mandioca. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.475-479, 2001.

GRITSANAPAN, W. Insecticidal activity of *Annona squamosa* Linn. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ANONÁCEAS I, Chapingo, **Proceedings**. Chapingo: Universidad Autonoma de Chapingo, p.187-192, 1997.

KAMARAJ, C. et al. Insecticidal and larvicidal activities of medicinal plant extracts against mosquitoes. **Parasitology Research** , v. 107, p. 1337, 2010.

KHALEQUZZAMAN, M.; SULTANA, S. Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of BioScience**, v.14, p.107-112, 2006.

LONDERSHAUSEN, M.; LEICHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H. Molecular mode of action of annonins. **Pesticide Science**. v. 33, p.427-438, 1991.

LUNA, J. S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. 254 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

MACIEL, M.V. et al. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n. 1, p.105-112, 2010.

MORDUE, A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: An Update. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p.903-924, 1993.

PARVIN, S. et al. Pesticidal activity of Pure Compound Annotemoyin-1 Isolated from chloroform extract of the plant *Annona squamosa* Linn. against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Biological Sciences**, v.6, p.1088-1091, 2003.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v.14, n.01, p.40-44, 2004.

PÉREZ-PACHECO, R. et al. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Acta Zoológica Mexicana**, v.20, p.141-152. 2004.

PRATES, H.T. **Avaliação da atividade inseticida de extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda*, em laboratório.** EMBRAPA – CNPMS. n.38, 1999.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: Taft, C. A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry.** Kerala: Research Signpost, p.51- 78, 2006.

RATNAYAKE, S. et al. Evaluation of various parts of the paw tree, *Assimia triloba* (Annonaceae), as a commercial source of the pesticidal Annonaceous acetogenins. **Journal of Economic Entomology**. v. 85, p.2353-2356, 1992.

REIS, C. N. ***Annona muricata*: análise química e biológica dos frutos de gravioleira.** 2011. 150f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes. 2011.

RIBEIRO, R. I. M. et al. **Inibição de metaloproteinases por extratos aquosos de Aloe vera, *Annona muricata* e chá preto.** **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, p. 121-127, 2010.

SANADA-MORIMURA, S.; MATSUMURA, M. Effect of acetone solution in a topical application method on mortality of rice planthoppers, *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera*, and *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 46, p. 443-447, 2011

SANTOS, L.A.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St - Hil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.9, n.3, p.48-51, 2007.

SILVA-AGUAYO, G. Botanical insecticides In. Radcliffe's IPM World Textbook. 2012. Disponível em <http://ipmworld.umn.edu/chapters/SilviaAguayo.htm>. Acesso em 05 de agosto de 2015.

TALEKAR, N.S.; SHELTON, A.M. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.275-301, 1993.

UGOLINE, B.C. **Isolamento biomonitorado de ativos tóxicos das folhas de *Annona crassiflora* mart. e eficácia antimalárica do alcaloide norestefalagina em nanoemulsões**. 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais. 2012.

VILA-NOVA, N. S. et al. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone, **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 334-338, 2013.