

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ANONÁCEAS E PIPERÁCEAS
SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)
EM TOMATEIRO**

ELAINE FERRARI DE BRITO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutora
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Julho - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ANONÁCEAS E PIPERÁCEAS
SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)
EM TOMATEIRO**

ELAINE FERRARI DE BRITO

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutora
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Julho - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Brito, Elaine Ferrari de, 1982-
B862b Bioatividade de extratos de anonáceas e piperáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepdoptera: Gelechiidae) em tomateiro / Elaine Ferrari de Brito. - Botucatu : [s.n.], 2014 xi, 92 f. : fots. color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Edson Luiz Lopes Baldin
Inclui bibliografia

1. Tomate - Doenças e pragas. 2. Inseticidas botânicos. 3. Solanaceae. 4. Pragas agrícolas - Controle biológico. I. Baldin, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ANONÁCEAS E PIPERÁCEAS
SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) EM
TOMATEIRO”

ALUNA: ELAINE FERRARI DE BRITO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ LOPES BALDIN

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON LUIZ LOPES BALDIN



PROF. DR. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM



PROF. DR. MASSUO JORGE KATO



PROF. DR. LEANDRO DO PRADO RIBEIRO



PROF. DR. ANDRÉ LUIZ LOURENÇÃO

Data da Realização: 24 de julho de 2014.

*À minha irmã Cassiana Ferrari de Brito, que lutou com muita fé pela vida
e nunca perdeu a esperança.*

Ofereço

*Às mulheres da minha vida, minha filha Julia, minha mãe Neide, minhas
irmãs Cassiana e Shélida e minha tia Rita de Cássia.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Santa Rita de Cássia, pela força e proteção em todos os momentos da minha vida.

À minha família pelo apoio, amor, alegria e presença.

Agradeço especialmente à minha filha Julia, que todos os dias me ensina a ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin, pela orientação, amizade e confiança.

A todos os Professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pelas oportunidades de seguir aprendendo.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pela atenção e sugestões dadas durante este período.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas e ao Departamento de Proteção Vegetal, pela oportunidade de desenvolver meu projeto de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu amigo Dr. Leandro do Prado Ribeiro, pelas sugestões, envio de materiais, suporte nas análises estatísticas, auxílio em todas as etapas do meu doutorado e pela amizade.

Ao meu estagiário e amigo Roney Macedo da Silva, pelo auxílio em todos os experimentos.

Ao Laboratório de Plantas Inseticidas da ESALQ, pela confecção dos extratos brutos utilizados nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes da USP de Ribeirão Preto, pela elaboração de parte das análises químicas dos extratos.

Aos funcionários, Sr. Domingos, Nivaldo, Norberto, Adriana, Samuel e especialmente às minhas amigas Luciana Aparecida e à Maria Aparecida e do meu amigo Evandro Fogaça (Zé), pela amizade e carinho.

A todos os meus amigos do Departamento de Proteção Vegetal, Maria de Jesus, Patrícia Leite, Rafaela Morando, Ivana Fernandes, José Paulo "Cutí", Luiz Pannuti, Ronelza Zaché, Efrain Santana, Thiago Fanela, Eunice Schlick-Souza e Camila Souza, pelo apoio, amizade e carinho.

Agradeço especialmente a Glaucia, Graziela, Eunice, Ivana, Roney e Rodrigo pela grande amizade e presença na minha vida em Botucatu.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	X
1 RESUMO	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
4.1 Descrição geral sobre <i>Tuta absoluta</i>	9
4.2 Aspectos taxonômicos e bioecológicos de <i>T. absoluta</i>	11
4.3 Pesquisas envolvendo plantas inseticidas no manejo de <i>T. absoluta</i>	15
4.4 Família Annonaceae	17
4.4.1 Gênero <i>Annona</i>	18
4.5 Família Piperaceae.....	22
4.5.1 Gênero <i>Piper</i>	22
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1 Criação estoque de <i>T. absoluta</i> e formação de plantas de tomate.....	26
5.2 Coleta das espécies estudadas e preparo dos extratos etanólicos.....	27
5.3 Avaliação de toxicidade dos solventes orgânicos para <i>T. absoluta</i>	29
5.4 <i>Screening</i> com extratos de anonáceas e piperáceas.....	29
5.5 Bioensaios com os extratos selecionados	30
5.5.1 Curvas de concentração-resposta.....	30
5.5.2 Efeito dos extratos selecionados sobre aspectos biológicos de <i>T. absoluta</i> ...	31
5.5.3 Avaliação quanto à preferência para oviposição de <i>T. absoluta</i>	32
5.5.4 Avaliação do efeito ovicida	33
5.5.5 Avaliação do efeito translaminar sobre <i>T. absoluta</i>	34
5.6 Fracionamento dos extratos de <i>A. muricata</i>	34
5.6.1 Avaliação da bioatividade das partições obtidas	34
5.6.2 Análise cromatográfica em camada delgada (CCD).....	35
5.6.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	36
5.7 Bioensaios de toxicidade comparada.....	36
5.8 Análise dos dados.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

6.1	Rendimento de extração.....	39
6.2	Avaliação de toxicidade dos solventes orgânicos para <i>T. absoluta</i>	40
6.3	<i>Screening</i> com os extratos de anonáceas e piperáceas	40
6.4	Bioensaios com os extratos selecionados	46
6.4.1	Curvas de concentração-resposta.....	46
6.4.2	Efeito dos extratos selecionados sobre aspectos biológicos de <i>T. absoluta</i> ...	50
6.4.3	Avaliação quanto à preferência para oviposição de <i>T. absoluta</i>	54
6.4.4	Avaliação do efeito ovicida	56
6.4.5	Avaliação do efeito translaminar sobre <i>T. absoluta</i>	57
6.5	Fracionamento dos extratos de <i>A. muricata</i>	59
6.5.1	Avaliação da bioatividade das partições obtidas	60
6.5.2	Análise cromatográfica em camada delgada (CCD).....	63
6.5.3	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	66
6.6	Bioensaios de toxicidade comparada.....	70
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
8	CONCLUSÕES	76
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de coleta das espécies botânicas avaliadas	28
Tabela 2. Rendimento dos extratos brutos de anonáceas e piperáceas, obtidos por meio do processo de maceração a frio em solvente etanol, na proporção de 1:5 (p/v).	40
Tabela 3. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de <i>T. absoluta</i> alimentadas com folíolos de tomateiro tratados com solventes de diferentes polaridades, isolados ou em diferentes combinações. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	41
Tabela 4. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de <i>T. absoluta</i> alimentadas com folíolos de tomateiro tratados com extratos etanólicos de diferentes estruturas e/ou espécies de Annonaceae em três concentrações. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	42
Tabela 5. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de <i>T. absoluta</i> alimentadas com folíolos de tomateiro tratados com extratos etanólicos de folhas de diferentes espécies de Piperaceae em duas concentrações. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	45
Tabela 6. Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (mg L ⁻¹) e intervalo de confiança (IC) dos extratos etanólicos de folhas e sementes de <i>A. muricata</i> . T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. Período de exposição dos insetos aos extratos (144 horas).....	47
Tabela 7. Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (mg L ⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de sementes de <i>A. muricata</i> , em diferentes tempos de exposição. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	47
Tabela 8. Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (mg L ⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de folhas <i>A. muricata</i> , em diferentes tempos de exposição. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.	48
Tabela 9. Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀ (mg L ⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de <i>P. amalago</i> var. <i>medium</i> . T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. Período de exposição dos insetos aos extratos (144 horas).....	49

- Tabela 10.** Estimativa da CL_{50} e CL_{90} ($mg L^{-1}$) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium*, em diferentes tempos de exposição. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 49
- Tabela 11.** Médias (\pm EP) de mortalidade e duração da fase larval (dias) de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de $768,13 mg L^{-1}$ e $893,74 mg L^{-1}$, respectivamente. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 51
- Tabela 12.** Médias (\pm EP) do peso (mg), mortalidade (%) e duração da fase pupal (dias) de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de $768,13 mg L^{-1}$ e $893,74 mg L^{-1}$, respectivamente. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 51
- Tabela 13.** Médias (\pm EP) do período de L1 (lagarta recém-eclodida) a adulto (dias), longevidade do adulto (dias) e razão sexual de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de $768,13 mg L^{-1}$ e $893,74 mg L^{-1}$, respectivamente. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 52
- Tabela 14.** Médias (\pm EP) de mortalidade e duração da fase larval (dias) de *T. absoluta* expostas ao extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de $1.011 mg L^{-1}$. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 52
- Tabela 15.** Médias (\pm EP) do peso (mg), mortalidade e duração da fase pupal (dias) de *T. absoluta* expostas ao extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de $1.011 mg L^{-1}$. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 53
- Tabela 16.** Médias (\pm EP) do período de L1 a adulto (dias), longevidade do adulto (dias) e razão sexual de *T. absoluta* expostas ao extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de $1.011 mg L^{-1}$. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 53
- Tabela 17.** Médias (\pm EP) do número de ovos/planta de *T. absoluta* em teste de preferência para oviposição com chance de escolha, em plantas tratadas com extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de $768,13 mg L^{-1}$ e $893,74 mg L^{-1}$, respectivamente e ao extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de $1.011 mg L^{-1}$. T.: $25 \pm 2^{\circ}C$; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h. 54

Tabela 18. Médias (\pm EP) do número de ovos/planta de *T. absoluta* em teste de oviposição sem chance de escolha, em plantas tratadas com extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente e extratos de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h..... 54

Tabela 19. Médias (\pm EP) de eclosão de lagartas de *T. absoluta* após pulverização com os extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente e de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹ sobre ovos do inseto. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.....56

Tabela 20. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 3.840 mg L⁻¹ e 4.468 mg L⁻¹, respectivamente e para o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 5.055 mg L⁻¹, após a penetração no mesófilo foliar. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.....58

Tabela 21. Rendimento das partições dos extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* 60

Tabela 22. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas as frações do extrato etanólico de folhas de *A. muricata*, na concentração de 768,13 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; fotofase: 14 h..... 61

Tabela 23. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas as frações do extrato de sementes de *A. muricata*, na concentração de 893,74 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; fotofase: 14 h..... 62

Tabela 24. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas ao extrato de sementes de *A. muricata* e diferentes formulações comerciais em condições de laboratório. T.: 25 \pm 2°C; U. R.: 60 \pm 10%; fotofase: 14 h. 71

Tabela 25. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas ao extrato de sementes de *A. muricata* e diferentes formulações comerciais em condições de casa de vegetação. Botucatu, dez./2013. 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de vida de <i>T. absoluta</i> : (A) ovos, (B) lagarta, (C) pupa, (D) adulto..	12
Figura 2. Desenho esquemático da pupa de <i>T. absoluta</i> ; vista frontal: detalhes do abdome do macho (A) e da fêmea (B).....	14
Figura 3. (A) Gaiolas utilizadas em ensaios de biologia com lagartas de <i>T. absoluta</i> ; (B) Detalhes do folíolo de tomateiro danificado ao final do estágio larval de <i>T. absoluta</i>	32
Figura 4. Ensaio de bioatividade comparada em casa de vegetação: (A) Vista geral do ensaio de toxicidade comparada em casa de vegetação; (B) Detalhe da gaiola em tecido <i>voil</i> utilizada no ensaio.....	37
Figura 5. Perfis cromatográficos das frações dos extratos de folhas e sementes de <i>A. muricata</i> ; Amostras: (1) Fração em diclorometano do extrato de folhas de <i>A. muricata</i> ; (2) Fração em acetato de etila do extrato de folhas de <i>A. muricata</i> e (3) Fração hidroalcóolica do extrato de sementes de <i>A. muricata</i> ; em diferentes reveladores (A) anisaldeído sulfúrico; (B) iodo; (C) Dragendorff e (D) sulfato cérico.	64
Figura 6. Perfis cromatográficos das frações do extrato de folhas e sementes de <i>A. muricata</i> ; Amostras: (1) Fração em diclorometano do extrato de folhas de <i>A. muricata</i> ; (2) Fração em acetato de etila do extrato de folhas de <i>A. muricata</i> ; (3) Fração hidroalcóolica do extrato de sementes de <i>A. muricata</i> ; em diferentes eluentes através de luz ultravioleta (A) hexano:acetato de etila (7:3 v/v); (B) hexano:acetato de etila 7:3 (v/v) com inversão da polaridade; (C) acetato de etila:metanol (8:2, v/v) aumento na polaridade.	65
Figura 7. Estrutura geral de acetogeninas	66
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H da partição hidroalcóolicado extrato bruto de sementes de <i>A. muricata</i> (DMSO d_6 , 400 MHz).....	67
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H da partição diclorometânica do extrato bruto de folhas de <i>A. muricata</i> (CDCl $_3$, 400MHz).....	68

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H da partição acetato de etilado extrato bruto de folhas de *A. muricata* (DMSO- d_6 , 400MHz)..... 69

BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ANONÁCEAS E PIPERÁCEAS SOBRE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) EM TOMATEIRO.
Botucatu, 2014. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Autor: ELAINE FERRARI DE BRITO

Orientador: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

1 RESUMO

A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), ataca severamente a cultura do tomateiro, podendo comprometer a planta em todas as fases do seu desenvolvimento. Embora o controle químico seja bastante utilizado no manejo das populações deste inseto, métodos menos agressivos, vem sendo estudados, como o uso de plantas com atividade inseticida. Este trabalho teve como objetivo avaliar a bioatividade de extratos etanólicos de diferentes espécies e estruturas de *Annona* e *Piper*, bem como identificar a classe de compostos dos extratos mais ativos de *Annona* spp. sobre *T. absoluta*. Inicialmente, foi realizado um *screening* com os extratos etanólicos das espécies estudadas. Nesse ensaio, os extratos de *A. muricata* e *Piper amalago* L. var. *medium* (Jacq.) Yunck. Foram selecionados por apresentarem pronunciada atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta*. Em seguida as concentrações letais foram estimadas. Para os extratos de sementes e folhas de *A. muricata* a CL_{50} estimada foi de 893,74 e 768,13 mg L⁻¹, respectivamente. Para o extrato de *P. amalago* var. *medium* a CL_{50} foi de 1.011 mg L⁻¹. Os efeitos subletais dos extratos sobre aspectos biológicos de *T. absoluta* foram estudados. Em geral, esses efeitos foram pouco pronunciados. Os extratos promoveram principalmente alongamento nos estágios de vida do inseto. O efeito dos extratos sobre a preferência para oviposição de *T. absoluta* também foi avaliado em teste com e sem chance de escolha. Verificou-se que apenas o extrato de *P. amalago* var. *medium* foi classificado

como deterrente à oviposição em teste com chance de escolha. Posteriormente, o efeito translaminar e a ação ovicida dos extratos foram avaliados. Foi constatado efeito deletério do extrato de *P. amalago* var. *medium* sobre ovos de *T. absoluta*. Quanto ao efeito translaminar dos extratos, verificou-se que os extratos de *A. muricata* são capazes de penetrar no mesófilo foliar e atingir as lagartas. Os extratos de *A. muricata* foram fracionados, a fim de identificar as frações mais ativas sobre *T. absoluta*. Análises físico-químicas dessas frações foram feitas através de cromatografia de camada delgada (CCD) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) para identificação da classe de compostos ativos sobre *T. absoluta*. As frações em diclorometano e acetato de etila do extrato de folhas de *A. muricata* ocasionaram as maiores mortalidades, assim como a fração hidroalcoólica do extrato de sementes. Na análise química dessas frações os resultados revelam a presença de acetogeninas na partição hidroalcoólica do extrato de sementes de *A. muricata* e na fração em diclorometano do extrato de folhas. Em casa de vegetação e laboratório também avaliou-se a toxicidade comparada entre o extrato de *A. muricata* e uma formulação comercial à base de acetogeninas de anonáceas (Anosom[®]). Em laboratório, o extrato de *A. muricata* causou mortalidade semelhante ao Anosom[®] e ao controle positivo (Azamax[®]). Entretanto, em casa de vegetação, a mortalidade de *T. absoluta* pelo uso do extrato de *A. muricata* e das formulações comerciais não se manteve, e merece novas investigações. Apesar da necessidade de ensaios complementares, principalmente relativos à toxicidade desses extratos a mamíferos e sua seletividade sobre organismos não-alvo, este trabalho evidenciou o potencial dos extratos etanólicos de *A. muricata* e *P. amalago* var. *medium* no manejo de *T. absoluta*, podendo contribuir como ferramenta adicional no manejo integrado dessa praga em tomateiro.

Palavras-chave: Plantas inseticidas, *Annona muricata* L., *Piper amalago* L. var. *medium* (Jacq.) Yunck, *Solanum lycopersicum* L.

BIOACTIVITY OF ANNONACEOUS AND PIPERACEOUS EXTRACTS ON *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) IN TOMATO. Botucatu, 2014. 92p. Thesis (Ph.D. in Agronomy/Crop Protection) – College of Agricultural Sciences. Sao Paulo State University (UNESP).

Author: ELAINE FERRARI DE BRITO

Advisor: EDSON LUIZ LOPES BALDIN

2 SUMMARY

The tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick), attacks the tomato crop severely, compromising the plant at all development stages. Even though the chemical control is extensively used on the management of these insect populations, less aggressive methods such as the use of plants with insecticidal activity have been investigated. This study aimed to evaluate the bioactivity of ethanolic extracts of different species and structures of the genus *Annona* and *Piper*, as well as characterize the class of compounds of the most active extracts of *Annona* spp. against *T. absoluta*. First, a *screening* was performed with the ethanolic extracts of the studied species. The *A. muricata* and *Piper amalago* var. *medium* (Jacq.) Yunck extracts showed higher activity against *T. absoluta* larvae and were selected and then it was determined the lethal concentrations. The effects of sub lethal doses of the extracts on the *T. absoluta* biology were studied, as well as the oviposition preference on the sprayed plants in choice and no-choice tests. The sub lethal effects of the extracts were not very pronounced. The extracts mainly promoted an elongation on the insect life cycle. Regarding the effect of the extracts on adults, only the *P. amalago* var. *medium* extract was classified as deterrent to oviposition. In addition, the translaminar and ovicidal effect of the extracts were also evaluated. . It was observed deleterious effect of the extracts the *P. amalago* var. *medium* on *T. absoluta* eggs. Regarding the translaminar effect of the extracts, it was observed that the *A. muricata* extracts are able to penetrate the foliar mesophyll and reach the larvae. Afterwards, the *A.*

muricata L. extracts were fractionated for new assays with *T. absoluta* larvae, in order to identify the most active fractions. Chemical analyses of these fractions were performed through thin layer chromatography (TLC) and nuclear magnetic resonance (^1H NMR) for the characterization of the major compounds. In the fractionation tests, the fractions in dichloromethane and ethyl acetate of *A. muricata* extracts caused higher mortalities, as well as the hydroalcoholic fraction of the seed extract. The results of the chemical analyses revealed that the hydroalcoholic partition of *A. muricata* seed extract and the dichloromethane fraction of the leaf extract presented acetogenins as major compounds. The compared toxicity between the *A. muricata* extract and a commercial formulation a basis of annonaceous acetogenins (Anosom[®]) was also evaluated in greenhouse and laboratory. For the compared toxicity tests in laboratory, the *A. muricata* extract caused similar mortality to Anosom[®] and the positive control (Azamax[®]). In greenhouse, the mortality indexes of *T. absoluta* through the use of extracts remained under the expectation, and deserve further investigations. Despite the need of complementary tests, especially concerning to the toxicity of these extracts to mammals and its selectivity on non-target organisms, this study showed the potencial of *A. muricata* and *P. amalago* var. *medium* ethanolic extracts on *T. absoluta* management, which may contribute as an additional tool on the integrated management of this pest in tomato.

Keywords: Botanical insecticides, *Annona muricata* (L.), *Piper amalago* L. var. *medium* (Jacq.) Yunck, *Solanum lycopersicum* L.

3 INTRODUÇÃO

Nativa da América do Sul, a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) está presente nos principais países produtores de tomate da América Latina e atualmente vem ganhando *status* como grande ameaça para a produção mundial deste fruto (OEPP/EPPO, 2005; DESNEUX et al., 2010; USDA, 2011). Em 2004, *T. absoluta* passou a fazer parte da lista de pragas quarentenárias da Organização de Proteção de Plantas da Europa e Mediterrâneo (OEPP/EPPO, 2005). Em pouco tempo, notificou-se a presença desse inseto em algumas regiões produtoras de tomate na Espanha, disseminando-se rapidamente para outros países da Europa, Ásia e África (URBANEJA et al., 2007; DESNEUX et al., 2011). A ocorrência da traça-do-tomateiro limitou-se por quase 40 anos ao território sul-americano. Durante esse período, apenas 3,1% da superfície cultivada estavam infestadas com a praga no mundo. No entanto, a partir da sua entrada no continente Europeu, em 2006 a praga proliferou rapidamente e hoje 21,5% da superfície cultivada encontram-se sob ataque por *T. absoluta* (FAOSTAT, 2011). Especialistas sugerem que até 2016 a traça-do-tomateiro estará presente em importantes países exportadores de tomate como Canadá, China, Estados Unidos e México (DESNEUX et al., 2011). Os danos causados pela traça-do-tomateiro à cultura ocorrem durante todo o ano, em todas as partes da planta e em qualquer estágio de desenvolvimento. Quando em elevadas infestações, o inseto pode ocasionar perdas significativas à produção (SOUZA et al., 1992; PIKANÇO et al., 1998; TORRES et al., 2001).

O controle de *T. absoluta* é feito, principalmente, através do uso de inseticidas sintéticos. No entanto, a baixa eficiência desse método no controle da traça vem sendo evidenciada desde a década de 90. Naquela época já eram perceptíveis incrementos tanto no volume de ingrediente ativo por hectare como na frequência de pulverizações, a fim de se obterem os mesmos níveis de controle (FRANÇA, 1993). O uso intensivo e quase que exclusivo dessa prática de controle, aliado a características intrínsecas do inseto, como alto potencial reprodutivo (10-12 gerações/ano) e hábito minador, vêm favorecendo à seleção de indivíduos resistentes a diferentes ingredientes ativos (SIQUEIRA et al., 2000, 2001; LIETTI et al., 2005; SILVA et al., 2011). Na Europa, já existem populações de *T. absoluta* com alta frequência de alelos de resistência a piretroides (RODITAKIS et al., 2010; HADDI et al., 2012).

Outros problemas frequentemente relacionados à utilização de pesticidas sintéticos referem-se à elevada toxicidade dos produtos sobre os aplicadores e ao meio ambiente e à falta de cumprimento dos prazos de carência. A exposição involuntária da população através do consumo de alimentos com resíduos de agroquímicos também reforça a inadequação desse sistema de produção. Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, das amostras monitoradas em 2011, 36% foram consideradas insatisfatórias, apresentando ingredientes ativos (i.a) acima dos limites máximos permitidos ou não autorizados para a cultura (PARA, 2011). A percepção negativa da população frente a esses problemas, aliada a estudos científicos que mostram o potencial danoso do uso desses produtos, vêm fazendo com que diversos países busquem regras mais rigorosas para a concessão de registro de agroquímicos. Dessa maneira, a necessidade de desenvolver novos métodos de controle de pragas que visem à sustentabilidade do sistema agrícola abre novas perspectivas para a área de inseticidas botânicos, seja para o uso direto pelos produtores ou servindo como modelo químico nas indústrias, visando à síntese de novos produtos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000; ISMAN, 2006; CANTRELL et al., 2012)

No passado, o uso de plantas com atividade inseticida para a proteção de culturas e grãos armazenados ao ataque de pragas e doenças foi bastante comum, principalmente em países tropicais (THACKER, 2002). Recentemente, diversos compostos de origem vegetal têm sido apontados como alternativas aos agroquímicos usados no controle de importantes pragas agrícolas (PHILOGÈNE et al., 2005; KOUL et al., 2008; SCOTT et al., 2008). Uma das espécies mais estudadas nas últimas décadas é

Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae), comumente conhecida como nim (SCHMUTTERER, 1990; ISMAN, 2006). Os resultados obtidos com o nim vêm servindo como estímulo para a pesquisa com espécies de outras famílias botânicas. No Brasil, a variedade de biomas reflete a enorme riqueza biológica e seu potencial como fonte de recursos genéticos. A prospecção sustentável de plantas dentro dessa biodiversidade permitirá não somente a descoberta de novas espécies com potencial inseticida, mas servirá como uma ferramenta estratégica para sua conservação e proteção.

As piperáceas constituem uma das mais primitivas famílias entre as angiospermas, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SOLTIS et al., 1999; FRODIN, 2004). No Brasil, ocorrem cerca de 450 espécies da família, em sua maioria pertencentes ao gênero *Piper* (YUNCKER, 1972, 1973, 1974; JARAMILLO et al., 2004). A enorme variedade de compostos secundários encontrados em plantas do gênero *Piper* justifica o grande potencial dessas plantas na busca por novos inseticidas (BERNARD et al., 1995). As piperamidas, encontradas em espécies desse gênero, são moléculas que apresentam dupla atividade biológica, incluindo efeitos neurotóxicos e efeitos sobre o metabolismo de lipídeos nos insetos. Nesse sentido, vale destacar que a presença de diferentes modos de ação em uma única molécula é uma característica promissora para o controle de insetos, principalmente aqueles resistentes a inseticidas (PARMAR et al., 1997; DYER; PALMER, 2004; SCOTT et al., 2004).

Dentro da família Annonaceae, o isolamento de uma classe de compostos conhecidos como acetogeninas vem estimulando os estudos com suas espécies (LEBOEUF et al., 1980; BERMEJO et al., 2005). Esses compostos possuem ampla atividade biológica, incluindo propriedades inseticidas (RATNAYAKE, et al., 1993; MCLAUGHLIN et al., 1997). As anonáceas também apresentam ampla dispersão em território nacional, com espécies produtoras de frutos para consumo *in natura* e para uso na medicina popular (CHATROU et al., 2004).

Diante dos danos da traça-do-tomateiro sobre essa cultura e da necessidade no desenvolvimento de práticas de manejo menos agressivas ao meio ambiente e ao mesmo tempo, mais sustentáveis a longo prazo, o uso de plantas com atividade inseticida representa uma importante ferramenta no manejo integrado desse inseto nas lavouras. Como não há estudos disponíveis sobre a bioatividade de derivados de anonáceas e piperáceas para *T. absoluta* e tendo em vista potencial de plantas dessas famílias botânicas, enquanto fonte de inseticidas botânicos, este trabalho teve como

objetivo avaliar a bioatividade de extratos etanólicos de diferentes espécies e estruturas de *Annona* e *Piper*, bem como identificar a classe de compostos ativos de *Annona* spp. sobre *T. absoluta*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Descrição geral sobre *Tuta absoluta*

Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) foi originalmente descrita em 1917 por Meyrick como *Phthorimaea absoluta*, com base em indivíduos coletados em Huancayo no Peru. O gênero foi modificado sucessivamente para *Gnorimoschema* por Clarke, em 1962, e para *Scrobipalpula* por Povolny, em 1975. Mais tarde, em 1987, essa espécie foi transferida para o gênero *Scrobipalpuloides*, também por Povolny. O gênero *Tuta* somente foi definido por Povolny em 1994 (BARRIENTOS et al., 1998).

A traça-do-tomateiro, como é conhecida popularmente, é uma praga nativa da América do Sul, e tem como centro de origem o estreito território limitado pelo Equador, Cordilheira dos Andes, Norte do Chile e litoral do Oceano Pacífico, incluindo o arquipélago das Ilhas Galápagos (VARGAS, 1970). Na América do Sul, está presente na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (OEPP/EPPO, 2005). No Brasil, sua ocorrência foi oficialmente constatada em 1980 em Jaboticabal, SP e já no ano seguinte, no Vale do Salitre em Juazeiro, BA (MORAES; NORMANHA FILHO, 1982). Em apenas três anos após sua detecção, a traça-do-tomateiro se dispersou por todas as regiões produtoras de tomate do país (SOUZA; REIS, 1992). Em 2004, entrou para a lista de pragas quarentenárias da EPPO (Organização de Proteção de Plantas da Europa e Mediterrâneo) e atualmente encontra-se presente em

diversos países da Europa. A Espanha foi o primeiro país a notificar a presença de *T. absoluta* em 2006, seguida da Itália, França, Marrocos, Portugal, Argélia e, mais recentemente, do Reino Unido (URBANEJA et al., 2007; DESNEUX et al., 2011). Características intrínsecas do inseto, como, alto potencial reprodutivo, hábito minador e capacidade de colonização em hospedeiros secundários, contribuem para sua rápida migração a outros locais. Entretanto, o grande volume de exportações de tomates infestados com *T. absoluta* é considerado o principal facilitador dessa disseminação (TROPEA; GARZIA, 2009a; OEPP/EPPO, 2009a). Especialistas sugerem que até 2016 *T. absoluta* poderá estar presente em importantes países exportadores de tomate como os Estados Unidos e a China (DESNEUX et al., 2011). Nos Estados Unidos, esse minador tem maior probabilidade de se estabelecer principalmente em torno da costa do Golfo do México (incluindo Florida), assim como em partes da Califórnia e Arizona, devido as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento deste inseto (USDA, 2011).

O principal hospedeiro de *T. absoluta* no Brasil é o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). No entanto, o inseto pode atacar outras solanáceas de importância econômica como, batata (*Solanum tuberosum* L.), pepino (*Solanum muricatum* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) (VARGAS, 1970; CAMPOS, 1976). Outras solanáceas silvestres, como maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill.), joá-bravo (*Solanum aculeatissimum* Jacq.) e estramônio (*Datura stramonium* L.) são capazes de sustentar populações representativas da traça, principalmente durante a entressafra (FRANÇA; CASTELO BRANCO, 1992). Na Europa, a traça foi constatada em hospedeiros alternativos, como *Physalis peruviana* (L.) em casas de vegetação na Sicília (TROPEA; GARZIA, 2009b), além de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (OEPP/EPPO, 2009b), *Lycium* sp. e *Malva* sp. em outras regiões da Itália (CAPONERO, 2009). A praga também foi verificada em espécies selvagens de tomate, como, *Solanum lyratum* (Trunb.), *Solanum elaeagnifolium* (Cav.), *Datura ferox* (L.), *Solanum habrochaites* (S. Knapp & D. M. Spooner) e *Solanum pennelli* em outros países europeus (Correll.) (OEPP/EPPO, 2005).

Os danos à cultura do tomateiro são causados pelo estágio larval da traça, a qual se alimenta e se desenvolve do parênquima foliar, ramos, frutos e gemas apicais, formando minas e galerias. Em folhas de tomateiro, os danos são causados pela formação de minas no mesófilo, promovidos pela alimentação das lagartas, afetando a capacidade fotossintética e conseqüentemente a produção final. Em ataques severos, as

lagartas podem destruir completamente as folhas do tomateiro, causando secamento dos folíolos e, conseqüentemente, a morte da planta. Nas hastes, ocorre a formação de galerias, podendo alterar o desenvolvimento geral da planta. Os frutos podem ser atacados logo no início da formação. Quando isso ocorre, as galerias formadas depreciam o produto para a comercialização e favorecem a contaminação por patógenos (COELHO; FRANÇA, 1987).

Geralmente, *T. absoluta* ocorre durante todo o ano, danificando todas as partes da planta em qualquer estágio de desenvolvimento. Sua flutuação populacional é altamente influenciada pelas condições climáticas, sendo que as combinações de baixa precipitação atmosférica com temperaturas elevadas e veranicos na época chuvosa, favorecem a proliferação da praga nas principais regiões produtoras de tomate no Brasil (IMENES et al., 1990; LOPEZ, 1991).

4.2 Aspectos taxonômicos e bioecológicos de *T. absoluta*

Esse inseto apresenta alto potencial reprodutivo, podendo ocorrer de 10 a 12 gerações por ano (BARRIENTOS et al., 1998). Os adultos são pequenas mariposas de coloração cinza-prateada com abdome marron-claro, medindo seis e 10 mm de comprimento e envergadura, respectivamente (Figura 1). As asas anteriores apresentam numerosos pontos escuros na parte dorsal e são franjadas apicalmente. As asas posteriores são trapezoidais e franjadas nos bordos. A ausência de feixes de cerdas longas e rígidas na margem anterior da asa posterior é a característica externa mais importante, sendo bastante utilizada para a identificação da espécie (COELHO; FRANÇA, 1987). Entretanto, é necessário analisar cuidadosamente as estruturas da genitália de um macho adulto para diferenciar essa espécie de outros minadores da mesma família e que também atacam a cultura do tomateiro, como por exemplo, *Keiferia lycopersicella* (Walsingham) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (BRAMBILA et al., 2010). A atividade dos adultos se concentra no início da manhã e ao entardecer, quando voam, acasalam e ovipositam. Durante o dia, ocultam-se entre as folhas de tomateiro. A cópula ocorre principalmente nas primeiras horas do dia e cada fêmea copula com apenas um macho. O casal permanece unido com os corpos em sentido oposto, por um período que varia de alguns minutos a até quatro horas (COELHO; FRANÇA, 1987).

O período de pré-oviposição varia de algumas horas a até quatro dias e o de oviposição de três a 22 dias, sendo que em média 60% dos ovos são colocados

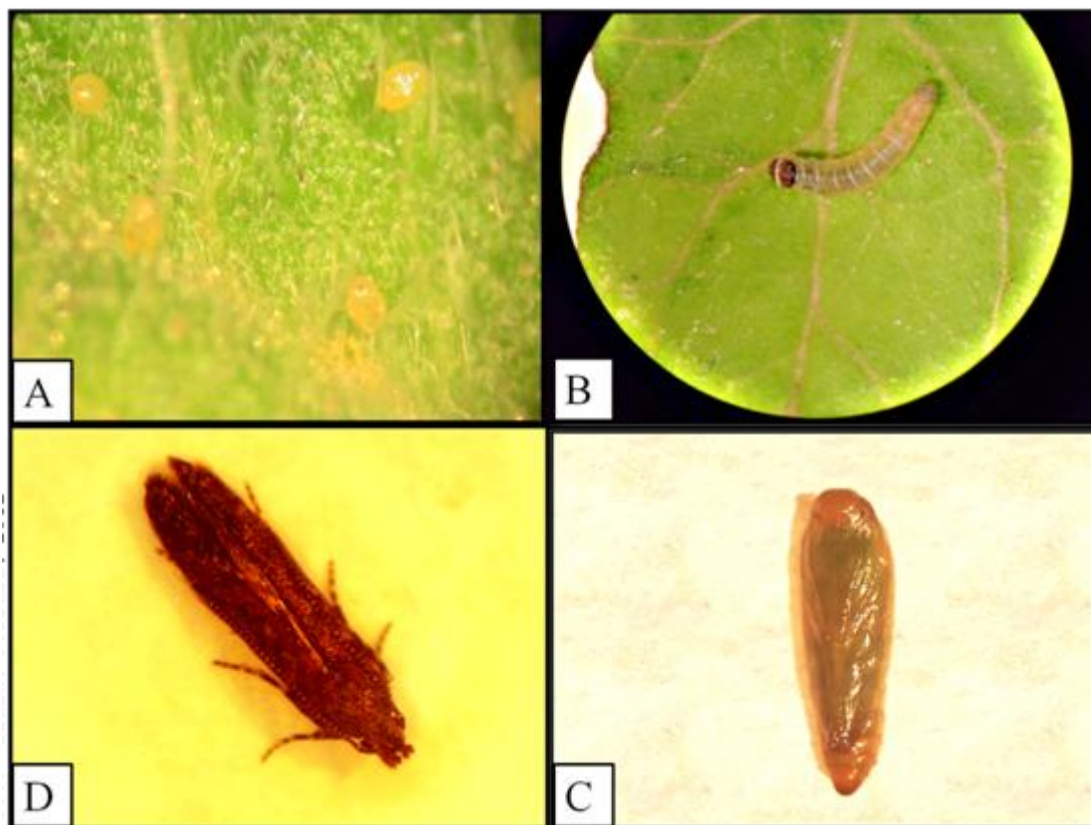


Figura 1. Estágios de vida de *T. absoluta*: (A) ovos, (B) lagarta, (C) pupa, (D) adulto

nos primeiros cinco dias (IMENES et al., 1990; FERNÁNDEZ; MONTAGNE, 1990; BOGORNI et al., 2003).

A oviposição inicia-se aproximadamente 24 horas após a cópula e os ovos são distribuídos individualmente ou em pequenos grupos sobre as folhas (73%), hastes (21%), sépalas (5%) e frutos verdes (1%) (ESTAY, 2000). Os ovos são depositados principalmente nas folhas no terço superior das plantas (TORRES et al., 2001) e o número varia de 96,6 a 130 ovos por fêmea podendo atingir até 300 ovos por fêmea (COELHO; FRANÇA, 1987; UCHOA FERNANDES et al., 1995; BOGORNI et al., 2003). Os ovos possuem formato elíptico e superfície reticulada, com 0,4 mm de comprimento. A coloração varia de esbranquiçada a amarelo-claro no início, e amarelo intenso a marrom, próximo à eclosão das lagartas (COELHO; FRANÇA, 1987) (Figura 1). A incubação dos ovos dura em média quatro a cinco dias, com viabilidade variando de 78,7% a 95% (COELHO; FRANÇA, 1987; HAJI et al., 1984; FERNÁNDEZ; MONTAGNE, 1990; IMENES et al., 1990; BOGORNI et al., 2003). A qualidade do alimento e o tipo de dieta

fornecido a *T. absoluta* interferem na fecundidade dos ovos. Imenes et al. (1990) verificaram que fêmeas alimentadas com solução de mel a 10% apresentaram maior fecundidade (261,71 ovos) do que as que não receberam a solução de mel (147,71 ovos). Mihsfeldt e Parra (1999) constataram que lagartas alimentadas em dieta artificial apresentavam alta variabilidade em relação à fecundidade, podendo depositar de 20 a 180 ovos por fêmea.

As lagartas medem cerca de seis a nove mm de comprimento e são caracterizadas pela placa protorácica escura em forma de meia lua. Sua coloração varia conforme o desenvolvimento, sendo amareladas no primeiro ínstar, esverdeadas nos instares intermediários e verde-escuras com o dorso púrpura-avermelhado, nos instares finais (Figura 1). Apresentam quatro instares larvais, independentemente do genótipo de tomateiro fornecido como alimento e da temperatura usada para criação (GIUSTOLIN et al., 2002; BOGORNÍ et al., 2003). Logo após a emergência, as lagartas penetram no parênquima foliar, nos frutos, próximo ao cálice ou nos ápices das hastes, onde permanecem por um período variável, formando galerias irregulares no mesófilo foliar. A penetração no tecido da planta ocorre em cerca de 30 minutos após à emergência das larvas. Em todos os instares, o consumo do mesófilo foliar cresce em escala exponencial; entretanto, no quarto ínstar, cerca de 80% do total de alimento requerido no estágio é consumido, garantindo reservas para os estágios subsequentes (BOGORNÍ et al., 2003). A duração da fase larval varia principalmente em função da temperatura, podendo ser de aproximadamente 27 dias a 14°C ou de aproximadamente 12 dias a 25°C (QUIROZ, 1976; COELHO; FRANÇA, 1987; HAJI et al., 1988; IMENES et al., 1990; FERNÁNDEZ; MONTAGNE, 1990; MIHSFELDT; PARRA, 1999; GIUSTOLIN et al., 2002; BOGORNÍ et al., 2003). A viabilidade larval também varia com a temperatura; entretanto, o tipo de alimento é um fator limitante para essa variável. Mihsfeldt e Parra (1999) forneceram alimentação artificial e natural e verificaram viabilidades larvais de 29 a 91,6%, respectivamente, sob temperatura de 25°C. Em geral, sob dieta natural, a traça apresenta elevados percentuais de viabilidade em todas as fases de desenvolvimento (IMENES et al., 1990).

As pupas apresentam coloração esverdeada no início e marrom-escura próximo à emergência dos adultos (COELHO; FRANÇA, 1987). Em condições naturais, as pupas podem se fixar em qualquer parte da planta; entretanto, isso ocorre mais frequentemente no solo. No processo de pupação pode ocorrer a formação de um casulo

esbranquiçado, contendo detritos, ou permanecem nuas, quando formadas em galerias ou no interior de frutos (COELHO; FRANÇA, 1987).

O estágio pupal tem duração média de sete a nove dias à temperatura de 25°C, com viabilidade superior a 80% (COELHO; FRANÇA, 1987; FERNÁNDEZ; MONTAGNE, 1990; BOGORNI et al., 2003). Em temperaturas inferiores, ocorre um prolongamento da fase pupal, que pode se estender por até 19 dias (QUIROZ, 1976). O seu ciclo biológico se completa entre 76,3 dias a 14°C e 23,8 dias a 27°C (BARRIENTOS et al., 1998).

Quanto à diferença entre os sexos, verificou-se que a duração do período pupal das fêmeas é menor que a dos machos (FERNÁNDEZ; MONTAGNE, 1990; BOGORNI et al., 2003). A sexagem da traça é feita através das pupas, sendo que o quinto e sexto segmentos são móveis nos machos, enquanto que nas fêmeas a mobilidade existe do quinto ao sétimo segmentos. Nas fêmeas, o cremaster invagina-se, formando dois lóbulos, e nos machos, ele dá origem ao orifício anal. O poro genital no macho localiza-se no nono e na fêmea no oitavo e nono segmento (Figura 2). Quanto à razão sexual, diversos trabalhos mostram a proporção em média de um macho para 1,8 fêmeas (COELHO; FRANÇA, 1987; HAJI et al., 1988).

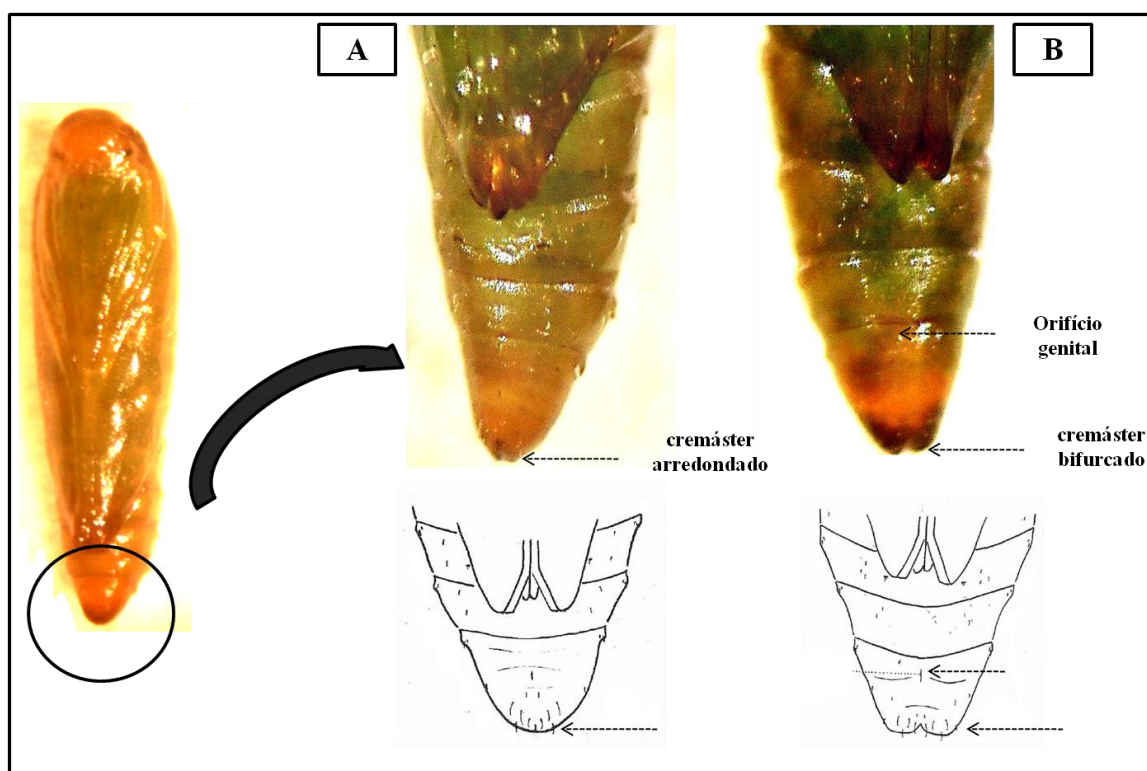


Figura 2. Desenho esquemático da pupa de *T. absoluta*; vista frontal: detalhes do abdome do macho (A) e da fêmea (B).

4.3 Pesquisas envolvendo plantas inseticidas no manejo de *T. absoluta*

Nos últimos 30 anos verifica-se um crescente interesse nos estudos na área de inseticidas botânicos (ISMAN; GRIENEISEN, 2014). Grande parte dos estudos realizados no mundo concentra-se com a espécie *Azadirachta indica*, conhecida popularmente como nim (SCHMUTTERER, 1990; NISBET, 2000; MUSABYIMANA et al., 2001). O nim pode ser empregado nas formas de óleo (misturado com emulsificantes), pó seco, extratos aquosos ou orgânicos (metanólico, etanólico, acetônico, clorofórmico, hexânico), constituindo formulações comerciais ou semi-comerciais (SAXENA, 1989).

Trindade et al. (2000) estudaram o efeito tóxico do extrato metanólico de amêndoas das sementes de nim sobre ovos e lagartas da traça-do-tomateiro e obtiveram 100% de mortalidade larval no sexto dia de avaliação, com a menor concentração testada no estudo (2000 mg L⁻¹). Entretanto, a viabilidade e o período de incubação de ovos de *T. absoluta* não foram afetados pelo extrato.

Gonçalves-Gervásio e Vendramim (2007) testaram o efeito de extratos aquosos de sementes de nim sobre lagartas de *T. absoluta* em diferentes formas de aplicação e verificaram que em todas as vias testadas (contato, sistêmico e translaminar) as mortalidades foram superiores a 90% na maior concentração usada, 10g 100 ml⁻¹ de água.

Boiça Júnior et al. (2007), visando ao controle de pragas tardias do tomateiro, testaram a eficiência do óleo de nim seguindo os preceitos do Manejo Integrado de Pragas (MIP) em relação ao controle convencional, com aplicações em intervalos de 3 a 6 dias + o MIP convencional. Os autores verificaram que tanto o MIP convencional como o MIP-Nim foram eficientes no controle das pragas tardias do tomateiro, quando a pressão da população era baixa. Além disso, a produção de tomate obteve incrementos de até 74% e o número de pulverizações foi reduzido em até 77%, em relação ao controle convencional.

Em trabalho mais recente, Tomé et al. (2013) utilizaram uma formulação comercial à base de nim (Azamax[®], 12 mg i.a./ L) e investigaram a toxicidade aguda sobre duas populações da traça-do-tomateiro, além de seus efeitos subletais. Os autores verificaram que esse produto causou elevada mortalidade sobre lagartas de *T. absoluta*, afetando também o comportamento de adultos quanto à oviposição e de lagartas quanto à preferência pelo substrato utilizado para alimentação.

Dentro das perspectivas para desenvolvimento de formulações estáveis e com alto efeito sobre organismos alvo, a nanotecnologia tem se revelado uma

importante ferramenta, considerando sua aplicação no desenvolvimento de produtos contendo ingredientes ativos em escala nanométrica (FERREIRA et al., 2012). Esses autores avaliaram a bioatividade de 22 nanoformulações de nim sobre o desenvolvimento de *T. absoluta* e constataram que as nanoformulações NC40 (nanocápsulas de PHB³ + óleo/extratos de nim + Tween) em suspensão aquosa e NC40 (nanocápsulas de PHB+ óleo/extratos de nim + Tween) na forma de pó afetaram o desenvolvimento do inseto.

Outra espécie botânica pertencente à família das meliáceas e que vem sendo muito estudada é *Melia azedarach* (L.), conhecida como cinamomo. Essa espécie destaca-se pela ampla distribuição geográfica no Brasil, favorecendo sua utilização como inseticida. Outro fator importante é que esta planta possui composição química semelhante à do nim, também produzindo azadiractina, além de outros limonoides como, por exemplo, as azedarachinas, salaninas e meliacarpininas (HUANG et al., 1996). Outros derivados de *M. azedarach* podem provocar diferentes reações nos insetos, agindo como inibidores de alimentação, redutores de crescimento e fecundidade, ou causando alterações morfológicas e comportamentais (BREUER et al., 2003).

Brunherotto e Vendramim (2001) testaram o efeito de extratos aquosos (0,1%) de diferentes estruturas de *M. azedarach* sobre o desenvolvimento da traça-do-tomateiro. De modo geral, todos os extratos afetaram negativamente o desenvolvimento do inseto; entretanto, o extrato aquoso de folhas se destacou dentre os demais. Em outro estudo, Brunherotto et al. (2010) avaliaram o efeito de extratos aquosos de folhas de *M. azedarach* e de sementes de nim, associados a três genótipos de tomateiro sobre o desenvolvimento, reprodução e longevidade de *T. absoluta*. Os autores verificaram que apenas um genótipo resistente (LA444-1) e os extratos de *M. azedarach* e de sementes de *A. indica* afetaram adversamente o desenvolvimento do inseto. Não foi constatado sinergismo ou antagonismo com a utilização associada de planta resistente e extrato de plantas inseticidas, observando-se apenas efeito aditivo. Ainda na família das meliáceas, vários pesquisadores têm isolado limonoides de diferentes espécies do gênero *Trichilia* e demonstrado sua atividade sobre insetos, incluindo efeitos fagodeterrentes e reguladores de crescimento (NAKATANI et al., 1981; XIE et al., 1994). De acordo com Thomazini et al. (2000), extratos aquosos das folhas e ramos de *T. pallida* prejudicam o desenvolvimento de *T. absoluta*; entretanto, o extrato das folhas destaca-se como o mais ativo sobre esse inseto.

O modo de ação dos extratos de folhas de *T. pallida* foram avaliados por Gonçalves-Gervásio e Vendramim (2004). Os autores avaliaram o efeito

translaminar, sistêmico e tópico de extratos das folhas dessa meliácea, em comparação com o extrato aquoso das sementes de nim, sobre *T. absoluta*. Verificou-se que os extratos aquosos de sementes de nim provocaram alta mortalidade larval, independentemente da forma de aplicação. Embora em menor intensidade, o extrato clorofórmico de folhas de *T. pallida* em concentrações maiores do que 5% também prejudicaram o desenvolvimento dessa praga, sendo o efeito translaminar mais pronunciado que os demais.

Visando identificar frações promissoras como fontes de substâncias inseticidas, Cunha et al. (2005) avaliaram extratos aquosos e não aquosos de *T. pallida* sobre *T. absoluta*. Como resultado, a fração em metanol, juntamente com aquela em acetato de etila, foram consideradas altamente promissoras como fontes de substâncias inseticidas contra o inseto. Na sequência dos estudos, Cunha et al. (2008) também avaliaram substâncias isoladas a partir do extrato em diclorometano de *T. pallida* (0,1 %) e verificaram que o triterpeno 24-metilenocicloart-3 β -ol e o esteroide 24-metilen-3,22-diidroxicolesterol, ambos de folhas, juntamente com o limonoide gedunina, de frutos, apresentaram maior atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta*.

O uso de óleos essenciais como inseticidas botânicos vem ganhando mercado, principalmente nos Estados Unidos e na Europa, devido à possibilidade de serem usados em rotação ou em combinação com outros protetores de culturas, incluindo pesticidas convencionais ou de origem microbiana (ISMAN, 2000)

Umpiérrez et al. (2012) avaliaram o efeito inseticida do óleo essencial extraído de duas espécies da família Asteraceae, *Eupatorium buniifolium* (Hook.) e *Artemisia absinthium* (L.), sobre duas pragas importantes do tomateiro, incluindo *T. absoluta*. Os autores verificaram efeito inseticida sobre *T. absoluta* tanto em contato direto com o inseto via aplicação em papel filtro, como na forma de liberação de vapores.

4.4 Família Annonaceae

A família Annonaceae é constituída por cerca de 100 gêneros e aproximadamente 2.300 espécies (CHATROU et al., 2012). As plantas dessa família possuem características primitivas, como gineceu apocárpico, estames livres e numerosos, distribuídos em forma de espiral em torno do receptáculo floral. Além disso, o processo de polinização é realizado predominantemente por besouros (LEBOEUF et al., 1980). Apresentam-se amplamente distribuídas, principalmente em regiões tropicais. No Brasil, existem 29 gêneros e 386 espécies de Annonaceae, distribuídas principalmente na

Amazônia, mas também em outros biomas, como a Mata Atlântica e o Cerrado. É uma importante família de plantas constituintes da flora nacional, com espécies produtoras de frutos para consumo *in natura* e para uso na medicina popular (CHATROU et al., 2004)

Nas últimas décadas, os estudos fitoquímicos de espécies da família Annonaceae vêm se intensificando, devido a descoberta de substâncias com alto potencial para a medicina, como os alcaloides benzilisoquinólicos e as acetogeninas. As acetogeninas constituem uma série de produtos naturais isolados exclusivamente da família Annonaceae, a partir dos gêneros *Annona*, *Asimina*, *Xilopia*, *Goniothalamus*, *Disepalum*, *Polyalthia*, *Porcelia*, *Saccopetalum* e *Uvaria* e, mais recentemente, de *Artabotrys*, *Dasymaschalon*, *Ophrypetalum* e *Sassopetalum* (BERMEJO et al., 2005; RAINER, 2007). Atualmente, existem 417 acetogeninas identificadas, com predominância dos compostos descritos para o gênero *Annona*. São classificadas com base nas características estruturais presentes, como a presença de um esqueleto comum contendo uma cadeia longa de carbonos (C₃₂ ou C₃₄) sustentando um anel γ -lactônico terminal e ácidos graxos não ramificados. Esses compostos possuem ampla atividade biológica com efeitos citotóxicos, antitumoral, anti-parasítico, pesticida, antimicrobiano e imunossupressivo (RATNAYAKE et al., 1993; MCLAUGHLIN et al., 1997; MATSUMOTO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013). Estudos sobre o mecanismo de ação mostram que as acetogeninas são potentes inibidores respiratórios, superiores àqueles inibidores clássicos, como a rotenona e a piericidina A. Essas substâncias agem como inibidoras do complexo I (NADH - ubiquinona oxidoreductase) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, promovendo apoptose e levando à redução das taxas respiratórias e cardíaca (GALLARDO et al., 2000; DEGLI ESPOSTI et al., 1994).

4.4.1 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* possui 200 espécies neotropicais e quatro africanas (CHATROU et al., 2012) e no Brasil está representado por 80 espécies (CHATROU et al., 2004). É considerado muito importante economicamente, principalmente pela produção de frutos de grande interesse comercial. As espécies de maior interesse são a cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), a pinha ou fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.), atemóia (híbrido: *A. squamosa* x *A. cherimola*) e a graviola (*A. muricata* L.) (LORENZI; MATOS, 2002).

A quantidade de anonáceas comercializadas nas principais centrais de abastecimento está crescendo e se concentra principalmente no CEAGESP (61%). As informações coletadas pelo SIEM do CEAGESP mostram que entre 2011 e 2012 houve um crescimento da oferta de atemóia (35%) e de graviola (32%) (CEAGESP, 2012). No Brasil, a cherimóia tem sido menos cultivada devido à sua exigência por temperaturas baixas; as demais apresentam áreas cultivadas em diversas regiões do país, a fim de atender à demanda dos mercados de frutas frescas (pinha ou atemóia) e processadas (graviola) (BRAGA SOBRINHO, 2014).

Annona muricata é uma árvore de clima tropical, distribuída nas Américas, África e Sudeste Asiático. No Brasil, segundo maior produtor de graviola do mundo, observou-se que, a partir de meados da década de 1990, essa fruta passou a ter maior destaque entre as frutas tropicais brasileiras, em função da boa aceitação no mercado nacional, tanto por parte do consumidor como por parte das indústrias de processamento de polpa (SAO JOSE et al., 2014). Seu cultivo é economicamente relevante nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, destacando-se os Estados da Bahia, Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Pará (LIMA, 2004). Segundo a Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), a produção de graviola para o estado foi estimada em oito mil toneladas, com perspectivas de crescimento em função do aumento nas áreas plantadas (ADAB, 2010).

A graviola é considerada uma cultura típica de pequenas áreas, com pomares ao redor de três hectares, com predomínio de agricultores familiares. A planta pode atingir até 10 metros de altura e possui casca aromática, folhas alternas e pecioladas, flores axilares, solitárias, sub-globosas e amareladas ou cor de creme. O fruto é uma baga, de formato irregular e elipsóide, com aproximadamente 30 cm de comprimento e 12 cm de largura, com epiderme verde-escura, espessa e areolada. A polpa é branca sucosa, lactescente e um pouco fibrosa, com até 500 sementes de coloração castanha ou preta (SACRAMENTO, 2009). Os frutos podem ser ofertados ao longo de todo o ano. A alta perecibilidade da graviola é um dos maiores entraves à comercialização da fruta fresca; por isso é considerada uma fruta típica da industrialização. Pode ser processada na forma de suco natural, concentrado e néctar. A extração de suas sementes, geralmente consideradas resíduos na produção de polpa, poderia ser utilizada em preparações inseticidas potencialmente úteis (MCLAUGHLIN et al., 1997). Sob o ponto de vista econômico, uma indústria que processa 500 toneladas de polpa consegue extrair 35 toneladas de sementes, o

que representa o fornecimento de matéria-prima a custo zero (GRZYBOWSKI et al., 2013).

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar o efeito inseticida de diversas espécies do gênero (LEATEMIA; ISMAN, 2004a, 2004b; DHARMASENA et al., 2001; SEFFRIN et al., 2010). Até o momento, aproximadamente 75 acetogeninas foram isoladas de folhas, sementes, casca e raízes de *A. muricata* (BERMEJO et al., 2005). Anonacina é um exemplo de acetogenina extraída de sementes de *A. muricata*. Testes de campo com extratos padronizados dessa espécie botânica indicam eficiência contra uma variedade de insetos-praga. Além disso, eles agem de forma sinérgica quando combinados com outros produtos vegetais à base de piretro, nim e piperáceas (MCLAUGHLIN et al., 1997; GRZYBOWSKI et al., 2013). González-Esquinca et al. (2012) avaliaram o efeito de extratos aquosos e etanólicos de folhas e ramos de três espécies de *Annona* sp., incluindo *A. muricata*, sobre a fase larval de *Anastrepha ludens* (Loew). Os autores verificaram que os extratos aquosos de folhas de *A. muricata* foram mais tóxicos do que os extratos em etanol, com mortalidades de lagartas de 84,3% na concentração de 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Além disso, com o aumento no tempo de exposição dos extratos (24h - 72h), maiores foram os índices de mortalidade larval.

A toxicidade de diferentes acetogeninas purificadas também tem sido estudada (COLOM et al., 2008; BLESSING et al., 2010). Estudos alertam para elevada toxicidade em testes realizados em laboratório com animais. Entretanto, o seu efeito emético é um fator de segurança, que diminui os riscos de intoxicação a seres humanos. Para extratos padronizados contendo acetogeninas, a toxicidade sobre mamíferos é improvável. González-Coloma et al. (2002) verificaram menor atividade das acetogeninas esquamosinas e anoninas sobre células extraídas do tecido de mamíferos comparativamente a células epiteliais de insetos, devido a diferenças na permeabilidade da membrana. Entretanto, sua elevada complexidade estrutural dificulta o seu registro frente aos órgãos responsáveis nos Estados Unidos e outros países. Por outro lado, a grande quantidade de sementes resultantes da indústria de suco de graviola no sudeste da Ásia pode ser utilizada para a produção de inseticidas naturais caseiros em pequena escala (ISMAN, 2003).

Além das acetogeninas, outros compostos como alcalóides são encontrados em grande quantidade na graviola (LEBOEUF et al., 1981). Diversos estudos comprovam sua importância medicinal, com efeitos antiviral (PADMA et al., 1998),

antiparasitário (FERREIRA et al., 2013), anti-leishmaniose (JARAMILLO et al., 2000; VILA-NOVA et al., 2013), anti-inflamatório (HAMID et al., 2012) e anticancerígeno (TORRES et al., 2012).

Outras espécies pouco conhecidas e endêmicas no Brasil são *Annona sylvatica* A. St.-Hil [descrita antes como *Rollinia sylvatica* (A. St.-Hil) Mart] e a falsa-graviola, *A. montana* Macfad. *A. sylvatica* é vulgarmente conhecida como araticum, araticum-do-mato, cortiça ou cortiça-amarela e ocorre desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul. É relativamente frequente na Floresta Atlântica, nas florestas semidecíduas, nas matas de altitude e nas restingas (LORENZI et al., 2006; MAAS et al., 2012). A falsa-graviola é originária da América Tropical, compreendendo a América Central, América do Sul até o sul do Brasil, sendo muito dispersa por todo o território americano tropical e, devido à sua relativa resistência a temperaturas mais baixas, cultiva-se em condições subtropicais, onde é fundamentalmente utilizada como porta-enxerto para outras espécies do mesmo gênero, produzindo frutos de melhor qualidade (FERRÃO, 1999). Na medicina popular, as sementes de *A. montana* são utilizadas contra infecções parasitárias do couro cabeludo e, junto com as folhas em infusão, servem para combater a diarreia e induzir a menstruação (SANO; ALMEIDA, 1998).

Diversos outros estudos já foram realizados com espécies do gênero *Annona*, comprovando a atividade inseticida sobre diferentes insetos-praga. Colom et al. (2007) avaliaram os efeitos inseticidas e antialimentares de acetogeninas provenientes do extrato metanólico de sementes de *A. cherimolia* sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Os autores concluíram que, das nove acetogeninas incorporadas na dieta artificial e fornecidas diariamente a lagartas de *S. frugiperda*, apenas a acetogenina esquamocina apresentou mortalidade elevada (100%). Para pupas, a mortalidade foi superior a 80% para todas as acetogeninas. Com relação aos efeitos antialimentares, apenas a acetogenina esquamocina diferiu do controle, apresentando lagartas com baixo peso, sugerindo ação redutora na eficiência na conversão de alimento em biomassa.

Colom et al. (2008) avaliaram a toxicidade aguda e crônica de acetogeninas isoladas de *Annona cherimolia* e *A. montana* sobre *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). No ensaio de aplicação tópica sobre ninfas do inseto, os autores observaram mortalidades próximas a 100% com as acetogeninas esquamocina e molvizarina nas concentrações de 0,1 e 0,25 μg ninfa⁻¹, respectivamente. Os efeitos crônicos sobre adultos

foram observados com as anonacinas na concentração de $10\mu\text{g}\text{ninfa}^{-1}$, com mortalidades acima de 50%.

Blessing et al. (2010) avaliaram os efeitos tóxicos e anti-alimentares de acetogeninas extraídas de folhas e ramos frescos de *A. montana* sobre *S. frugiperda*. As acetogeninas *cis*-anonacina-10-one, densicomacina-1, gigantetronenina apresentaram forte efeito antialimentar a uma concentração de apenas 100 mg L^{-1} .

Ribeiro et al. (2013) avaliaram a bioatividade de extratos e frações obtidos de diferentes estruturas (folhas, ramos e sementes) de *Annona mucosa* Jacq. sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. Os resultados preliminares mostraram que as frações em hexano e diclometano apresentaram as maiores médias de mortalidade sobre *S. zeamais*. Em seguida, os autores selecionaram a fração em hexano para os particionamentos, verificando que as frações hidroalcoólicas e em diclorometano foram mais promissoras. Segundo os autores, os compostos majoritários encontrados nessas frações e que revelaram maior bioatividade sobre *S. zeamais* foram as acetogeninas e o alcaloide isoquinolina.

4.5 Família Piperaceae

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales e constitui-se como umas das mais primitivas famílias dentre as angiospermas, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SOLTIS et al., 1999; FRODIN, 2004). Plantas dessa família podem apresentar hábito herbáceo, arbustivo ou arbóreo e são consideradas pioneiras, colonizando principalmente clareiras e bordas da floresta (YUNCKER, 1974). Atualmente, é composta por quatro gêneros que podem ser divididos em dois grupos; o mais representativo com *Piper* e *Peperomia*, com cerca de 2.000 e 1.700 espécies, respectivamente; com um número menor de espécies, *Zippelia* e *Manekia* (antigamente denominado de *Sarcorrhachis*), formam o outro grupo (WANKE et al., 2007). No Brasil, ocorrem cerca de 450 espécies da família Piperaceae, sendo 265 espécies de *Piper* e 166 de *Peperomia* (YUNCKER, 1972, 1973, 1974).

4.5.1 Gênero *Piper*

O gênero *Piper* apresenta grande importância econômica, sendo *Piper nigrum* (L.) a espécie mais conhecida comercialmente, cujos frutos são fonte natural da pimenta-do-reino (SRINIVASAN, 2007). Essa especiaria é utilizada mundialmente e seu cultivo comercial é de grande importância para países como Índia, Indonésia, Vietnã,

Malásia e Brasil (SIMPSON; OGORZALY, 1995). Várias espécies dessa família têm sido utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças, principalmente em países do continente africano e na América do Sul. Atualmente, o gênero *Piper* possui aproximadamente 2.000 espécies; entretanto, somente 112 foram investigadas fitoquimicamente, revelando a presença de 667 metabólitos secundários diferentes (DYER; PALMER, 2004). A enorme variedade de compostos secundários encontrados em plantas do gênero *Piper* justifica o grande potencial dessas plantas na busca por novos inseticidas (MIYAKADO et al., 1989). O estudo fitoquímico do gênero *Piper* tem sido bem documentado por diversos autores (PARMAR et al., 1998; TRIPATHI et al., 1995; DYER; PALMER, 2004). Segundo Dyer e Palmer (2004), desde as revisões sobre o gênero elaboradas por Sengupta e Ray (1987) e Parmar et al. (1997), apenas 28 novas espécies foram investigadas e 69 novos compostos descobertos. Ainda segundo esses autores, apenas cerca de 10% de todas as espécies de *Piper* foram fitoquimicamente investigadas. Entre os compostos mais encontrados, destacam-se os alcalóides, amidas, lignanas, neolignanas, terpenos, propenilfenol, além de mais de 146 compostos diversos (PARMAR et al., 1997). Os metabólitos secundários têm sido encontrados em todas as partes da planta.

O modo de ação desses compostos sobre insetos é variado, incluindo toxicidade por contato, além de propriedades repelentes e anti-alimentares. Como espécies consideradas promissoras na busca de compostos com atividade inseticida, destacam-se *P. nigrum*, *P. guineense* Schum., *P. tuberculatum* Jacq., *P. hispidinervum* C. DC. e *P. aduncum* L. (NAVICKIENE et al., 2000; SCOTT et al., 2004, 2005; FAZOLIM et al., 2007).

Estudos biomonitorados têm sido realizados por diversos pesquisadores com o intuito de identificar piperáceas com potencial inseticida (MIYAKADO et al., 1989; PARMAR et al., 1997; PARK et al., 2002; SCOTT et al., 2005). O efeito inseticida de extratos botânicos de espécies do gênero *Piper* tem sido correlacionado com a concentração de piperamidas. Essas amidas são abundantes nesse gênero e apresentam grande importância ecológica e econômica. Uma das mais importantes é a piperina, isolada de mais de 20 espécies de *Piper*, principalmente das sementes de *P. nigrum* (PARMAR et al., 1997).

Park et al. (2002) estudaram as propriedades inseticidas de amidas extraídas de *P. nigrum* e encontraram forte efeito larvicida no extrato metanólico de frutos

sobre os mosquitos *Culex pipiens pallens* (Coquillett), *Aedes aegypti* (L.) e *A. togoi* (Theobald).

Dyer et al. (2003) testaram o efeito inseticida de três amidas isoladas de *P. cenocladum* (C. DC) sobre *S. frugiperda*. Os autores observaram que a mistura dessas amidas provocaram um decréscimo no peso pupal, na sobrevivência e um aumento no tempo de desenvolvimento.

A atividade inseticida de plantas desse gênero vem sendo testada principalmente em pragas de grãos armazenados, onde seu controle se mostrou eficiente para *Callosobruchus chinensis* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (Fabr.), *Acanthoscelides obtectus* (Say.) e *Callosobruchus maculatus* (F.) (MIYAKADO et al., 1979, 1980; SIGHAMONY et al., 1986; BAIER; WEBSTER, 1992; MBATA et al., 1995; KÉÏTA et al., 2000).

Piper mollicomum Kunth., conhecida como jaborandi-manso ou simplesmente jaborandi, é um arbusto pequeno de 1,0 e 1,5 m de altura. No território nacional se encontrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Mato Grosso e Goiás (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004). Na medicina popular, os frutos dessa espécie são utilizados para o tratamento de problemas estomacais. A bioatividade de *P. mollicomum* somente foi avaliada por Lago et al. (2007) sobre fungos do gênero *Cladosporium*. Esses autores realizaram um fracionamento bioguiado do extrato de folhas de *P. mollicomum* e verificaram forte inibição do crescimento das espécies estudadas na fração 7-methoxy-5,4'-dihydroxy-flavanone.

Piper glabratum Kunth., conhecida popularmente como pariparoba, é uma espécie que contém atividade antiparasítica devido à presença de derivados de ácido benzoico (FLORES et al., 2008). Assis et al. (2013) avaliaram a composição fitoquímica do óleo essencial de folhas de *P. glabratum*, além de sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina* (L.) e verificaram a presença de 27 constituintes, sendo os fenilpropanoides os maiores constituintes, como eugenol (0,6%), apiol (6,2), β -cariofileno (14,6%) e longiborneol (12%). O óleo de *P. glabratum* apresentou elevada toxicidade a *A. salina*, com $CL_{50} = 45,61 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Para *Piper amalago* (L.) var. *medium* (Jacq.) Yunck existe apenas um trabalho na literatura descrevendo a composição química de seu óleo essencial extraído a partir de frutos verdes e maduros. A análise do óleo essencial revelou a predominância de

sesquiterpenos oxigenados e 65 compostos foram identificados. *Piper amalago* (L.) é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, analgésico, anti-térmico, vermífugo e diurético (NOVAES et al., 2014). A composição química das raízes dessa espécie mostra a presença, principalmente, de sesquiterpenos, pirrolidinas e isobutilamidas com efeitos antileishmanicida (CARRARA et al., 2013).

Lopes et al. (2012) realizaram um estudo neurocomportamental com ratos para avaliar o efeito de extratos metanólicos de folhas de *P. amalago*. Os autores verificaram que o extrato de *P. amalago* afetou o sistema nervoso central dos ratos, diminuindo sua locomoção e exploração do ambiente, mas sem induzir toxicidade genética.

Piper mikanianum (Kunth) Steudel, conhecida popularmente como pariparoba e jaborandi, nativa do Rio Grande do Sul e cujas folhas são empregadas como antisséptico, hepatoprotetor e emenagogo (LORENZI, 2000; GARLET; IRGANG, 2001; MENGUE et al., 2001; SOUZA et al., 2004; DICKEL et al., 2007). Análises dos compostos químicos levaram a identificação de bicilogermacreno, β -cariofileno, limoneno e safrol (PARMAR et al., 1997; DICKEL et al., 2007).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas – LARESPI, junto ao Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), Botucatu, SP. As extrações do material vegetal coletado e os fracionamentos foram realizados no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), em Piracicaba, SP. As análises cromatográficas e espectroscópicas foram feitas no Departamento de Física e Química da Universidade de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto, SP e no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos, SP.

5.1 Criação estoque de *T. absoluta* e formação de plantas de tomate

A criação de *T. absoluta* foi iniciada com lagartas coletadas em áreas de cultivo de tomate, em Botucatu, SP, (22° 40' 31"S, 48°25' 37" W), sendo a espécie posteriormente identificada pelo Dr. Vitor O. Becker, diretor do Instituto Uiraçu, BA. A criação foi estabelecida e mantida em condições controladas (T: 25 ± 2°C, U.R: 65 ± 10% e fotofase de 12 horas), e os insetos alimentados com folhas de tomate, *Solanum lycopersicum* (L.), cultivar Santa Clara. Foram utilizadas gaiolas entomológicas de

alumínio (40 x 40 x 60 cm), revestidas com tela antiafídeo nas laterais e acrílico na parte frontal e no topo, para obtenção de posturas e criação de lagartas. A manutenção da criação consistiu em fornecer periodicamente folhas de tomateiro para alimentação das lagartas. As folhas secas (mesófilo totalmente consumido pelas lagartas) contendo lagartas de quarto ínstar, pré-pupas e pupas foram retiradas das gaiolas e colocadas em potes de acrílico (3,5 L) recobertos com tecido *voil* para a pupação e produção de adultos. Para os adultos era fornecido uma solução de mel a 10% (p/v) a cada dois dias e uma folha de tomateiro imersa em água como substrato para a oviposição, a cada três dias. As folhas com os ovos eram transferidos para a gaiola de criação de lagartas.

Para a manutenção da criação e fornecimento de plantas para os ensaios, mudas de tomateiro foram produzidas continuamente em ambiente protegido, sem a aplicação de inseticidas. Para a obtenção das plântulas foram utilizadas bandejas de isopor com 120 células e substrato agrícola Bioplant Plus (Bioplant, Nova Ponte, MG). Após 20 dias da sementeira, as plântulas eram transferidas para vasos plásticos (2,5 L) contendo uma mistura de terra; substrato (1:1) e adubação recomendada para a cultura (FIGUEIRA, 2008). Os tratos culturais foram feitos periodicamente e, a cada bandeja transplantada uma nova era semeada.

5.2 Coleta das espécies estudadas e preparo dos extratos etanólicos

As coletas foram feitas nos anos de 2011 e 2012 no Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42’28,2” S; 47°37’59,4”) e no município de Erval Seco, RS (27°25’41,8” S; 53°34’11,2”). Uma amostra das espécies coletadas foi depositada no Herbário ESA, do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP (Tabela 1). As espécies de anonáceas foram identificadas pelo Prof. Renato Mello-Silva, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, USP e as piperáceas pela Pesquisadora Elsie Franklin Guimarães, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ.

Para a preparação dos extratos, as estruturas coletadas foram levadas ao laboratório para secagem em estufa de ar circulante a 40 °C por um período de 48 a 72 horas. Após esse processo, os materiais vegetais foram triturados em moinho de facas, para obtenção de um pó fino e em seguida armazenados em potes de vidro vedados em câmara fria. As extrações foram feitas pelo processo de maceração, utilizando-se etanol como solvente, na proporção de 1:5 (p/v). O material vegetal foi mantido por três dias no

Tabela 1. Dados de coleta das espécies botânicas avaliadas

Espécies	Estruturas coletadas	Local de coleta	Data de coleta	Número de voucher*
<i>Annona montana</i> Macfad.	Folhas e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'28,2" S; 47°37'59.4" O; altitude: 537 m)	21/03/11	121203
<i>Annona muricata</i> L.	Folhas e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'25,4" S; 47°37'43,9" O; altitude: 576 m)	12/04/11	123317
<i>Annona sylvatica</i> A. St.-Hil.	Folhas e sementes	Av. Emilio Falcão, Erval Seco, RS (27°25'41,8" S; 53°34'11,2" O; altitude: 466 m)	25/04/11	121205
<i>Piper amalago</i> L. var. <i>medium</i> (Jacq.) Yunck	Folhas	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'52,7" S; 47°37'46" O; altitude: 546 m)	16/11/2012	121200
<i>Piper glabratum</i> Kunth.	Folhas	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'44,3" S; 47°37'41" O; altitude: 529 m)	16/11/2012	121206
<i>Piper mikanianum</i> (Kunth.) Steudel	Folhas	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'45,8" S; 47°37'36,5" O; altitude: 526 m)	16/11/2012	121201
<i>Piper mollicomum</i> Kunth.	Folhas	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (22°42'45,2" S; 47°37'39.3" O; altitude: 532 m)	16/11/2012	121202

*Depositado no Herbário ESA do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

solvente e em seguida filtrado através de papel filtro. Todo o resíduo remanescente foi colocado novamente no solvente e o processo repetido por quatro vezes. O solvente presente na solução filtrada foi eliminado em rotaevaporador a 50 °C e à pressão de -600 mmHg. Após a evaporação total do solvente em câmara com circulação de ar, o resíduo obtido foi pesado para a determinação do rendimento de extração.

5.3 Avaliação de toxicidade dos solventes orgânicos para *T. absoluta*

Foram realizados ensaios preliminares para a escolha dos solventes utilizados para a ressuspensão dos extratos etanólicos. Foram testados três solventes, com diferentes polaridades: água deionizada, metanol e acetona, isoladamente e em diferentes combinações: metanol e água deionizada (1:1, v/v), metanol e acetona (1:1, v/v), acetona e água deionizada (1:1, v/v). Os solventes foram aplicados sobre as folhas de tomateiro até o ponto de escorrimento, por meio de um microatomizador da marca Arprex, modelo 5A (Arprex, Mogi das Cruzes, SP.) acoplado a um compressor de ar a uma pressão de 0,5 kgf/cm². Após a secagem dos solventes (15 a 30 minutos), os folíolos foram individualizados em placas de Petri em poliestireno (96 mm Ø x 21 mm altura) da marca TPP e infestados com quatro lagartas recém-eclodidas. Cada folíolo teve seu pecíolo envolvido em algodão hidrófilo umedecido, a fim de manter a turgescência. O ensaio foi realizado em laboratório em condições controladas (T: 25 ± 2 °C, U. R: 65 ± 10% e fotofase de 12 horas). A mortalidade foi avaliada diariamente com o auxílio de um microscópio estereoscópico binocular (aumento de 40 vezes) até o sexto dia. Ao final do experimento, o peso das lagartas foi avaliado por meio de uma balança de precisão. Foram avaliados seis tratamentos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com sete repetições. Cada repetição foi constituída por três placas de Petri, contendo quatro lagartas cada, totalizando 84 lagartas por tratamento.

5.4 Screening com extratos de anonáceas e piperáceas

Para selecionar os extratos com maior atividade inseticida sobre *T. absoluta* foram realizados ensaios independentes com as espécies das famílias botânicas estudadas. Os ensaios foram realizados seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 5.3, com exceção para o número de lagartas, que neste ensaio foi de cinco por placa de Petri. Para o ensaio com as anonáceas, foram avaliados extratos provenientes de folhas e

sementes de *A. montana*, de *A. muricata* e de *A. sylvatica*, nas concentrações de 250, 1.000 e 5.000 mg L⁻¹. Uma mistura de metanol:acetona (1:1, v/v) foi utilizada como controle. Para o ensaio com as piperáceas, foram avaliados extratos de folhas de *P. amalago* var. *medium*, de *P. glabratum*, de *P. mikanianum*, de *P. mollicomum* nas concentrações de 2.000 e 5.000 mg L⁻¹, utilizando acetona PA como controle. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 19 e nove tratamentos para as espécies de *Annona* e *Piper*, respectivamente. Foram realizados sete repetições por tratamento e cada repetição foi constituída de quatro placas contendo cinco lagartas cada, totalizando 112 lagartas por tratamento.

5.5 Bioensaios com os extratos selecionados

5.5.1 Curvas de concentração-resposta

A partir dos extratos selecionados, buscou-se definir a CL₅₀ e CL₉₀ para *T. absoluta*. As concentrações testadas foram escolhidas através de ensaios preliminares, utilizando-se concentrações que causaram mortalidades populacionais próximas a 100% e mortalidades próximas ao controle. Com base nisso, foram estabelecidas as concentrações testadas através da fórmula de Finney (1975):

$$q = n + 1 \sqrt[n]{a_n/a_1}$$

onde q= razão de progressão geométrica (p.g); n= número de concentrações a extrapolar; a_n= limite superior da (p.g); a₁= limite inferior da (p.g).

Para os extratos de sementes e folhas de *A. muricata*, o intervalo das concentrações utilizados variou de 250 a 5.000 mg L⁻¹. Para o extrato de folha de *P. amalago* var. *medium* o intervalo usado variou de 500 a 7.000 mg L⁻¹. O procedimento experimental utilizado foi o mesmo descrito no item 5.3. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com 14 tratamentos para os extratos de *A. muricata* e sete tratamentos para o extrato de *P. amalago* var. *medium*. Foram realizados sete repetições por tratamento e cada repetição foi constituída de quatro placas contendo cinco lagartas cada, totalizando 112 lagartas por tratamento.

5.5.2 Efeito dos extratos sobre aspectos biológicos de *T. absoluta*

Para avaliar os efeitos subletais dos extratos selecionados sobre *T. absoluta* foi realizado um ensaio com os extratos nas concentrações respectivas as CL_{50} definidas no ensaio anterior. Os extratos de folhas e sementes de *A. muricata* foram testados nas concentrações de $768,13 \text{ mg L}^{-1}$ e $893,74 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Para o extrato de *P. amalago* var. *medium* a concentração foi de 1.011 mg L^{-1} . No ensaio foram utilizadas folhas de tomateiro e não apenas folíolos, devido à duração do experimento (> 9 dias). Dessa forma, o uso de folíolos poderia vir a comprometer a qualidade do alimento fornecido às lagartas (GALDINO et al., 2011). As gaiolas foram compostas por uma base retangular de isopor (20 x 10 x 3 cm) e uma arena cilíndrica de plástico transparente (11 cm de \varnothing x 27 cm altura) recoberta com tecido *voil* (Figura 3). Foram utilizadas folhas de tomateiro retiradas do terço superior de uma planta com aproximadamente 30 dias de idade.

A pulverização dos extratos foi feita seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 5.3. Foram utilizados metanol:acetona (1:1, v/v) e acetona pura como controles para os extratos de *A. muricata* e *P. amalago* var. *medium*, respectivamente. Após a secagem dos extratos (15 a 30 minutos), o pecíolo das folhas foi inserido em um tubete de vidro (50 ml) contendo água destilada. Em seguida, as folhas foram infestadas com seis lagartas recém-eclodidas e colocadas no interior das gaiolas para impedir sua fuga. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente até o estágio de pré-pupa. Nessa fase as pré-pupas foram individualizadas em placas de Petri. Os insetos foram acompanhados durante todo o ciclo de vida para obtenção das seguintes variáveis: duração em (dias) dos estágios larval e pupal; peso e mortalidade pupal; mortalidade larval, período de L1 (lagarta recém-eclodida a adulto), longevidade de adultos e razão sexual. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 10 repetições, totalizando 120 lagartas por tratamento.

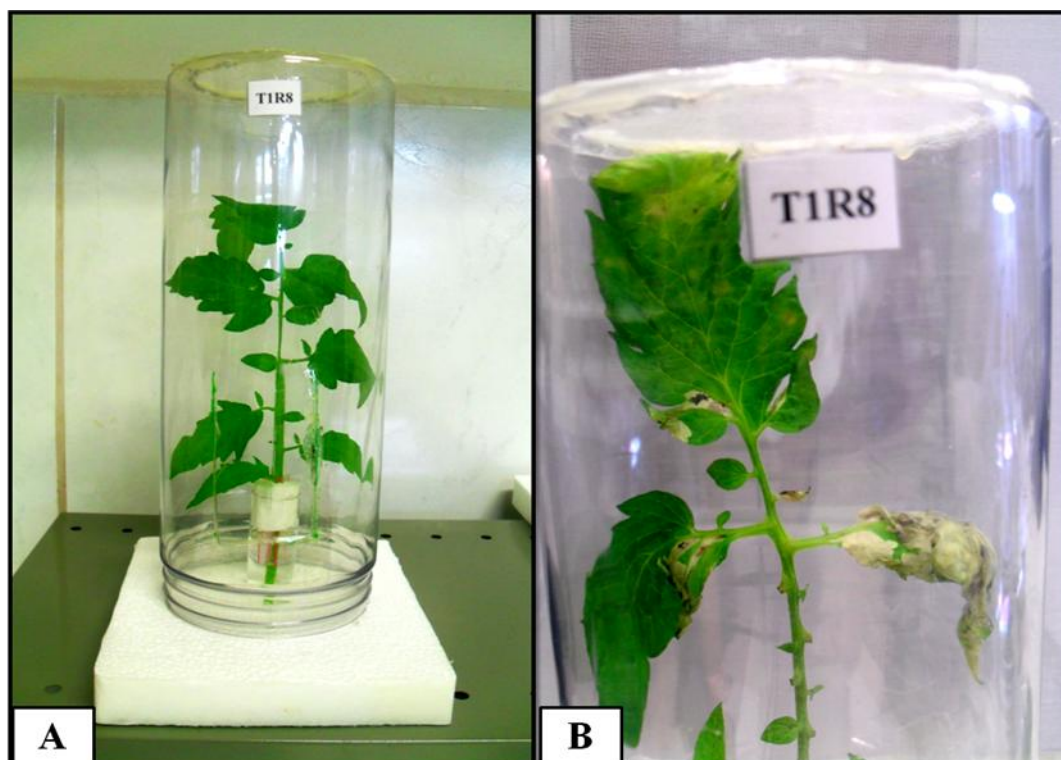


Figura 2. (A) Gaiolas utilizadas em ensaios de biologia com lagartas de *T. absoluta*; (B) Detalhes do folíolo de tomateiro danificado ao final do estágio larval de *T. absoluta*.

5.5.3 Avaliação quanto à preferência para oviposição de *T. absoluta*

Para o ensaio com chance de escolha, foram utilizadas plantas de tomate cultivadas em vasos de 0,5 L e com aproximadamente 20 dias de idade. As plantas foram pulverizadas com os extratos de folhas e sementes de *A. muricata* e extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração referente à CL_{50} . As pulverizações foram feitas conforme descrito anteriormente. Foram utilizados metanol:acetona (1:1, v/v) e acetona pura como controles para os extratos de *A. muricata* e *P. amalago* var. *medium*, respectivamente. Após a secagem dos tratamentos (15 a 30 minutos), as plantas foram acondicionadas aleatoriamente no interior de gaiolas semelhantes às utilizadas na criação da traça. Em seguida, foram colocados no interior da gaiola dois casais do inseto, os quais haviam sido previamente isolados por 24 horas. Após 48 horas da liberação dos adultos, as plantas foram retiradas e os ovos contabilizados com auxílio de microscópio estereoscópico (aumento de 20 vezes). O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com cinco tratamentos. Cada gaiola contendo as plantas pulverizadas e os insetos representaram uma repetição, efetuando-se oito no total.

Um ensaio de oviposição sem chance de escolha também foi realizado com *T. absoluta*. Neste ensaio cada vaso contendo a planta foi colocado dentro de uma gaiola metálica (30 cm Ø x 70 cm altura), recoberta com tecido *voil* e submetida ao mesmo tratamento (controle ou extratos). Foram utilizados dois casais do inseto por gaiola, previamente isolados por 24 horas e, após 48 horas da liberação dos adultos, os ovos foram contabilizados. O ensaio seguiu um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições.

Os dados oriundos do teste com chance de escolha foram comparados entre si por meio do índice de deterrência (ID) para oviposição, adaptado de Lin et al. (1990), calculado pela fórmula $ID = 2G / (G + P)$, onde G= % de ovos nas plantas tratadas com o extrato em teste e P= % de ovos no controle. Com base no (ID) e no desvio padrão obtidos, determinou-se o intervalo de classificação (IClass) para as médias dos tratamentos, pela fórmula: $IClass = 1 \pm t (n - 1; \alpha: 0,05) \times (DP / \sqrt{n})$; onde t= valor de “t” tabelado; DP= desvio padrão; n= número de repetições. Os extratos foram considerados neutros quando o valor de (ID) esteve compreendido dentro do (IClass) avaliado; deterrente à oviposição quando o valor do (ID) foi inferior ao menor valor obtido para o (IClass); e estimulante à oviposição quando o (ID) foi superior ao maior (IClass) calculado.

5.5.4 Avaliação do efeito ovicida

Para o ensaio de efeito ovicida foram utilizadas folhas de tomateiro com cinco folíolos, as quais foram retiradas do terço superior de plantas com 30 dias de idade. O pecíolo das folhas foi inserido em um tubete de vidro (50 ml) contendo água destilada, o qual foi fixado no centro de uma base de isopor, com 10 cm de diâmetro. Em seguida, as folhas foram colocadas no interior da gaiola de criação de adultos por 24 horas. Após esse período, as folhas foram retiradas e os folíolos individualizados em placas de Petri envoltos com algodão umedecido. O total de ovos em cada folíolo foi determinado e, em seguida, os mesmos tratamentos utilizados nos ensaios anteriores foram pulverizados na concentração referente à CL_{50} , estimada para cada extrato selecionado com o auxílio de um microatomizador. Como controles foram utilizados metanol:acetona (1:1, v/v) e acetona pura. A viabilidade dos ovos foi avaliada após a emergência das lagartas. O delineamento foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições.

5.5.5 Avaliação do efeito translaminar sobre *T. absoluta*

Para avaliar o efeito dos extratos de folhas e sementes de *A. muricata* e do extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* após a penetração das lagartas no mesófiolo foliar, foi realizado um bioensaio utilizando folhas de tomateiro, conforme descrito no item 5.5.4. As folhas foram infestadas com 20 lagartas recém-eclodidas de *T. absoluta* e acondicionadas no interior de gaiolas (Figura 3). Após 24 horas, as folhas infestadas com as lagartas foram individualizadas em placas de Petri contendo um papel filtro. A face adaxial das folhas foram pulverizadas por meio de um microatomizador, com os respectivos extratos e os controles, metanol:acetona (1:1, v/v) e acetona pura. Em seguida as folhas foram inseridas novamente no interior de gaiolas. A concentração dos extratos utilizada foi cinco vezes a CL_{50} encontrada, seguindo a metodologia utilizada por Ferreira, (2011). As avaliações de mortalidade larval foram realizadas diariamente até o sexto dia, juntamente com o peso das lagartas sobreviventes. Empregou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições, totalizando 100 lagartas por tratamento.

5.6 Fracionamento dos extratos de *A. muricata*

Os extratos etanólicos de *A. muricata* foram submetidos ao fracionamento inicial pela técnica de partição líquido-líquido. Para isso, os extratos de folhas e sementes foram ressuspensos em metanol:água na proporção de (1:3) e (8:2) (v/v), respectivamente. Em seguida foram particionados em um funil de separação com solventes orgânicos de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e acetato de etila). Com isso, obtiveram-se as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcolica para os extratos de folhas de *A. muricata* e frações em hexano e hidroalcolica para o extrato de sementes. As partições foram concentradas em rotoevaporador à temperatura de 50°C e à pressão de -600 mmHg. A determinação dos rendimentos foi obtida com base nas massas dos respectivos extratos brutos.

5.6.1 Avaliação da bioatividade das partições obtidas

Para a avaliação da bioatividade sobre lagartas de *T. absoluta* foram feitos ensaios de toxicidade aguda. Foram utilizados folíolos de tomate envoltos com algodão umedecido em placas de Petri. Os folíolos foram pulverizados com os

respectivos tratamentos por meio de pistola tipo gravidade. Como controles foram empregados acetona:metanol (1:1, v/v) e metanol:água (1:1, v/v). Após a secagem dos extratos, os folíolos foram infestados com quatro lagartas recém-eclodidas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos para o extrato de folhas e três tratamentos para o extrato de sementes de *A. muricata*. Foram utilizadas sete repetições por tratamento, cada repetição foi constituída por quatro placas de Petri contendo cinco lagartas, totalizando 112 lagartas por tratamento.

5.6.2 Análise cromatográfica em camada delgada (CCD)

Para verificar as diferenças qualitativas das classes químicas presentes em cada extrato, foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada (CCD) das frações mais ativas dos extratos de folhas e de sementes de *A. muricata* sobre *T. absoluta*.

As amostras analisadas por CCD foram aplicadas a aproximadamente 0,5 cm da base inferior da placa, por meio de um tubo capilar, permitindo dessa forma, que a amostra fosse adsorvida pela fase estacionária. Em seguida, a cromatoplaça foi introduzida em uma cuba contendo a fase móvel (eluente), na qual se utilizou uma solução de hexano:acetato de etila (8:2, v/v), proporção esta definida a partir de testes preliminares. A cromatoplaça foi deixada na cuba até que o eluente subisse, por capilaridade, até aproximadamente 0,5 cm da extremidade superior da placa. Na sequência, as cromatoplaças foram retiradas da cuba e, logo após isso, as mesmas receberam soluções reveladoras, com o intuito de tornar visíveis os compostos orgânicos dos mais variados grupos funcionais. Para esse fim, foram usados diferentes reveladores, como anisaldeído sulfúrico (revelador de compostos como, esteroides e terpenoides), iodo (considerado um revelador universal, capaz de detectar substâncias com duplas ligações e aromáticas), Dragendorff (específico para alcaloides) e sulfato cérico (muito usado para identificar flavonoides e terpenoides). Após a aplicação dos reveladores, as cromatoplaças foram aquecidas em secador industrial a 100 °C. Além da solução reveladora, a visualização dos resultados obtidos também foi efetuada por meio de luz ultravioleta (254 e 364 nm), visando identificar a presença de sistemas conjugados, denominados cromóforos.

5.6.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Visando verificar as classes de compostos, bem como as diferenças e similaridades nos perfis químicos, as frações bioativas dos extratos selecionados foram submetidas à análise de RMN de ^1H em um espectrômetro Bruker Avance TM III Nanobay 400 MHz, utilizando os solventes deuterados CDCl_3 e $\text{DMSO}-d_6$.

5.7 Bioensaios de toxicidade comparada

Foram realizados ensaios em laboratório e casa de vegetação, a fim de avaliar a toxicidade comparada do extrato bruto de sementes de *A. muricata* em relação a um produto formulado à base de acetogeninas de anonáceas.

Para o ensaio em laboratório, foram utilizados folíolos de tomateiro em placas de Petri seguindo os mesmos procedimentos do item 5.3. Foi avaliado o extrato de sementes de *A. muricata* na concentração relativa à CL_{90} em comparação ao produto comercial Anosom[®] CE (10 g L^{-1} de anonina); AgriLife, Andhra Pradesh, Índia, na concentração de 2.000 mg L^{-1} . Esse biopesticida é formulado à base de extratos de *Annona squamosa* L. e *Annona reticulata* L. e tem a acetogenina anonina como ingrediente ativo, sendo recomendado para o controle de pragas importantes como *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera litura* (F.), *Spodoptera exigua* (Hubner). Como controle positivo, foi usado o produto Azamax[®] CE (12 g L^{-1} de azadiractina + 3-tigloylazadirachtol); DVA Brasil, Campinas, SP, Brasil, registrado para o controle de *T. absoluta* em tomateiro na concentração recomendada (2,5 ml L^{-1}) (AGROFIT, 2013). Os níveis dos limonoides azadiractina e 3-tigloylazadirachtol (anteriormente azadiractina A e B) presentes no Azamax[®] podem ser modificados em decorrência de sua rápida degradação. Dessa maneira, quantificamos esses compostos seguindo os procedimentos descritos por Forim et al. (2010), a partir de amostras do produto recolhidas no momento do uso.

Os extratos de *A. muricata* formulado com o solvente metanol:acetona (1:10, v/v) foi substituído por um concentrado emulsionável à base de água + metanol + tween, para evitar a queima das plantas quando expostas à luz solar, o que poderia ocorrer no ensaio em casa de vegetação. Assim, como controles negativos foram utilizados (água destilada + metanol + tween) e água destilada. A mortalidade foi avaliada diariamente até o sexto dia, juntamente com o peso das lagartas. O delineamento

experimental foi o inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e sete repetições. Foram utilizadas quatro placas por repetição, cada uma contendo cinco lagartas, num total de 140 lagartas por tratamento.

Para avaliar a toxicidade desses produtos em condições semelhantes às que ocorrem no campo, foi realizado um experimento em casa de vegetação, utilizando-se plantas de tomate com 30 dias de idade. As plantas foram formadas em vasos de 2,5 L, contendo solo e substrato (Bioplant Plus) na proporção de 3:1. As plantas foram pulverizadas com os respectivos tratamentos por meio de uma pistola tipo gravidade (Modelo 5A Arprex), acoplada a um compressor de ar, sob pressão de 0,5 kgf/cm². Após a secagem dos produtos (15 a 30 min), uma folha do terço superior de cada planta foi selecionada e infestada com 15 lagartas recém eclodidas. Para evitar a fuga das lagartas, a folha infestada foi protegida com uma gaiola (25 x 15 cm) confeccionada em tecido *voil* (Figura 4). As plantas infestadas foram dispostas aleatoriamente sobre bancadas de concreto em casa de vegetação e após seis dias da infestação, a mortalidade foi avaliada juntamente com o peso das lagartas sobreviventes. O experimento seguiu um delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e sete repetições. Cada vaso foi infestado com 15 lagartas e representou uma repetição, num total de 105 lagartas avaliadas por tratamento.

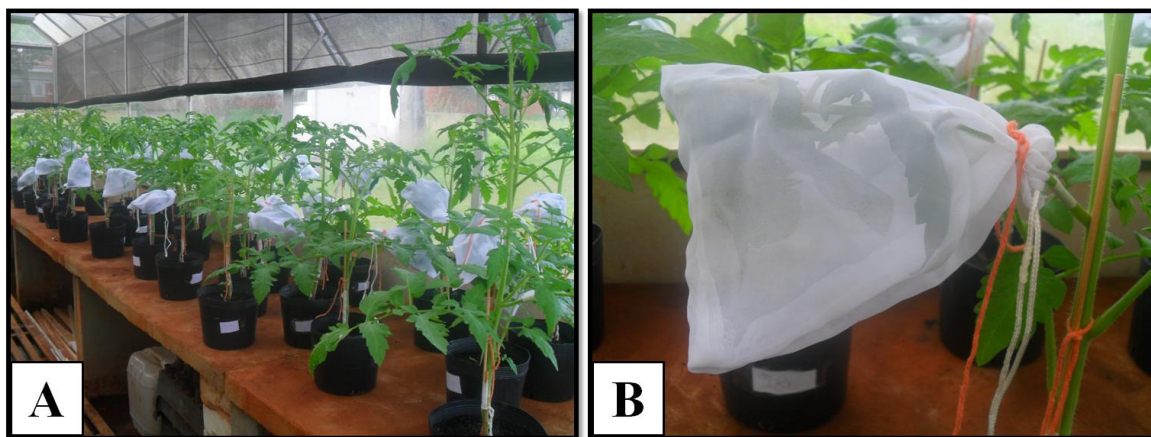


Figura 3. Vista geral do ensaio de toxicidade comparada em casa de vegetação (A); Detalhe da gaiola em tecido *voil* utilizada no ensaio (B).

5.8 Análise dos dados

As estimativas das concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) dos extratos mais promissores sobre *T. absoluta* foram realizadas utilizando um modelo binomial com

função de ligação complemento log-log (modelo de gompit), através do PROBIT PROCEDURE do software SAS versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 2011).

Os dados dos demais ensaios foram analisados por meio de Modelos Lineares Generalizados (GLM) pertencentes à família exponencial de distribuições (NELDER & WEDDERBURN, 1972). A verificação da qualidade do ajuste dos dados aos modelos foi feita por meio do uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (HINDE & DEMÉTRIO, 1998). Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, comparações múltiplas (teste *pos hoc* de Tukey, $P < 0,05$) foram realizadas por meio da função *glht* (General Linear Hypothesis Test) do pacote Multcomp com ajuste dos valores de P. Todas essas análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.15.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Rendimento de extração

O rendimento dos extratos estudados variou conforme a estrutura e a espécie vegetal (Tabela 2). Em Annonaceae, os extratos de sementes apresentaram os maiores rendimentos em comparação aos extratos de folhas, com destaque para *Annona muricata* e *Annona montana* com 21,10 e 20,23%, respectivamente. Para os extratos de folhas, novamente *A. muricata* apresentou o melhor rendimento (14,09%), seguido de *A. montana* com 11,79%. Para os extratos de Piperaceae o rendimento médio foi de 6,88%, sem variações pronunciadas entre as espécies.

O rendimento dos extratos pode variar não apenas conforme a espécie e estrutura vegetal, mas também de acordo com o solvente e o processo escolhido para a extração. Para a obtenção dos extratos estudados foi utilizado o etanol como solvente. Segundo Falkenberg et al. (2010), esse solvente permite que praticamente todos os constituintes de interesse sejam extraídos, já que a grande maioria apresenta alguma solubilidade em misturas etanólicas. Além disso, a utilização de solventes obtidos de fontes naturais, que são biodegradáveis e produzidos por fontes renováveis, adequam-se aos preceitos da química verde (ANASTAS et al., 2000). O elevado rendimento dos extratos de sementes de *Annona* spp. pode ser explicado pela presença de óleo, composto

Tabela 2. Rendimentos dos extratos brutos de anonáceas e piperáceas, obtidos por meio do processo de maceração a frio em solvente etanol, na proporção de 1:5 (p/v).

Espécie vegetal	Parte vegetal	Material vegetal (g)	Rendimento	
			(g)	(%)
<i>Annona montana</i>	Folha	100	11,79	11,79
	Semente	95,6	19,34	20,23
<i>Annona muricata</i>	Folha	100	14,09	14,09
	Semente	104,5	22,05	21,10
<i>Annona sylvatica</i>	Folha	100	7,18	7,18
	Semente	100	11,00	11,00
<i>Piper amalago</i> var. <i>medium</i>	Folha	100	6,10	6,10
<i>Piper glabratum</i>	Folha	100	6,46	6,46
<i>Piper mikianium</i>	Folha	100	7,97	7,97
<i>Piper mollicomum</i>	Folha	100	6,98	6,98

principalmente por triacilgliceróis, e que podem ser extraídos com etanol (FONTANA, et al., 1998; ONIMAWO, 2002; BRANCO et al., 2010).

6.2 Avaliação da toxicidade de solventes orgânicos para *T. absoluta*

Não houve diferença significativa entre os tratamentos isolados e/ou suas combinações, em relação ao controle (água deionizada) (Tabela 3). Quanto ao peso das lagartas, verificou-se aumento significativo das médias quando utilizou-se acetona pura ou em combinação com água e metanol, em relação ao controle. O critério inicial utilizado para a escolha do solvente baseou-se no menor efeito deletério sobre o organismo estudado. No entanto, como não houve diferença significativa entre os solventes com relação à mortalidade de lagartas, selecionou-se aquele que promoveu uma melhor suspensão dos extratos, ou seja, metanol:acetona (1:1, v/v) para suspensão dos extratos de *Annona* spp. e acetona pura para os extratos de *Piper* spp.

6.3 Screening com os extratos de anonáceas e piperáceas

No ensaio para seleção dos extratos de anonáceas mais ativos frente a lagartas de *T. absoluta*, os níveis médios de mortalidade dos extratos variaram de 9,97% (24 horas) a 19,32% (144 horas) na concentração mais baixa (250 mg L⁻¹) (Tabela 4).

Tabela 3. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* alimentadas com folíolos de tomateiro tratados com solventes de diferentes polaridades, isolados ou em diferentes combinações. T.: $25 \pm 2^\circ$ C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Solvente	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
	24	48	72	96	120	144	
Metanol	3,57 \pm 2,48	3,57 \pm 2,48	3,57 \pm 2,48	4,76 \pm 3,07	4,76 \pm 3,07	5,95 \pm 2,99	1,37 \pm 0,11 ab
Metanol:água deionizada (1:1, v/v)	3,57 \pm 2,48	3,57 \pm 2,48	3,57 \pm 2,48	3,57 \pm 2,48	5,95 \pm 2,38	5,95 \pm 2,38	1,40 \pm 0,07 ab
Metanol:acetona (1:1, v/v)	4,76 \pm 3,57	4,76 \pm 3,57	9,52 \pm 4,61	9,52 \pm 4,61	9,52 \pm 4,61	13,09 \pm 4,01	1,57 \pm 0,15 a
Acetona:água deionizada (1:1, v/v)	3,57 \pm 1,68	4,76 \pm 1,68	5,95 \pm 2,38	5,95 \pm 2,38	5,95 \pm 2,38	5,95 \pm 2,38	1,51 \pm 0,06 a
Acetona	7,14 \pm 2,17	7,14 \pm 2,17	8,33 \pm 2,57	10,71 \pm 2,38	10,71 \pm 2,38	14,28 \pm 3,51	1,76 \pm 0,13 a
Água deionizada	3,57 \pm 1,68	5,95 \pm 1,54	7,14 \pm 2,17	8,33 \pm 2,57	8,33 \pm 2,57	8,33 \pm 2,57	1,04 \pm 0,08 b
F	0,3076 ^{ns}	0,2966 ^{ns}	0,7337 ^{ns}	0,8425 ^{ns}	0,5885 ^{ns}	1,5000 ^{ns}	5,2609
P	0,9051	0,9116	0,6030	0,5286	0,7087	0,2142	0,0009

¹Diferença não significativa (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $P < 0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $P < 0,05$);

^{ns}: não significativo.

Tabela 4. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* alimentadas com folíolos de tomateiro tratados com extratos etanólicos de diferentes estruturas e/ou espécies de Annonaceae em três concentrações. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Espécie	Estrutura	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
		24	48	72	96	120	144	
250 mg L⁻¹								
<i>A. montana</i>	F	11,61 \pm 3,46 a	11,61 \pm 3,46 a	11,61 \pm 3,46 a	13,39 \pm 3,71 a	13,39 \pm 3,71	14,28 \pm 4,05	0,85 \pm 0,06 ab
	S	4,36 \pm 1,71 a	8,72 \pm 3,42 a	13,07 \pm 5,12 a	18,33 \pm 7,05 a	26,26 \pm 9,97	34,19 \pm 13,19	0,90 \pm 0,05 ab
<i>A. muricata</i>	F	9,82 \pm 5,60 a	9,82 \pm 5,60 a	9,82 \pm 5,60 a	12,50 \pm 7,34 a	12,50 \pm 7,34	22,32 \pm 7,20	0,99 \pm 0,09 a
	S	21,22 \pm 5,49 a	21,22 \pm 5,49 a	21,22 \pm 5,49 a	23,00 \pm 5,96 a	23,89 \pm 6,38	23,89 \pm 6,38	0,86 \pm 0,06 b
<i>A. sylvatica</i>	F	7,64 \pm 1,17 a	7,64 \pm 1,17 a	7,64 \pm 1,17 a	7,64 \pm 1,17 a	10,02 \pm 2,32	11,81 \pm 2,52	0,64 \pm 0,07 b
	S	5,16 \pm 2,02 a	5,16 \pm 2,02 a	5,16 \pm 2,02 a	6,05 \pm 2,66 a	6,05 \pm 2,66	9,42 \pm 2,55	0,64 \pm 0,06 b
Controle	--	3,41 \pm 1,76 a	3,41 \pm 1,76 a	3,41 \pm 1,76 a	3,41 \pm 1,76 a	8,61 \pm 2,80	8,61 \pm 2,80	0,78 \pm 0,04 ab
F		3,1487	2,489	2,3378	2,3557	1,8678 ^{ns}	2,0286 ^{ns}	4,3285
P		0,0122	0,0375	0,0488	0,0474	0,1092	0,0830	0,0018
1.000 mg L⁻¹								
<i>A. montana</i>	F	48,21 \pm 9,90 a	71,43 \pm 7,33 a	72,32 \pm 7,20 a	72,32 \pm 7,20 a	72,32 \pm 7,20 a	72,32 \pm 7,20 a	0,24 \pm 0,02 b
	S	55,36 \pm 2,87 a	77,68 \pm 2,31 a	79,46 \pm 2,63 a	79,46 \pm 2,63 a	79,46 \pm 2,63 a	79,46 \pm 2,63 a	0,32 \pm 0,05 ab
<i>A. muricata</i>	F	44,64 \pm 5,00 a	61,61 \pm 6,31 ab	61,61 \pm 6,31 ab	61,61 \pm 6,31 ab	61,61 \pm 6,31 ab	61,61 \pm 6,31 ab	0,73 \pm 0,29 ab
	S	49,11 \pm 3,72 a	64,29 \pm 5,74 ab	65,18 \pm 5,60 ab	65,18 \pm 5,60 ab	65,18 \pm 5,60 ab	65,18 \pm 5,60 ab	0,83 \pm 0,09 a

Tabela 4.
Continuação

Espécie	Estrutura	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
		24	48	72	96	120	144	
1.000 mg L⁻¹								
<i>A. sylvatica</i>	F	35,71 ± 6,50 a	45,54 ± 7,68 b	45,54 ± 7,68 b	45,54 ± 7,68 b	45,54 ± 7,68 b	45,54 ± 7,68 b	0,51 ± 0,09 ab
	S	36,40 ± 6,23 a	44,64 ± 6,16 b	44,64 ± 6,16 b	44,64 ± 6,16 b	44,64 ± 6,16 b	44,64 ± 6,16 b	0,54 ± 0,03 ab
Controle	--	11,45 ± 1,65 b	12,50 ± 2,36 c	12,50 ± 2,36 c	12,50 ± 2,36 c	12,50 ± 2,36 c	12,50 ± 2,36 c	0,39 ± 0,11 ab
F		7,1641	14,019	14,678	14,678	14,678	14,678	2,6433
P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0454
5.000 mg L⁻¹								
<i>A. montana</i>	F	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	100,00 ± 0,00*	100,00 ± 0,00*	100,00 ± 0,00*	--**
	S	78,57 ± 4,06 b	91,96 ± 4,25 a	91,96 ± 4,25 a	92,85 ± 3,45 a	92,85 ± 3,45 a	92,85 ± 3,45 a	--**
<i>A. muricata</i>	F	98,21 ± 1,15 a	98,21 ± 1,15 a	98,21 ± 1,15 a	98,21 ± 1,15 a	98,21 ± 1,15 a	98,21 ± 1,15 a	--**
	S	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	--**
<i>A. sylvatica</i>	F	94,64 ± 2,12 a	94,64 ± 2,12 a	94,64 ± 2,12 a	96,42 ± 1,26 a	96,42 ± 1,26 a	96,42 ± 1,26 a	--**
	S	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	99,10 ± 0,89 a	--**
Controle	--	7,50 ± 1,25 c	10,00 ± 1,53 b	11,25 ± 2,34 b	15,00 ± 1,53 b	18,75 ± 2,79 b	18,75 ± 2,79 b	0,43 ± 0,08
F		66,091	49,169	47,062	104,58	92,828	92,828	--
P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	--

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

*Tratamento não incluído na análise (variância nula); ** Não analisado devido à pequena unidade amostral; ^{Ns.} Não significativo; F= Folha, S= Sementes.

Não houve diferença significativa entre as médias de mortalidade dos extratos e o controle em nenhum dos períodos avaliados. O mesmo ocorreu em relação ao efeito dos extratos sobre o peso das lagartas. Na concentração intermediária (1.000 mg L⁻¹) as mortalidades com os extratos variaram de 44,91% (24 horas) a 61,46% (144 horas). Houve diferença significativa entre as médias de mortalidade dos extratos e o controle em todos os períodos. Entretanto, não houve efeito sobre o peso das lagartas. Na concentração de 5.000 mg L⁻¹ as mortalidades ocasionadas pelos extratos variaram de 94,79% (24 horas) a 97,61% (144 horas) diferindo do controle em todos os períodos avaliados (Tabela 4). Não foi possível avaliar a influência dos extratos sobre o peso das lagartas devido ao pequeno número de indivíduos sobreviventes.

Em geral, todos os extratos das espécies de *Annona* foram eficientes no controle de lagartas de *T. absoluta* nas concentrações de 1.000 e 5.000 mg L⁻¹. A toxicidade dos compostos ativos presentes em plantas da família Annonaceae tem sido reportada sobre diferentes espécies de insetos-praga, como *Spodoptera littoralis* (Boisd.), *Leptinotarsa decemlineata* (Say), *Myzus persicae* (Sulz.) (GUADAÑO et al., 2000) *Spodoptera frugiperda*, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (COLOM et al., 2007, 2008), *Sitophilus zeamais* Motsch. (LLANOS et al., 2008; RIBEIRO et al., 2013), *Callosobruchus chinensis* L. (OHSAWA et al., 1990), *Trogoderma granarium* Everts (RAO et al., 2005). Para a avaliação dos efeitos subletais dos extratos de anonáceas sobre *T. absoluta* selecionou-se *A. muricata*, uma vez que os extratos dessa espécie apresentaram elevada toxicidade aguda sobre a fase larval do inseto e rendimento superior ao dos demais extratos.

Os extratos de *Piper* spp. causaram maiores níveis de mortalidade de lagartas de *T. absoluta* comparativamente ao controle nas duas concentrações testadas, exceto *P. mollicomum* a 2.000 mg L⁻¹ (Tabela 5). Para os extratos na concentração mais baixa (2.000 mg L⁻¹), os valores de mortalidade variaram de 9,52% a 66,7% no período de 24 horas. Com 5.000 mg L⁻¹, houve variações de 46,66% a 73,33%, nesse mesmo período. Não houve diferença significativa com relação ao efeito dos extratos sobre o peso das lagartas, verificou-se não haver diferença entre as médias dos extratos e do controle. Entretanto, o extrato de *P. mollicomum* a 5.000 mg L⁻¹ ocasionou a menor média de peso larval diferindo do extrato de *P. glabratum* e dele mesmo a 2000 mg L⁻¹. Como as espécies *P. amalago* var. *medium*, *P. glabratum* e *P. mikanianum* não diferiram entre si, a seleção

Tabela 5. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* alimentadas com folíolos de tomateiro tratados com extratos etanólicos de folhas de diferentes espécies de Piperaceae em duas concentrações. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; Fotofase: 14 h.

Espécie	Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
		24	48	72	96	120	144	
<i>P. amalago</i>	2.000	66,66 \pm 4,36 ab	67,62 \pm 4,22 ab	67,62 \pm 4,22 ab	67,62 \pm 4,22 ab	67,62 \pm 4,22 ab	67,62 \pm 4,22 ab	0,27 \pm 0,02 ab
<i>var. medium</i>	5.000	71,42 \pm 3,48 a	75,24 \pm 3,77 a	75,24 \pm 3,77 a	75,24 \pm 3,77 a	75,24 \pm 3,77 a	75,24 \pm 3,77 a	0,32 \pm 0,03 ab
<i>P. glabratum</i>	2.000	41,90 \pm 6,12 b	43,81 \pm 5,41 b	43,81 \pm 5,41 b	43,81 \pm 5,41 b	43,81 \pm 5,41 b	43,81 \pm 5,41 b	0,36 \pm 0,03 a
	5.000	60,95 \pm 9,13 ab	64,76 \pm 8,06 ab	64,76 \pm 8,06 ab	64,76 \pm 8,06 ab	64,76 \pm 8,06 ab	64,76 \pm 8,06 ab	0,26 \pm 0,03 ab
<i>P. mikanianum</i>	2.000	50,47 \pm 7,81ab	50,48 \pm 7,82 ab	50,48 \pm 7,82 ab	50,48 \pm 7,82 ab	50,48 \pm 7,82 ab	50,48 \pm 7,82 ab	0,24 \pm 0,04 ab
	5.000	46,66 \pm 6,34 ab	47,62 \pm 5,71 b	47,62 \pm 5,71 b	47,62 \pm 5,71 b	47,62 \pm 5,71 b	47,62 \pm 5,71 b	0,26 \pm 0,02 ab
<i>P. mollicomum</i>	2.000	9,52 \pm 2,86 c	11,43 \pm 2,80 c	11,43 \pm 2,80 c	11,43 \pm 2,80 c	11,43 \pm 2,80 c	11,43 \pm 2,80 c	0,36 \pm 0,07 a
	5.000	73,33 \pm 5,24 a	74,28 \pm 5,13 a	74,28 \pm 5,13 a	74,28 \pm 5,13 a	74,28 \pm 5,13 a	74,28 \pm 5,13 a	0,18 \pm 0,02 b
Controle	--	9,40 \pm 2,87 c	11,25 \pm 2,80 c	11,25 \pm 2,80 c	11,25 \pm 2,80 c	11,25 \pm 2,80 c	11,25 \pm 2,80 c	0,32 \pm 0,03 ab
F		17,339	19,455	19,455	19,455	19,455	19,455	3,0488
P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0066

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, $P < 0,05$);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $P < 0,05$).

do extrato mais ativo se baseou naquele que proporcionou as maiores médias na mortalidade de lagartas de *T. absoluta* nas duas concentrações testadas, sendo, portanto selecionado o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* para as etapas seguintes. Espécies do gênero *Piper* têm reconhecida atividade inseticida sobre diversos insetos-praga (MIYAKADO et al., 1979, 1980; SIGHAMONY et al., 1986; BAIER; WEBSTER, 1992; MBATA et al., 1995; KÉÏTA et al., 2000; DYER et al., 2003; PARK et al., 2002); entretanto, para *T. absoluta* este é o primeiro trabalho que investigou a atividade biológica do gênero.

6.4 Bioensaios com os extratos selecionados

6.4.1 Curvas de concentração-resposta

As concentrações letais estimadas para os extratos de folhas e de sementes de *A. muricata* estão detalhados na Tabela 6. Analisando-se as concentrações letais em diferentes tempos de exposição, verifica-se que não há incrementos na mortalidade após 24 horas (intervalos de confiança sobrepostos), indicando que a mortalidade de lagartas de *T. absoluta* ocorre principalmente no período que antecede a penetração na folha (Tabelas 7 e 8). Para o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium*, as concentrações letais estimadas estão na Tabela 9. Assim como ocorreu para os extratos de *A. muricata*, a mortalidade de lagartas ocorreu principalmente no período de 24 horas (Tabela 10). Os resultados obtidos sugerem que a toxicidade dos extratos estudados ocorre, sobretudo por contato das lagartas com os resíduos dos extratos e, em menor grau, por ingestão dos compostos ativos. Também constatou-se que as lagartas que não penetraram no mesófilo foliar após o contato com os resíduos apresentaram sintomas de letargia e baixa mobilidade. Outros autores observaram que insetos tratados com dieta contendo acetogeninas apresentam inicialmente níveis mais baixos de adenosina trifosfato (ATP), inibindo o sistema de transporte de elétrons mitocondrial, seguindo-se de apoptose (DEGLI ESPOSTI et al., 1994; GALLARDO et al., 2000). As piperamidas comumente encontradas no gênero *Piper* apresentam dupla atividade biológica, uma amida isobutilica neurotóxica e um grupamento metilendioxifenílico, importante inibidor de monoxigenases dependentes de citocromo P-450, muito utilizadas como sinergistas em inseticidas naturais e sintéticos (BERNARD et al., 1995). Essas enzimas apresentam um papel importante na

Tabela 6. Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (mg L⁻¹) e intervalo de confiança (IC) dos extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata*. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: 60 ± 10%; Fotofase: 14 h. Período de exposição dos insetos aos extratos (144 horas).

Extrato	n ¹	Slope ± EP (valor de P)	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) IC ² a 95%	CL ₉₀ (mg L ⁻¹) IC ² a 95%	χ ² (3)	GL ⁴	h ⁵
<i>Annona muricata</i> (S)	784	3,90 ± 0,41 (P= ns)	893,74 (757,21 – 1019)	1.817 (1.603 – 2.118)	45	6	1,12
<i>Annona muricata</i> (F)	896	2,57 ± 0,25 (P= ns)	768,13 (628,65 – 905,94)	2.251 (1.888 – 2.812)	60	7	1,28

¹número total de indivíduos testados;

²Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade;

³Teste qui-quadrado;

⁴Graus de liberdade;

⁵Fator de heterogeneidade.

Tabela 7. Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (mg L⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de sementes de *A. muricata*, em diferentes tempos de exposição. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: 60 ± 10%; Fotofase: 14 h.

Tempo de exposição (horas)	n ¹	Slope ± EP (valor de P)	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	χ ² (3) (GL ⁴ = 6)	h ⁵
24	784	4,04 ± 0,42 (P= ns)	969,30 (828,60 – 1.098)	1.920 (1.703 – 2.223)	42,2	1,08
48	784	3,90 ± 0,41 (P= ns)	893,74 (757,21 – 1019)	1.817 (1.603 – 2.118)	45	1,12
72	784	3,90 ± 0,41 (P= ns)	893,74 (757,21 – 1019)	1.817 (1.603 – 2.118)	45	1,12
96	784	3,90 ± 0,41 (P= ns)	893,74 (757,21 – 1019)	1.817 (1.603 – 2.118)	45	1,12
120	784	3,90 ± 0,41 (P= ns)	893,74 (757,21 – 1019)	1.817 (1.603 – 2.118)	45	1,12
144	784	3,90 ± 0,41 (P= ns)	893,74 (757,21 – 1019)	1.817 (1.603 – 2.118)	45	1,12

¹número total de indivíduos testados;

²Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade;

³Teste qui-quadrado;

⁴Graus de liberdade;

⁵Fator de heterogeneidade.

Tabela 8. Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (mg L⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de folhas de *A. muricata*, em diferentes tempos de exposição. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: 60 ± 10%; Fotofase: 14 h.

Tempo de exposição (horas)	n ¹	Slope ± EP (valor de P)	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	χ^2 ⁽³⁾ (GL ⁴ = 7)	h ⁵
24	896	2,70 ± 0,25 (P= 0,0567)	813,59 (676,25 – 950,81)	2.262 (1.903 – 2.817)	63,3	1,35
48	896	2,57 ± 0,25 (P= ns)	768,13 (628,65 – 905,94)	2.251 (1.888 – 2.812)	60	1,28
72	896	2,57 ± 0,25 (P= ns)	768,13 (628,65 – 905,94)	2.251 (1.888 – 2.812)	60	1,28
96	896	2,57 ± 0,25 (P= ns)	768,13 (628,65 – 905,94)	2.251 (1.888 – 2.812)	60	1,28
120	896	2,57 ± 0,25 (P= ns)	768,13 (628,65 – 905,94)	2.251 (1.888 – 2.812)	60	1,28
144	896	2,57 ± 0,25 (P= ns)	768,13 (628,65 – 905,94)	2.251 (1.888 – 2.812)	60	1,28

¹número total de indivíduos testados

²Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade

³Teste qui-quadrado;

⁴Graus de liberdade;

⁵Fator de heterogeneidade.

Tabela 9. Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (mg L⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de *P. amalago* var. *medium*. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: 60 ± 10%; Fotofase: 14 h. Período de exposição dos insetos aos extratos (144 horas).

Extrato	n ¹	Slope ± EP (valor de P)	CL ₅₀ (mg L ⁻¹) IC ² a 95%	CL ₉₀ (mg L ⁻¹) IC ² a 95%	χ ² (³) (GL ⁴ = 6)	h ⁴
<i>P. amalago</i> var. <i>medium</i> (F)	744	1,87 ± 0,25 (P= 0,0009)	1.011 (688,79 – 1.311)	4.440 (3.475 – 6.303)	73,91	1,84

¹número total de indivíduos testados;

²Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade;

³Teste qui-quadrado;

⁴Graus de liberdade;

⁵Fator de heterogeneidade.

Tabela 10. Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ (mg L⁻¹) e intervalo de confiança (IC) do extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium*, em diferentes tempos de exposição. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: 60 ± 10%; Fotofase: 14 h.

Tempo de exposição (horas)	n ¹	Slope± EP (valor de P)	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	χ ² (³) (GL ⁴ = 6)	h ⁵
24	744	1,86 ± 0,24 (P < 0,0001)	1008 (700,24 – 1.295)	4.464 (3.510 – 6.281)	70,8	1,77
48	744	1,87 ± 0,25 (P < 0,0009)	1.011 (688,79 – 1.311)	4.440 (3.475 – 6.303)	73,91	1,84
72	744	1,87 ± 0,25 (P < 0,0009)	1.011 (688,79 – 1.311)	4.440 (3.475 – 6.303)	73,91	1,84
96	744	1,87 ± 0,25 (P < 0,0009)	1.011 (688,79 – 1.311)	4.440 (3.475 – 6.303)	73,91	1,84
120	744	1,87 ± 0,25 (P < 0,0009)	1.011 (688,79 – 1.311)	4.440 (3.475 – 6.303)	73,91	1,84
144	744	1,87 ± 0,25 (P < 0,0009)	1.011 (688,79 – 1.311)	4.440 (3.475 – 6.303)	73,91	1,84

¹número total de indivíduos testados;

²Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade;

³Teste qui-quadrado;

⁴Graus de liberdade;

⁵Fator de heterogeneidade.

transformação oxidativa de moléculas endógenas e xenobióticos. A inibição dessa enzima promovida por extratos de moléculas endógenas e xenobióticos. A inibição dessa enzima promovida por extratos de plantas do gênero *Piper* impedem a detoxificação pelo inseto (MEYER, 2005).

6.4.2 Efeito dos extratos selecionados sobre aspectos biológicos de *T. absoluta*

O extrato de sementes de *A. muricata* alongou a fase larval de *T. absoluta*, além de causar elevada mortalidade de lagartas, diferindo do controle (Tabela 11). Não houve diferenças significativas quanto ao peso, duração e mortalidade pupal de *T. absoluta* assim como para a razão sexual e longevidade de adultos (Tabela 12 e 13). O extrato de folhas de *A. muricata* apenas prolongou o período de L1 a adulto (Tabela 13).

Para os extratos de *P. amalago* var. *medium* houve um alongamento significativo da fase larval do inseto (Tabela 14), bem como da fase pupal (Tabela 15). No entanto as médias de mortalidade, nesses estágios não diferiram do controle. O extrato de *P. amalago* var. *medium* também alongou o período de L1 (lagartas recém-eclodidas) a adulto e a longevidade do inseto (Tabela 16).

De maneira geral, os efeitos dos extratos sobre a biologia e desenvolvimento de *T. absoluta* não foram pronunciados. Vale destacar que o alongamento dos estágios de vida da traça é um efeito importante, uma vez que isso pode aumentar o tempo de exposição da praga aos inimigos naturais, bem como o tempo médio de cada geração, reduzindo a taxa de crescimento populacional. No entanto, o aumento causado pelo uso dos extratos na duração dos diferentes estágios de *T. absoluta* foi em média de apenas um dia. Provavelmente, a utilização de folhas inteiras e não folíolos como substrato para as lagartas pode ter interferido na qualidade do alimento fornecido. Por se tratar de uma área foliar de tamanho superior à utilizada nos experimentos anteriores (folíolos) é possível que níveis mais elevados de nutrientes tenham proporcionado maior tolerância das lagartas aos extratos. Vários trabalhos mostram os efeitos das acetogeninas de anonáceas sobre a biologia e desenvolvimento de diversos insetos-praga.

Colom et al. (2007) avaliaram o efeito de acetogeninas purificadas em dieta artificial de *S. frugiperda*. Os autores verificaram efeitos subletais pronunciados em diferentes estágios de desenvolvimento desse inseto, como deficiência na melanização de pupas, adultos com má formação de asas e abdome. Alterações morfológicas em

Tabela 11. Médias (\pm EP) de mortalidade e duração da fase larval (dias) de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Duração (dias) ¹	Mortalidade larval (%) ¹
<i>Annona muricata</i> (F)	13,89 \pm 0,13 ab	17,35 \pm 3,26 ab
<i>Annona muricata</i> (S)	14,38 \pm 0,25 a	32,73 \pm 5,72 a
Controle ²	13,54 \pm 0,16 b	12,88 \pm 3,47 b
F	5,0309	4,9144
P	0,0139	0,0155

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quasibinomial, P < 0,05);

²Controle: metanol:acetona (1:1,v/v)

F: folhas; S: sementes.

Tabela 12. Médias (\pm EP) do peso (mg), mortalidade (%) e duração da fase pupal (dias) de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Peso pupal (mg) ¹	Mortalidade pupal (%) ²	Duração (dias) ¹
<i>Annona muricata</i> (F)	3,61 \pm 0,14	9,80 \pm 3,77	8,87 \pm 0,23
<i>Annona muricata</i> (S)	3,55 \pm 0,13	10,15 \pm 3,44	9,26 \pm 0,22
Controle ³	3,67 \pm 0,04	11,74 \pm 3,25	9,20 \pm 0,09
F	0,2495 ^{ns}	0,0378 ^{ns}	1,1679 ^{ns}
P	0,7809	0,9630	0,3262

¹Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, P < 0,05);

²Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quasibinomial, P < 0,05);

³Controle: metanol:acetona (1:1,v/v)

F: folhas; S: sementes.

Tabela 13. Médias (\pm EP) do período de L1 (lagarta recém-eclodida) a adulto (dias), longevidade do adulto (dias) e razão sexual de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Período de L1 a adulto (dias) ¹	Longevidade (dias) ²	Razão sexual ³
<i>Annona muricata</i> (F)	37,00 \pm 0,17 a	11,85 \pm 0,42	0,46 \pm 0,07
<i>Annona muricata</i> (S)	35,98 \pm 0,39 ab	11,24 \pm 0,38	0,51 \pm 0,04
Controle ⁴	35,54 \pm 0,26 b	11,63 \pm 0,37	0,52 \pm 0,05
	F = 3,6917	F = 3,0127 ^{ns}	$\chi^2 = 32,073^{\text{ns}}$
	P = 0,03826	P = 0,0659	P = 0,6979

¹Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, P < 0,05);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

³Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial, P < 0,05);

⁴Controle= metanol:acetona (1:1, v/v);

F: folhas; S: sementes.

Tabela 14. Médias (\pm EP) de mortalidade e duração da fase larval (dias) de *T. absoluta* expostas ao extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Duração (dias) ¹	Mortalidade larval (%) ²
<i>Piper amalago</i> var. <i>medium</i>	11,22 \pm 0,17 a	32,05 \pm 4,88
Controle (acetona)	10,60 \pm 0,12 b	19,17 \pm 6,09
F	9,0888	2,3645 ^{ns}
P	0,0074	0,1415

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quasibinomial, P < 0,05).

Tabela 15. Médias (\pm EP) do peso (mg), mortalidade e duração da fase pupal (dias) de *T. absoluta* expostas ao extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Peso pupal (mg) ¹	Mortalidade pupal (%) ²	Duração (dias) ³
<i>Piper amalago</i> var. <i>medium</i>	4,47 \pm 0,10	5,83 \pm 3,30	11,15 \pm 0,17 a
Controle	4,42 \pm 0,10	12,32 \pm 3,46	10,24 \pm 0,07 b
F	0,0973 ^{ns}	0,304 ^{ns}	23,705
P	0,7587	0,5882	0,00012

¹Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana, P < 0,05);

²Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quasibinomial, P < 0,05);

³Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05).

Tabela 16. Médias (\pm EP) do período de L1 a adulto (dias), longevidade do adulto (dias) e razão sexual de *T. absoluta* expostas ao extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Período de L1 a adulto (dias) ¹	Longevidade (dias) ¹	Razão sexual ²
<i>Piper amalago</i> var. <i>medium</i>	37,88 \pm 0,44 a	15,15 \pm 0,20 a	0,55 \pm 0,07
Controle (acetona)	36,01 \pm 0,45 b	14,10 \pm 0,13 b	0,51 \pm 0,05
	F = 8,8147	F = 7,7133	$\chi^2 = 24,751^{\text{ns}}$
	P = 0,00822	P = 0,01243	P = 0,7663

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial, P < 0,05).

lagartas e pupas também foram observados por Blessing et al. (2010), utilizando acetogeninas extraídas de *A. montana* sobre a lagarta-do-cartucho. Grzybowski (2012) verificou que os extratos etanólicos de sementes de *A. muricata* e de frutos de *Piper nigrum* causaram modificações morfológicas em larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

6.4.3 Avaliação quanto à preferência para oviposição de *T. absoluta*

No ensaio em que se avaliou a preferência para oviposição de *T. absoluta* em condições de livre escolha, os extratos de folhas e sementes de *A. muricata* foram classificados como neutros em relação ao controle (Tabela 17). No entanto, a

Tabela 17. Médias (\pm EP) do número de ovos/planta de *T. absoluta* em teste de preferência para oviposição com chance de escolha, em plantas tratadas com extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente e ao extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Nº. ovos/planta (%)	Índice de deterrência (\pm DP)	Intervalo de classificação	Classificação
<i>Annona muricata</i> (F)	39,60	0,75 \pm 0,40	1,00 \pm 0,34	Neutro
Controle	60,40			
<i>Annona muricata</i> (S)	35,42	0,68 \pm 0,51	1,00 \pm 0,42	Neutro
Controle	64,58			
<i>Piper amalago</i> (F)	26,14	0,58 \pm 0,42	1,00 \pm 0,35	Deterrente
Controle	73,86			

F= Folhas; S= Sementes.

deterrência à oviposição foi verificada nas plantas tratadas com o extrato de *P. amalago* var. *medium*. O número de ovos depositados por *T. absoluta* foi reduzido pelo extrato de *Piper* em cerca de 60% em relação ao controle. No teste sem chance de escolha, não houve diferença entre os tratamentos avaliados (Tabela 18). Para o extrato de *P. amalago* var. *medium* o padrão de oviposição não se manteve na ausência de escolha. Apesar disso, o valor absoluto de ovos/planta do extrato de *Piper* foi o menor em comparação aos outros tratamentos, com redução em torno de 35% em relação ao controle.

Utilizando extratos de folhas e sementes de meliáceas (*Melia azedarach* e *Azadiracta indica*), respectivamente, Brunherotto et al. (2010) também verificaram reduções na oviposição de *T. absoluta* em plantas de tomateiro tratadas com os respectivos extratos.

A presença de compostos químicos na superfície das folhas desempenha um papel importante na seleção do hospedeiro por mariposas e borboletas (RENEWICK; CHEW, 1994). Muitos extratos de plantas têm sido testados para avaliar a atividade deterrente sobre uma variedade de insetos-praga, visando à utilização em programas de manejo integrado de pragas (MORGAN; MANDAVA, 1990). Os extratos de *Piper* apresentam características exclusivas do gênero, como diversificados modos de ação presentes em um único composto ativo (SCOTT et al., 2004; DYER et al., 2003; PARK et al., 2002). Bernard et al. (1995) observaram que a associação de compostos presentes no

Tabela 18. Médias (\pm EP) do número de ovos/planta de *T. absoluta* em teste de oviposição sem chance de escolha, em plantas tratadas com extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente e extratos de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Nº ovos/planta
<i>Annona muricata</i> (F)	48,60 \pm 6,98
<i>Annona muricata</i> (S)	45,20 \pm 9,60
<i>Piper amalago</i> var. <i>medium</i> (F)	35,80 \pm 12,10
Controle (acetona)	55,40 \pm 5,61
Controle (metanol:acetona, 1:1, v/v)	58,40 \pm 6,33
F	1,0023 ^{ns}
P	0,4296

^{ns} Diferença não significativa entre as médias (GLM com distribuição quase-Poisson, P < 0,05).

gênero *Piper* como por exemplo, lignanas ligadas ao grupo metilenedioxifenil, apresentam efeitos repelentes e deterrentes para várias espécies de insetos. Scott et al. (2004) avaliaram a oviposição de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) em plantas de *Capsicum annuum* L. tratadas com o extrato de *Piper guineense* L. a 0,5%. Os autores encontraram diferenças significativas entre o controle (água), e o extrato, o qual inibiu a oviposição do inseto, comparativamente aos produtos comerciais utilizados (Ropel[®], Garlic Barrier[®]).

6.4.4 Avaliação do efeito ovicida

O extrato de *P. amalago* var. *medium* apresentou toxicidade sobre ovos de *T. absoluta*, diferindo significativamente do controle (Tabela 19). Entretanto, não se verificou diferença entre as médias de lagartas eclodidas nos controles e extratos de *A. muricata*.

A atividade ovicida de extratos com plantas do gênero *Piper* sp. foi verificada por Boff e Almeida (1995) sobre *Sitotroga cerealella* Oliver. Esses autores avaliaram o efeito tóxico dos extratos metanólicos e acetônicos de *P. nigrum*, obtidos por diferentes métodos sobre ovos de diferentes idades do inseto. Os resultados demonstraram

Tabela 19. Médias (\pm EP) de eclosão de lagartas de *T. absoluta* após pulverização com os extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 768,13 mg L⁻¹ e 893,74 mg L⁻¹, respectivamente e de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 1.011 mg L⁻¹ sobre ovos do inseto. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Eclosão de lagartas (%) ¹
<i>Annona muricata</i> (F)	97,71 \pm 0,80 a
<i>Annona muricata</i> (S)	96,85 \pm 1,16 a
<i>P. amalago</i> var. <i>medium</i> (F)	84,43 \pm 5,47 b
Controle (acetona)	96,85 \pm 1,54 a
Controle (metanol:acetona, 1:1, v/v)	97,53 \pm 0,96 a
χ^2	54,334
P	< 0,0001

¹Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05); F= Folha; S= sementes

que os extratos apresentaram efeito tóxico dependente da concentração, para todas as idades de ovos.

Tavares et al. (2011) avaliaram o efeito da amida piperina extraída de frutos de *P. nigrum* sobre ovos de diferentes idades de *S. frugiperda* e *Diatraea saccharalis* (Fabr.) nas concentrações de 1 e 2%. Os autores concluíram que, em ovos com 24 horas de idade, a concentração de 1% de piperina foi suficiente para suprimir a eclosão de lagartas das espécies estudadas em cerca de 90%.

Informações referentes aos efeitos de extratos botânicos sobre ovos de *T. absoluta* são restritos na literatura (BRUNHEROTTO et al., 2010; THOMAZINI et al., 2000; FERREIRA, 2011). Esses autores avaliaram o efeito ovicida de diferentes meliáceas, incluindo o nim (*A. indica*) e não observaram efeitos sobre os ovos da traça-do-tomateiro, semelhantes aos resultados encontrados neste trabalho para os extratos de *A. muricata*. Segundo Schmutterer (1988), diversos trabalhos mostram que aplicações de altas concentrações de extratos de plantas, podem resultar em pequenos efeitos ou mesmo em nenhum efeito ovicida. Geralmente, ovos de lepidópteros possuem uma camada lipídica ou cerosa na parte interna do córion do ovo que impede a penetração de inseticidas (SMITH; SALKELD, 1966). É possível que, os compostos ativos dos extratos de *A. muricata* não conseguiram penetrar nessa camada lipídica e afetar o desenvolvimento embrionário de *T. absoluta*, ou ainda, que sejam inócuos aos ovos do inseto.

Para outras ordens de insetos, alguns trabalhos mostram o efeito ovicida de extratos de plantas do gênero *Annona*. Kempraj e Bhat (2011) encontraram efeito ovicida de todas as frações avaliadas do extrato etanólico de sementes de *Annona squamosa* sobre o díptero *Aedes albopitus* (Skuse). Com o coleóptero *Callosobruchus maculatus* F., Dharmasena et al. (2001) utilizaram extratos acetônicos e etanólicos de folhas frescas de *A. squamosa* e encontraram efeitos deletérios sobre ovos recém ovipositados desse inseto.

6.4.5 Avaliação do efeito translaminar sobre *T. absoluta*

Os extratos de folhas e de sementes de *A. muricata* apresentaram efeito translaminar significativo sobre *T. absoluta* em todos os períodos de avaliação (Tabela 20). Com relação ao efeito dos extratos de *A. muricata* sobre o peso das lagartas, verificou-se diferença significativa em relação ao controle (metanol:acetona, 1:1, v/v) reduzindo o valor desse parâmetro. Deve-se ressaltar que o extrato de folhas de *A. muricata* diferiu também do controle acetona, solvente utilizado na ressuspensão do extrato de *P. amalago* var. *medium*. Para o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* não houve diferença significativa com relação a mortalidade de lagartas. Em relação ao peso, *P. amalago* var. *medium* diferiu apenas do controle (acetona:metanol, 1:1, v/v), utilizado para a ressuspensão dos extratos de *A. muricata*. De acordo com os resultados, os extratos de *A. muricata* são capazes de penetrar no mesófilo foliar e atingir as lagartas. Provavelmente, esse efeito translaminar seria mais pronunciado se tivessem sido utilizadas plantas cultivadas em vasos e não apenas folhas, já que a translocação do extrato na planta se daria também por via sistêmica, potencializando os efeitos encontrados.

A ação translaminar dos compostos inseticidas dos extratos de *A. muricata* assegura maior proteção dos compostos ativos contra os fatores ambientais, tais como temperatura e raios ultravioletas, e aumentando a persistência do produto. Essa é uma característica interessante para produtos de origem botânica que normalmente apresentam rápida degradação, principalmente quando expostos às condições naturais.

Ainda sobre o peso das lagartas, é possível que a redução do peso esteja relacionada à pouca ingestão de alimento, devido à presença de compostos inibidores de alimentação. Outra hipótese seria a de que os extratos de *A. muricata* poderiam causar efeitos nocivos às células do intestino, restringindo a digestão e absorção de alimento. As acetogeninas de anonáceas são bem conhecidas por sua toxicidade aguda,

Tabela 20. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de *T. absoluta* expostas a extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* nas concentrações de 3.840 mg L⁻¹ e 4.468 mg L⁻¹, respectivamente e para o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* na concentração de 5.055 mg L⁻¹, após a penetração no mesófilo foliar. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; Fotofase: 14 h.

Tratamento	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
	24	48	72	96	120	144	
<i>A. muricata</i> (F)	49,00 \pm 13,41 a	49,00 \pm 13,41 a	49,00 \pm 13,41 a	49,00 \pm 13,41 a	49,00 \pm 13,41 a	50,00 \pm 5,70 a	3,62 \pm 0,86 c
<i>A. muricata</i> (S)	41,00 \pm 6,20 ab	41,00 \pm 6,20 ab	41,00 \pm 6,20 ab	41,00 \pm 6,20 ab	41,00 \pm 6,20 ab	43,00 \pm 6,04 ab	6,56 \pm 1,45 bc
<i>P. amalago</i> (F)	23,00 \pm 4,64 bc	23,00 \pm 4,64 bc	23,00 \pm 4,64 bc	23,00 \pm 4,64 bc	24,00 \pm 4,58 bc	24,00 \pm 4,58 bc	9,06 \pm 1,17 b
Controle (acetona)	9,00 \pm 2,92 c	9,00 \pm 2,92 c	9,00 \pm 2,92 c	9,00 \pm 2,92 c	9,00 \pm 2,91 c	10,00 \pm 3,16 c	12,88 \pm 2,01 ab
Controle ³	11,00 \pm 5,57 c	11,00 \pm 5,57 c	11,00 \pm 5,57 c	11,00 \pm 5,57 c	11,00 \pm 5,57 c	11,00 \pm 5,57 c	13,10 \pm 2,47 a
F	10,001	10,001	10,001	10,001	10,192	10,721	5,8183
P	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,000115	< 0,0001	0,00284

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Médias seguidas de letras distintas, na coluna, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

³Controle= metanol:acetona (1:1, v/v);

F= Folha; S= Semente.

mas raramente pelos seus efeitos anti-alimentares (GUADAÑO et al. 2000). Blessing et al. (2010) estudaram os efeitos tóxicos e anti-alimentares de acetogeninas isoladas do extrato de *A. montana* sobre *S. frugiperda*. Todas as acetogeninas adicionadas na dieta artificial do inseto promoveram elevada toxicidade aguda sobre as fases larval e pupal. Entretanto, apenas algumas acetogeninas inibiram a alimentação das lagartas em cerca de 80%. Os autores afirmam que os efeitos tóxicos e anti-alimentares observados variam conforme a presença de grupamentos do tipo tetraidrofurânicos (THF) na cadeia das acetogeninas, e que são necessários estudos para elucidar os mecanismos e os requerimentos estruturais necessários para que a atividade deterrente aconteça. Segundo Rupprecht et al. (1990), as acetogeninas podem ser mono-THF, bis-THF adjacentes, bis-THF não adjacentes, não conter anéis THF e ainda acetogeninas não clássicas que possuem anel tetraidropirânico.

Colom et al. (2007) também avaliaram os efeitos tóxicos e deterrentes de alimentação de acetogeninas extraídas de *A. cherimólia* para *S. frugiperda*. A acetogenina esquamocina causou 100% de mortalidade na fase larval do inseto e reduziu a eficiência na conversão do alimento em biomassa. Portanto, isso pode ser um indicativo de que a inibição do complexo I mitocondrial, muito estudado em diversos organismos não seja o único modo de ação das anonáceas que causam toxicidade a insetos.

6.5 Fracionamento dos extratos de *A. muricata*

O rendimento em frações dos extratos selecionados apresentou grande variação, de 10,61 a 55,23% (Tabela 21). As frações hexânica e hidroalcolólica do extrato de sementes de *A. muricata* apresentaram os maiores rendimentos, com 55,23 e 38,46%, respectivamente. O elevado rendimento da fração hexânica se deve ao elevado conteúdo lipofílico, normalmente encontrado em sementes do gênero *Annona*, comumente extraído com solventes de menor polaridade como o hexano, justificando esse maior rendimento. Para o extrato de folhas de *A. muricata*, o maior rendimento foi obtido na fração em acetato de etila (27,48%), seguido da fração em diclorometano (16,98%) e hexano (12,38%). Com isso, verifica-se que as frações com polaridade intermediária (acetato de etila e diclorometano) apresentaram os melhores rendimentos.

Tabela 21. Rendimento das partições dos extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata*

Espécie vegetal (estrutura)	Peso extrato (g)	Frações	Rendimento ¹	
			(g)	(%)
<i>Annona muricata</i> (F)	8,48	Hexano	1,05	12,38
		Diclorometano	1,44	16,98
		Acetato de etila	2,33	27,48
		Hidroálcool	0,90	10,61
<i>Annona muricata</i> (S)	6,50	Hexano	3,59	55,23
		Hidroálcool	2,50	38,46

F: folhas; S: sementes

6.5.1 Avaliação da bioatividade das partições obtidas

Verificou-se que as frações em diclorometano e acetato de etila do extrato de folhas de *A. muricata* apresentaram as maiores médias de mortalidade, diferindo do controle [metanol:acetona (1:1, v/v)] após 24 horas de exposição (Tabela 22). A redução no peso larval foi verificada nas frações citadas anteriormente, além da fração hidroalccólica. Para o extrato de sementes de *A. muricata*, a fração hidroalccólica causou maior mortalidade de lagartas quando comparado ao controle, em todos os períodos de observação (Tabela 23). Ao final do ensaio, o nível de mortalidade foi quatro vezes superior ao obtido no controle. Em relação ao efeito das frações sobre o peso do inseto, a fração hidroalccólica reduziu em 32,32% o peso das lagartas, diferindo do controle. Verifica-se que as frações em diclorometano e acetato de etila do extrato de folhas de *A. muricata* e a fração hidroalccólica do extrato de sementes apresentaram os melhores resultados. No entanto, os efeitos da fração hexânica do extrato de sementes de *A. muricata* sobre a fase larval do inseto foram baixos.

SOUSA et al. (2009) observaram que no fracionamento do extrato de folhas de *A. muricata* os solventes polares ou com polaridades intermediárias apresentaram maior concentração de acetogeninas.

Grzybowski (2012) obteve excelentes resultados sobre o crustáceo *Artemia salina* tanto com o extrato bruto de sementes de *A. muricata*, quanto nas frações mais polares do extrato. Para as frações hexânica e em clorofórmio não foi verificada

Tabela 22. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas as frações do extrato etanólico de folhas de *A. muricata*, na concentração de 768,13 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; fotofase: 14 h.

Frações	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
	24	48	72	96	120	144	
Hexânica	18,75 \pm 4,31 bc	18,75 \pm 4,31 bc	19,64 \pm 5,00 bc	21,43 \pm 4,69 bc	21,43 \pm 4,69 bc	21,43 \pm 4,69 bc	0,69 \pm 0,10 ab
Diclorometânica	38,39 \pm 6,88 a	40,18 \pm 7,32 a	41,07 \pm 7,82 a	45,54 \pm 7,56 a	45,54 \pm 7,56 a	45,54 \pm 7,56 a	0,58 \pm 0,10 b
Acetato de etila	30,36 \pm 6,74 ab	31,25 \pm 6,82 ab	33,93 \pm 5,92 ab	33,93 \pm 5,92 ab	33,93 \pm 5,92 ab	33,93 \pm 5,92 ab	0,65 \pm 0,07 b
Hidroalcoólica	1,78 \pm 1,15 d	1,78 \pm 1,15 d	1,78 \pm 1,15 d	4,46 \pm 2,63 c	5,36 \pm 2,52 c	5,36 \pm 2,52 c	0,57 \pm 0,04 b
Metanol:acetona(1:1)	6,25 \pm 1,92 cd	6,25 \pm 1,92 cd	6,25 \pm 1,92 cd	8,03 \pm 2,63 c	8,03 \pm 2,63 c	8,03 \pm 2,63 c	0,99 \pm 0,09 a
Metanol:água (1:1) ³	0,89 \pm 0,89 d	2,68 \pm 1,26 d	2,68 \pm 1,26 d	2,68 \pm 1,26 d	2,68 \pm 1,26 d	2,68 \pm 1,26 d	0,67 \pm 0,06 ab
F	15,919	15,539	16,587	14,900	15,165	15,165	3,673
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0086

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

³Controle = utilizado para a suspensão da fração hidroalcoólica do extrato de folhas.

Tabela 23. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas as frações do extrato de sementes de *A. muricata*, na concentração de 893,74 mg L⁻¹. T.: 25 \pm 2 °C; U. R.: 60 \pm 10%; fotofase: 14 h.

Frações	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
	24	48	72	96	120	144	
Hexânica	13,39 \pm 3,46 ab	13,39 \pm 3,46 ab	14,28 \pm 3,26 b	14,28 \pm 3,26 b	14,28 \pm 3,26 b	14,28 \pm 3,26 b	0,99 \pm 0,06 a
Hidroalcoólica	21,43 \pm 3,00 a	21,43 \pm 3,00 a	33,93 \pm 3,57 a	36,61 \pm 4,19 a	36,61 \pm 4,19 a	36,61 \pm 4,19 a	0,67 \pm 0,05 b
Metanol:acetona (1:1) ³	6,25 \pm 1,92 b	6,25 \pm 1,92 b	6,25 \pm 1,92 b	8,03 \pm 2,63 b	8,03 \pm 2,63 b	8,03 \pm 2,63 b	0,99 \pm 0,09 a
F	6,9132	6,9132	19,796	21,250	21,250	21,250	7,641
P	0,0059	0,0059	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0039

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Médias seguidas de letras distintas, nas colunas de cada concentração testada, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

³Controle.

atividade sobre *A. salina*. É possível que a presença de grupos hidroxilas na estrutura de muitas acetogeninas esteja relacionada com a solubilidade desses compostos em solventes com maior polaridade (GU et al., 1995).

6.5.2 Análise cromatografica em camada delgada (CCD)

Os perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD), das frações bioativas sobre lagartas de *T. absoluta* dos extratos de folhas e sementes de *A. muricata*, em diferentes eluentes e reveladores, encontram-se representados nas Figuras 5 e 6. O revelador anisaldeído sulfúrico (perfil cromatográfico A), capaz de detectar compostos como esteroides e terpenóides mostraram resultados positivos nas amostras analisadas (Figura 5), da mesma maneira para o revelador iodo (perfil cromatográfico B), considerado um reagente universal. Quando se utilizou o revelador específico para alcaloides, Dragendorff (perfil cromatográfico C) não foi possível detectar esse tipo de composto nas amostras, assim como para o revelador sulfato cérico (perfil cromatográfico D). Quando as cromatoplasmas foram reveladas com luz UV, apenas a cromatoplasma C na amostra 1 apresentou compostos que possuem grupos cromóforos. Essa detecção somente ocorreu com o aumento da polaridade (Figura 6). Uma análise geral das cromatoplasmas indica similaridade entre as frações em diclorometano e acetato de etila do extrato de folhas de *A. muricata* e poderá auxiliar na análise dos resultados dos ensaios com *T. absoluta*.

6.5.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

O espectro de RMN de ^1H da partição hidroalcoólica do extrato etanólico de sementes de *A. muricata* (Figura 8) mostrou a presença majoritária de acetogeninas (estrutura geral mostrada na Figura 7) na amostra analisada. Isso se deve à presença dos seguintes sinais: hidrogênios da insaturação do anel lactônico em deslocamento químico δ_{H} 7,40; diversos sinais em torno de δ_{H} 5,2-5,4, característicos de hidrogênio do carbono insaturado do anel lactônico; sinais entre δ_{H} 3,35-3,84, que são característicos dos hidrogênios de grupos metínicos (CH) da cadeia alquílica ligados diretamente a grupos hidroxilas ou a grupos epóxido; sinais na faixa δ_{H} 2,01-2,52 que são característicos de hidrogênios α -lactônicos e/ou α -carbonílicos, no caso de moléculas com grupos cetonas nas cadeias alquílicas; sinais na faixa de δ_{H} 1,4-1,7, referentes aos diversos

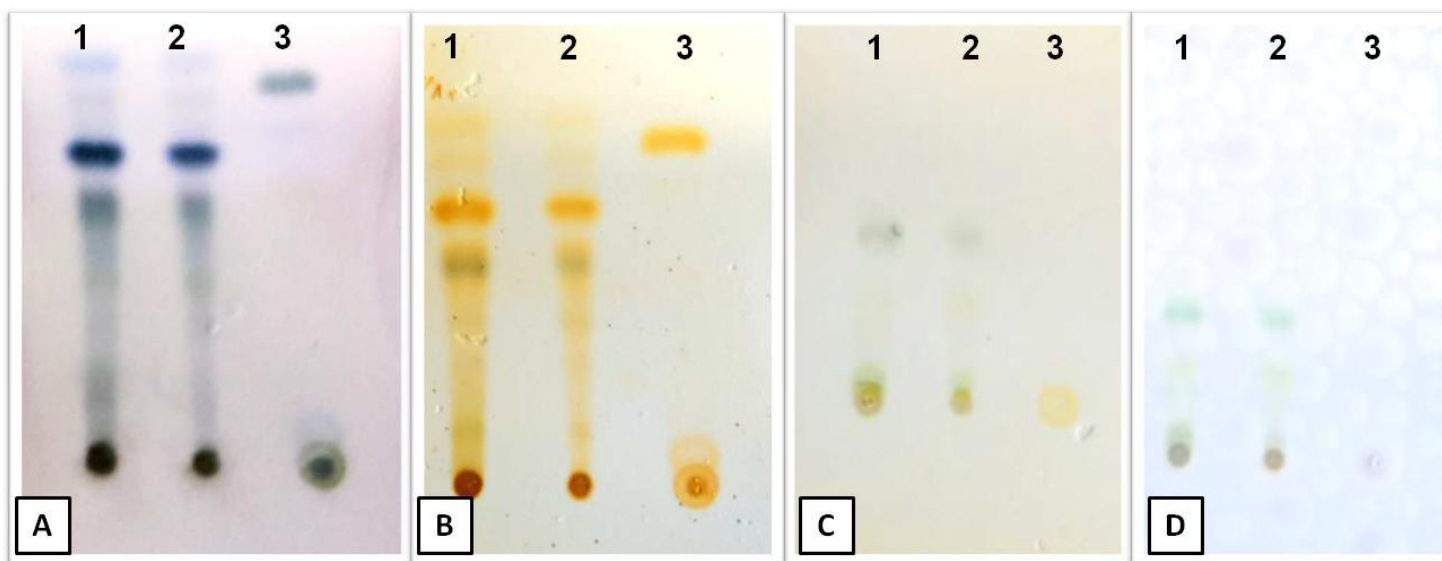


Figura 4. Perfis cromatográficos das frações dos extratos de folhas e sementes de *A. muricata*; eluente: hexano:acetato de etila (8:2, v/v); Amostras: (1) Fração em diclorometano do extrato de folhas de *A. muricata*; (2) Fração em acetato de etila do extrato de folhas de *A. muricata* e (3) Fração hidroalcoólica do extrato de sementes de *A. muricata*; em diferentes reveladores (A) anisaldeído sulfúrico; (B) iodo; (C) Dragendorff e (D) sulfato cérico.

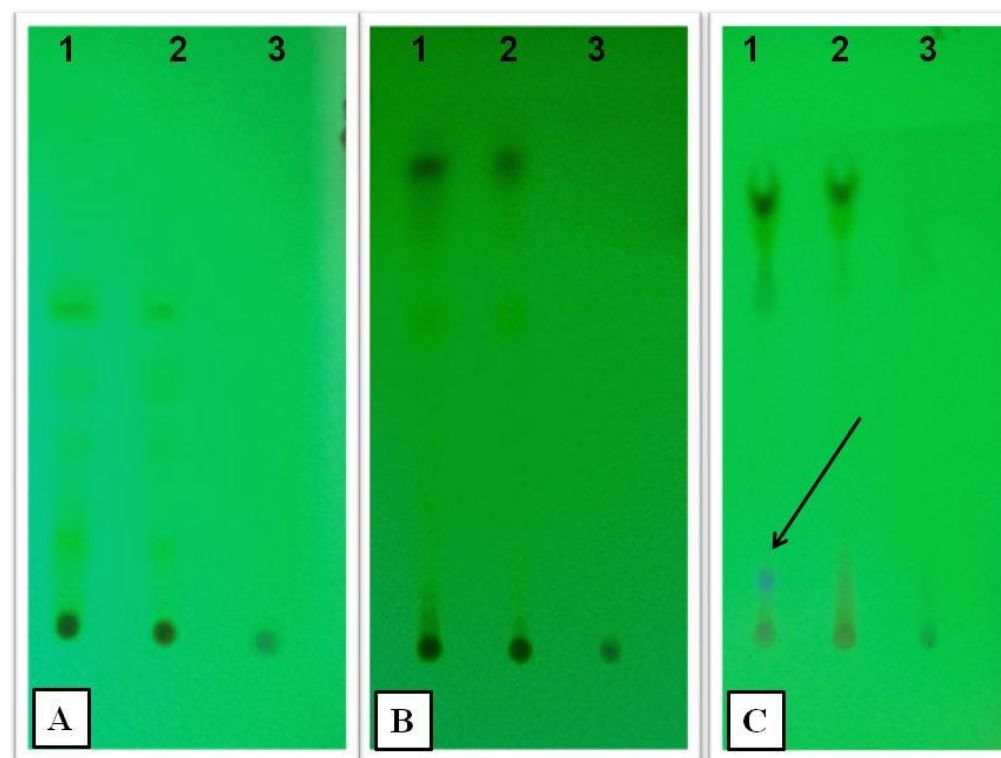


Figura 5. Perfis cromatográficos das frações do extrato de folhas e sementes de *A. muricata*; Amostras: (1) Fração em diclorometano do extrato de folhas de *A. muricata*; (2) Fração em acetato de etila do extrato de folhas de *A. muricata*; (3) Fração hidroalcolica do extrato de sementes de *A. muricata*; em diferentes eluentes através de luz ultravioleta (A) hexano:acetato de etila (7:3 v/v); (B) hexano:acetato de etila 7:3 (v/v) com inversão da polaridade; (C) acetato de etila:metanol (8:2, v/v) aumento na polaridade.

grupos CH_2 que ocorrem ao longo das cadeias alquílicas e sinais em δ_{H} 0,9, característicos de metilas terminais de cadeias alquílicas longas.

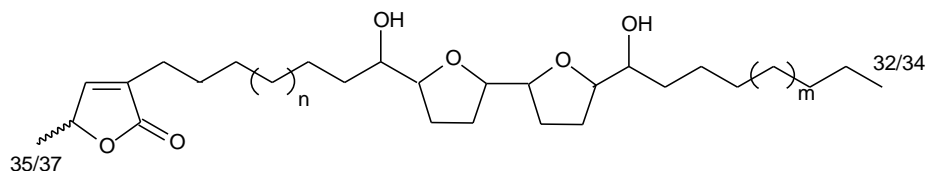


Figura 7. Estrutura geral de acetogeninas

O espectro da fração diclorometânica do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* também apresentou sinais característicos na região de acetogeninas (Figura 9). Por sua vez, a partição em acetato de etila do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* (Figura 10) apresentou semelhanças com a anterior, sugerindo a presença de acetogeninas bastante hidroxiladas, fato que ainda deve ser melhor elucidado em outras análises complementares ou ao longo das etapas do fracionamento biomonitorado a ser realizado.

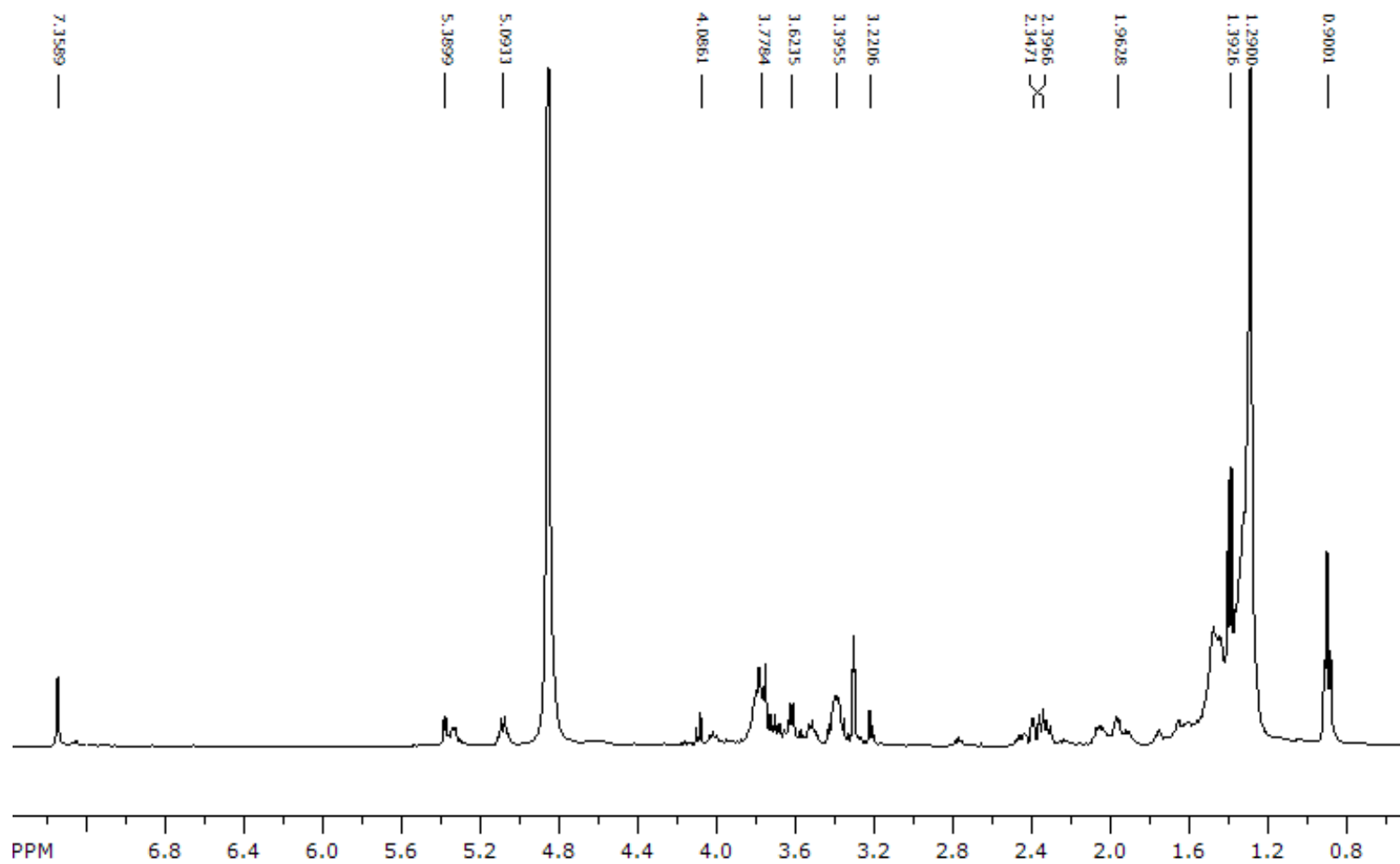


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H da partição hidroalcoólica do extrato bruto de sementes de *A. muricata* (DMSO d_6 , 400 MHz).

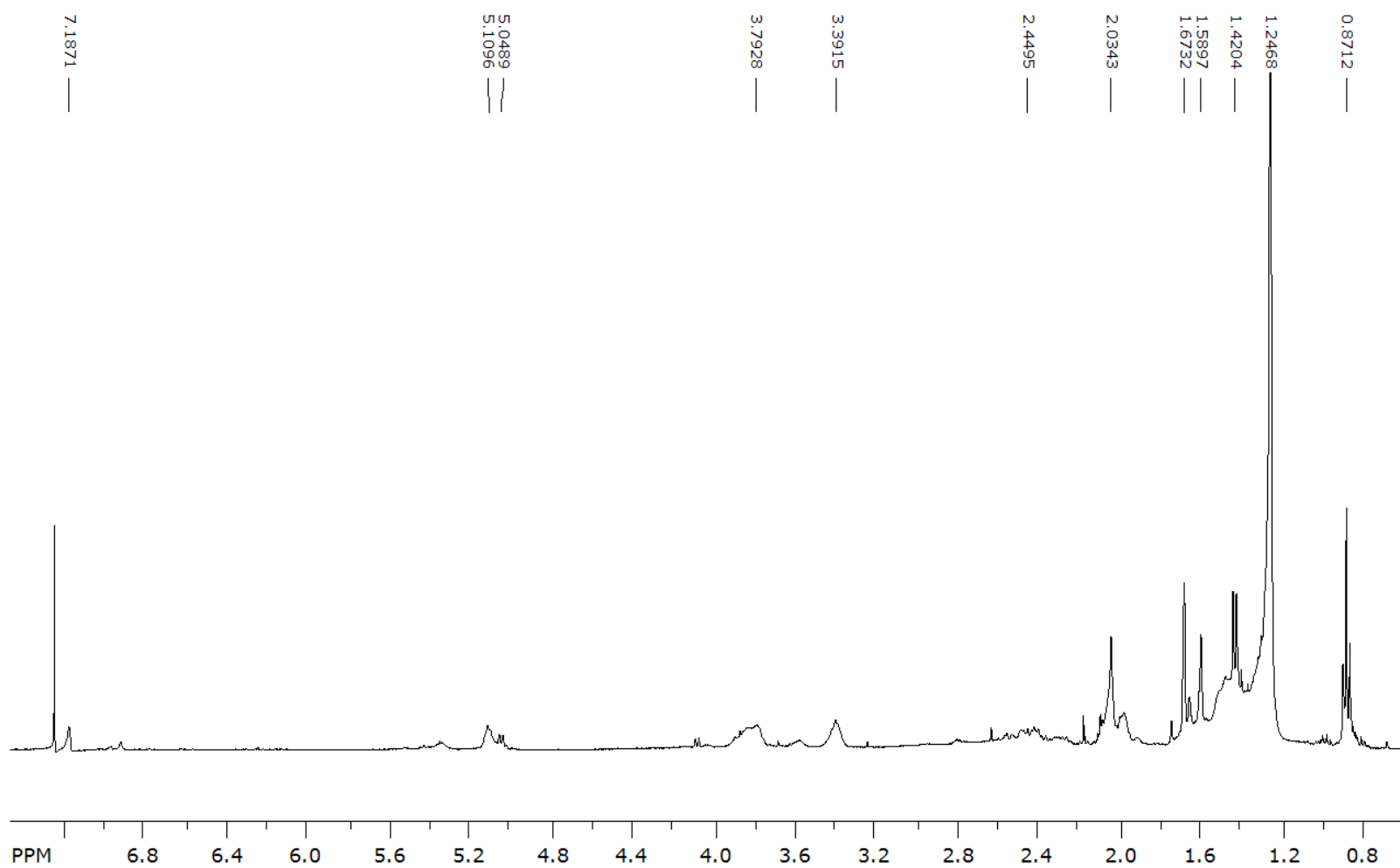


Figura 9. Espectro de RMN de ¹H da partição diclorometânica do extrato bruto de folhas de *A. muricata* (CDCl₃, 400MHz).

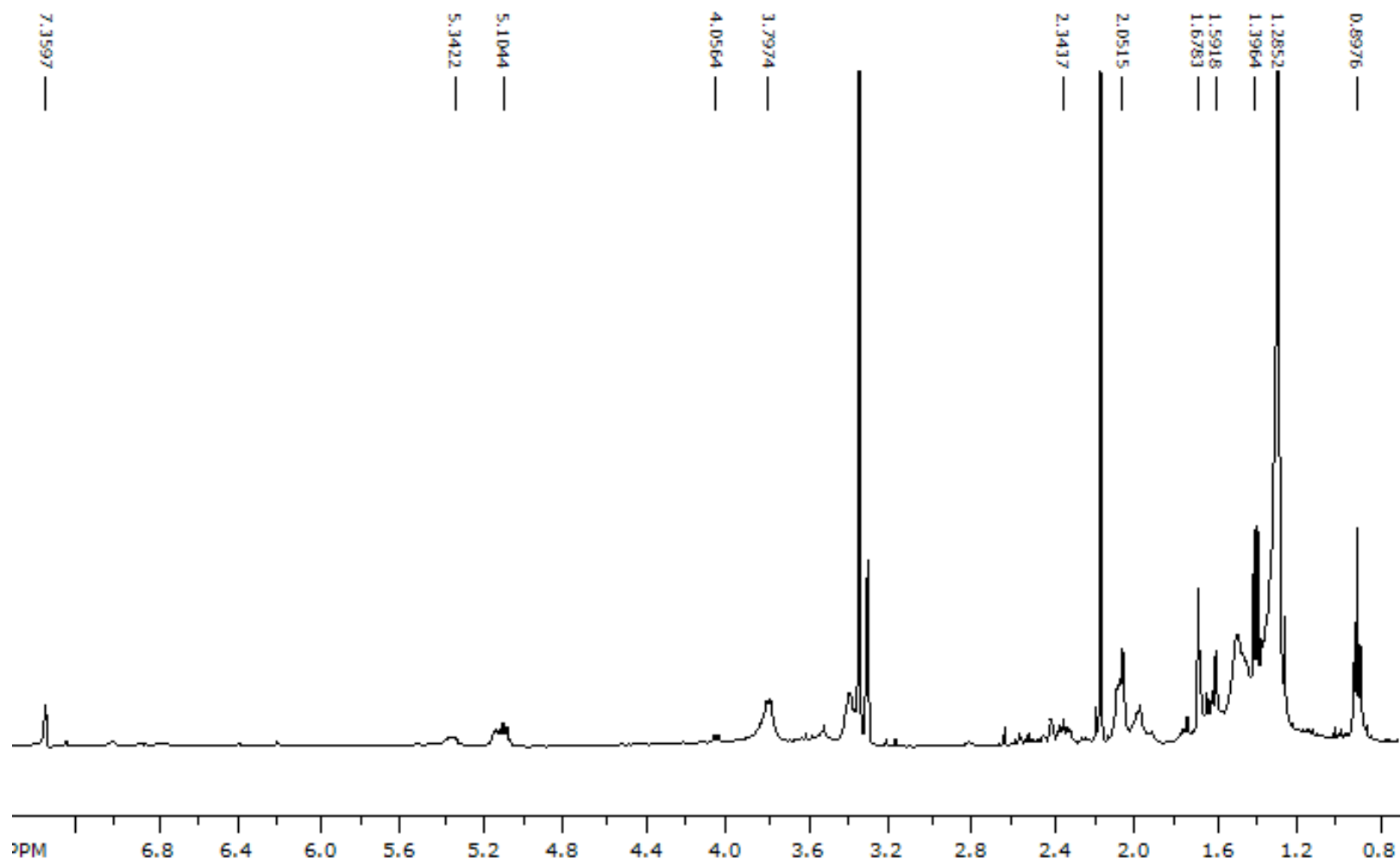


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H da partição acetato de etila do extrato bruto de folhas de *A. muricata* (DMSO-*d*₆, 400MHz).

6.6 Bioensaios de toxicidade comparada

A análise inicial realizada para quantificação dos limonóides presentes no biopesticida Azamax[®] os resultados revelaram a presença de 6.220,15 mg L⁻¹ de azadiractina e 2.596 mg L⁻¹ de 3-tigloylazadirachtol.

No ensaio de laboratório que comparou a toxicidade entre o extrato formulado de sementes de *A. muricata* e formulações comerciais à base de acetogeninas e azadiractina + 3-tigloylazadirachtol, verificou-se que todos os tratamentos diferiram significativamente dos controles (água deionizada e metanol + Tween 80), a partir de 24 horas (Tabela 24). O extrato de sementes de *A. muricata* causou mortalidade de lagartas próxima a 92% após 48 horas, semelhante àquelas obtidas para a formulação comercial (Anosom[®]) à base de acetogeninas (94,64%) e para Azamax (94,64%). Com relação ao efeito dos tratamentos sobre o peso de *T. absoluta*, não foi possível incluir essa variável na análise estatística devido ao número reduzido de lagartas sobreviventes. No entanto, estes tratamentos revelaram expressiva redução no peso dos insetos.

No ensaio em casa de vegetação, não houve diferença entre os tratamentos quanto à mortalidade de lagartas (Tabela 25). A formulação Azamax[®] reduziu significativamente o peso larval em relação aos controles em cerca de 60%.

O efeito inseticida dos tratamentos observados em laboratório não se manteve quando o ensaio foi realizado em casa de vegetação. Apesar disso, verifica-se que a mortalidade causada pelo extrato de sementes de *A. muricata* em relação à mortalidade obtida pelas formulações comerciais foi semelhante. A rápida degradação dos compostos ativos seria uma justificativa para o baixo efeito inseticida dos tratamentos em casa de vegetação. A instabilidade de produtos de origem botânica na presença de luz e outros fatores ambientais é uma característica negativa sob o ponto de vista econômico, já que sucessivas aplicações são necessárias no decorrer do ciclo da cultura. Novos ensaios em casa de vegetação (condições ambientais controladas) devem ser realizados, a fim de melhor esclarecer as diferenças de resultados encontradas nos dois ambientes.

Tabela 24. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas ao extrato de sementes de *A. muricata* e diferentes formulações comerciais em condições de laboratório. T.: 25 ± 2 °C; U. R.: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 h.

Tratamento	Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo de exposição (horas) ¹						Peso larval (mg) ²
		24	48	72	96	120	144	
<i>A. muricata</i>	1.817	88,39 \pm 2,52 a	91,96 \pm 2,63 a	91,96 \pm 2,63 a	91,96 \pm 2,63 a	91,96 \pm 2,63 a	91,96 \pm 2,63 a	0,4 (9)*
Anosom [®]	2.000	91,96 \pm 2,25 a	94,64 \pm 1,63 a	94,64 \pm 1,63 a	94,64 \pm 1,63 a	94,64 \pm 1,63 a	94,64 \pm 1,63 a	0,2 (6)*
Azamax [®]	30	93,75 \pm 3,05 a	94,64 \pm 2,87 a	94,64 \pm 2,87 a	94,64 \pm 2,87 a	94,64 \pm 2,87 a	94,64 \pm 2,87 a	0,18 (6)*
Controle ³	-	29,46 \pm 2,96 b	34,82 \pm 3,01 b	34,82 \pm 3,01 b	34,82 \pm 3,01 b	34,82 \pm 3,01 b	34,82 \pm 3,01 b	3,33 \pm 0,71 b
Controle ⁴	-	14,28 \pm 2,25 c	15,18 \pm 2,31 c	15,18 \pm 2,31 c	15,18 \pm 2,31 c	15,18 \pm 2,31 c	15,18 \pm 2,31 c	6,3 \pm 0,68 a
F		93,28	91,616	91,616	91,616	91,616	91,616	9,0948
P		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0108

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

²Médias seguidas de letras distintas, na coluna, indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, P < 0,05);

* Não incluído na análise devido ao reduzido número de lagartas sobreviventes (reduzido número de unidade amostral).

³Controle= Metanol + Tween 80

⁴Controle= Água deionizada

Tabela 25. Médias (\pm EP) de mortalidade e peso (mg) de lagartas de *T. absoluta* expostas ao extrato de sementes de *A. muricata* e diferentes formulações comerciais em condições de casa de vegetação em Botucatu, no período de dez/2013.

Tratamento	Mortalidade (%) ¹	E.C. ²	Peso larval	
			Total (mg) ³	Relativo ⁴
Extrato <i>A. muricata</i>	26,36 \pm 4,04	13,33	0,91 \pm 0,00015 ab	61,54
Anosom [®]	30,25 \pm 1,57	22,37	0,84 \pm 0,00013 ab	64,13
Azamax [®]	26,86 \pm 3,09	14,47	0,56 \pm 0,00019 a	42,39
Controle ⁵	21,62 \pm 2,70	--	1,49 \pm 0,00023 b	100,00
Controle ⁶	20,81 \pm 3,22	--	1,31 \pm 0,00021 b	100,00
F	1,6536 ^{ns}	--	4,0738	--
P	0,1868	--	0,0094	--

¹Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição quase-binomial, $P < 0,05$);

² E.C.: Eficácia de controle calculada pela fórmula de Abbott (1925);

³Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição Gaussiana seguido por teste *post hoc* de Tukey, $P < 0,05$);

⁴Calculado com base na comparação relativa do tratamento com o seu respectivo controle;

⁵Controle= Metanol + Tween 80;

⁶Controle= Água deionizada.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato etanólico de folhas de *P. amalago* var. *medium* ocasionou elevada toxicidade à lagartas de *T. absoluta* em baixas concentrações. Além disso, o efeito deletério do extrato sobre ovos da traça foi um resultado importante, assim como a inibição da oviposição do inseto.

P. amalago var. *medium* é uma planta de sub-bosque com ampla dispersão no território nacional, principalmente em florestas de matas secundárias (YUNCKER, 1974). Diversos trabalhos mostram a atividade biológica de *Piper amalago*; entretanto, este é o primeiro estudo a mostrar sua atividade inseticida. A eficiência dos extratos de *Piper* spp. como inseticida botânico tem sido correlacionada com a concentração de piperamidas (SCOTT et al., 2005). Essas amidas apresentam propriedades neurotóxicas, responsáveis pela morte imediata do inseto e demanda apenas um efeito residual curto. Observou-se que a mortalidade de lagartas de *T. absoluta* quando em contato com resíduos do extrato de *P. amalago* var. *medium* foi rápida e concentrada, principalmente no primeiro dia de avaliação. Assim, o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* poderia ser utilizado para o controle de *T. absoluta* em tomateiro, principalmente em períodos próximos à colheita com menores riscos de que os resíduos do produto permaneçam nos alimentos, uma vez que uma das limitações de uso de inseticidas botânicos à base de piperamidas é o tempo de meia vida curto.

Este estudo também demonstrou a eficiência e o potencial de uso de *Annona muricata* no controle de *T. absoluta* em tomateiro. As análises químicas dos extratos de *A. muricata* confirmaram a presença de acetogeninas de anonáceas. Os efeitos tóxicos dessas acetogeninas vêm sendo reportado para espécies de insetos-praga com diferentes hábitos alimentares (GUADAÑO et al., 2000; LEATEMIA; ISMAN, 2004a, 2004b; DHARMASENA et al., 2001; COLOM et al., 2007, 2008; BLESSING et al., 2010; DE CASSIA SEFRIN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013). Para insetos com hábito minador, como *T. absoluta*, os presentes resultados indicam que os extratos de *A. muricata* são capazes de penetrar no mesófilo foliar e atingir as lagartas, mostrando que as acetogeninas também atuam em profundidade. Além disso, observou-se elevada toxicidade aguda dos extratos sobre a fase larval do inseto em baixas concentrações. No teste de toxicidade comparada, o extrato de sementes de *A. muricata* causou elevada mortalidade larval, semelhante às obtidas com formulações comerciais à base de acetogeninas (Anosom[®]) e à base de limonóides (Azamax[®]). Os fracionamentos biomonitorados dos extratos de *A. muricata* permitiram caracterizar a classe de compostos mais ativos sobre *T. absoluta*. Como ocorrem com outras espécies do gênero, os extratos de *A. muricata* podem servir como modelo químico para as indústrias na síntese de produtos socialmente mais aceitáveis e que podem ser utilizados de forma integrada em programas de manejo de pragas (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000; ISMAN, 2006; RIBEIRO et al., 2013).

Os extratos de *A. muricata* também são promissores para o controle da traça-do-tomateiro em pequenas áreas de cultivo. Tradicionalmente, diferentes espécies de anonáceas têm sido utilizadas como inseticidas botânicos através de preparações caseiras, especialmente em pequenas propriedades rurais de países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (ISMAN, 2003; OKONKWO, 2005; CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2010). Para a extração das acetogeninas de anonáceas, a utilização de solventes com maior polaridade, como o etanol, beneficia a obtenção desses compostos em maiores concentrações (SOUSA et al., 2009). Além disso, o extrato de sementes de *A. muricata* apresenta bom rendimento de extração com solvente etanol, o que traz boas perspectivas de uso em condições de campo e semi-campo, em razão da maior facilidade de uso e segurança na obtenção e manipulação dos extratos (ONIMAWO, 2002).

Espécies do gênero *Annona* são caracterizadas pela elevada presença de óleo em suas sementes que são passíveis de serem extraídas com etanol (FONTANA et al., 1998; ONIMAWO, 2002; BRANCO et al., 2010). Esse elevado

rendimento dos extratos, aliado ao potencial inseticida dos mesmos, sugerem um uso potencial desses materiais, que são normalmente descartados pela indústria no processamento de frutas (EGYDIO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013).

Para a produção de inseticidas botânicos em escala comercial, é necessário que a biomassa atenda a demanda de matéria prima em quantidades suficientes durante o ano. A utilização de resíduos provenientes da indústria alimentícia é uma forma de produção sustentável de produção de biomassa. *A. muricata* conhecida popularmente como graviola, é produzida comercialmente no Brasil e seus frutos são ofertados ao longo de todo ano. Devido a sua alta perecibilidade, é considerada uma fruta típica da industrialização. Segundo Mclaughlin et al. (1997), a extração de suas sementes, geralmente considerados como produtos de resíduos na produção de polpa, poderia ser utilizada em preparações inseticidas potencialmente úteis. Sob o ponto de vista econômico, uma indústria que processa 500 toneladas de polpa consegue extrair 35 toneladas de sementes, o que representa matéria-prima a um custo inicial zero (GRZYBOWSKI et al., 2013).

Já existem no mercado internacional formulações comerciais à base de acetogeninas de anonáceas como ANOSOM[®] CE (10 g i.a/L de anonina). Um estudo realizado recentemente avaliou o número de novos ingredientes ativos (i.a) registrados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos Estados Unidos desde 1997 e verificou que do número total de pesticidas registrados, 20% são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (CANTRELL et al., 2012). Isso ressalta ainda mais a importância de pesquisas como esta na descoberta e desenvolvimento de novos produtos a serem disponibilizados para os programas de manejo integrado de pragas.

8 CONCLUSÕES

- Os extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* e o extrato de folhas de *P. amalago* var. *medium* apresentam elevada toxicidade sobre lagartas de *T. absoluta* nas concentrações de 0,1% e 0,5%, respectivamente;
- O extrato etanólico de folhas *P. amalago* var. *medium* apresenta efeito deterrente à oviposição de *T. absoluta*;
- Os extratos etanólicos de folhas e sementes de *A. muricata* apresentam efeito translaminar;
- As frações em diclorometano e em acetato de etila do extrato etanólico de folhas de *A. muricata* e a fração hidroalcoólica do extrato das sementes da mesma espécie apresentam maior toxicidade a lagartas de *T. absoluta*;
- A análise química das frações mais ativas dos extratos de *A. muricata* sobre *T. absoluta*, confirma a presença de acetogeninas.
- Em laboratório, o extrato de sementes de *A. muricata* apresenta toxicidade a lagartas de *T. absoluta* semelhante a de produtos comerciais à base de acetogeninas

[anonina (Anosom[®]) e limonóides [azadiractina + 3-tigloylazadirachtol (Azamax[®])].

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAB- Agência de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia. 2010. Disponível em: <<http://www.adab.ba.gov.br/modules/news/article.php?storyid=480>>. Acesso em: 21 mar. 2012.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford University Press, 2000.

ASSIS, A.; BRITO, V.; BITTENCOURT, M.; SILVA, L.; OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, R. Essential oils composition of four *Piper* species from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 203-209, 2013.

BAIER, A. H.; WEBSTER, B. D. Control of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) in *Phaseolus vulgaris* L. seed stored on small farms-1. Evaluation of damage. **Journal of Stored Products Research**, v. 28, p. 289-293, 1992.

BARRIENTOS, Z. R.; APABLAZA, H. J.; NORERO, S. A.; ESTAY, P. P. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 25, n. 3, p. 133-137, 1998.

BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.

BERNARD, C. B.; KRISHANMURTY, H. G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J. R.; SANCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; SAN ROM, L.; ARNASON, J. T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 6, p. 801-814, 1995.

- BLESSING, L. D. T.; COLOM, O. Á.; POPICH, S.; NESKE, A.; BARDÓN, A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 3, p. 307-310, 2010.
- BOFF, M. I. C.; ALMEIDA, A. A. Efeito residual de extratos de *Piper nigrum* (L.) sobre larvas neonatas de *Sitotroga cerealella* (Oliv.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 115-121, 1995.
- BOGORNI, P. C.; SILVA, R. A.; CARVALHO, G. S. Consumo de mesófilo foliar por *Tuta absoluta* (Meyrick, 1971) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 7-11, 2003.
- BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MACEDO, M. A. A.; TORRES, A. L.; ANGELINI, M. R. Late pest control in determinate tomato cultivars. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 6, p. 589-594, 2007.
- BRAGA SOBRINHO, R. Integrated production of Annonaceae in Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 102-107, 2014.
- BRAMBILA, J.; LEE, S.; PASSOA, S. *Tuta absoluta* The tomato leafminer. Field screening AID. Cooperative Agricultural Pest Survey Program (CAPS). 2010. Disponível em: <http://caps.ceris.purdue.edu/screening/tuta_absoluta>. Acesso em: 12 abr. 2012.
- BRANCO, P. C.; CASTILHO, P. C.; ROSA, M. F.; FERREIRA, J. Characterization of *Annona cherimola* mill. seed oil from Madeira island: a possible biodiesel feedstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 4, p. 429-436, 2010.
- BREUER, M.; HOSTE, B.; DE LOOF, A.; NAQVI, S. N. H. Effect of *Melia azedarach* extract on the activity of NADPH-cytochrome *c* reductase and cholinesterase in insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 3, p. 99-103, 2003.
- BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 455-460, 2001.
- BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D.; ORIANI, M. A. G. Efeito de genótipos de tomateiro e de extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* e de sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 784-791, 2010.
- CAMPOS, R. G. Control químico del „minador de hojas y tallos dela papa“ (*Scrobipalpus absoluta*) (Meyrick) en el valle Del Cañete. **Revista Peruana de Entomología**, v. 19, p. 102-106, 1976.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1231-1242, 2012.
- CAPONERO, A. Solanacee, rischio in serre. Resta alta l'attenzione alla tignola del pomodoro nelle colture protette. **Colture Protette**, v. 10, p. 96-97, 2009.
- CARRARA, V. S.; VIEIRA, S. C. H.; DE PAULA, R. G.; RODRIGUES, V.; MAGALHÃES, L. G.; CORTEZ, D. A. G.; DA SILVA FILHO, A. A. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems

of *Piper* species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, p. 1-6, 2013.

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.

CEAGESP- Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. 2012. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. (Eds). **Flowering plants of the Neotropics**. New York: Princeton University Press. 2004. p. 18-20.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H.; COUVREUR, T. L.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.

COELHO, M. C. F.; FRANÇA, F. H. Biologia e quemotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 129-135, 1987.

COLOM, O. Á.; NESKE, A.; POPICH, S.; BARDÓN, A. 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.

COLOM, O. Á.; BARRACHINA, I.; MINGOL, I. A.; MAS, M. C. G.; SANZ, P. M.; NESKE, A.; BARDON, A. Toxic effects of annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 81, n. 2, p. 85-89, 2008.

CUNHA, U. S. D.; VENDRAMIM, J. D.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C. Potencial de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) como fonte de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 667-673, 2005.

CUNHA, U. S. D.; VENDRAMIM, J. D.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C. Bioactivity of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) derived molecules on *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 709-715, 2008.

DEGLI ESPOSTI, M.; GHELLI, A.; RATTA, M.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). **Biochemical Journal**, v. 301, p. 161-167, 1994.

DESNEUX, N.; LUNA, M. G.; GUILLEMAUD, T.; URBANEJA, A. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. **Journal of Pest Science**, v. 84, n. 4, p. 403-408, 2011.

DESNEUX, N.; WAJNBERG, E.; WYCKHUYS, K. A. G.; BURGIO, G.; ARPAIA, S.; NARVÁEZ-VASQUEZ, C. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; RUESCAS, D. C.;

- TABONE, E.; FRANDON, J.; PIZZOL, J.; PONCET, C.; CABELLO, T.; URBANEJA, A. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 3, p. 197-215, 2010.
- DHARMASENA, C. M. D.; BLANEY, W. M.; SIMMONDS, M. S. J. Effect of storage on the efficacy of powdered leaves of *Annona squamosa* for the control of *Callosobruchus maculatus* on cowpeas (*Vigna unguiculata*). **Phytoparasitica**, v. 29, p. 191-196, 2001.
- DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 60-71, 2007.
- DYER, L. A.; DODSON, C. D.; STIREMAN III, J. O.; TOBLER, M. A.; SMILANICH, A. M.; FINCHER, R. M.; LETOURNEAU, D. K. Synergistic effects of three *Piper* amides on generalist and specialist herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 11, p. 2499-2514, 2003.
- DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. ***Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution***. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. 228p.
- EGYDIO, A. P. M.; DOS SANTOS, D. Y. A. C. Underutilized *Annona* species from the Brazilian Cerrado and Amazon rainforest: A study on fatty acids profile and yield of seed oils. **Economic Botany**, v. 65, n. 3, p. 329-333, 2011.
- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002. Cap. 7, p. 165-182.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. **Production crops**. 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em: 12 abr. 2013.
- FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. D. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.
- FERNÁNDEZ, S.; MONTAGNE, A. Biología del minador del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Boletín de Entomología Venezolana**, v. 5, n. 12, p. 89-99, 1990.
- FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1999. 624p.
- FERREIRA, F. T. R. **Bioatividade de nanoformulações de nim e extratos de outras Meliaceae e a sua interação com agentes de controle biológico visando ao controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)**. 177f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

FERREIRA, F. T. R.; VENDRAMIM, J. D.; FORIM, M. R. Bioatividade de nanoformulações de nim sobre a traça-do-tomateiro. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1347-1353, 2012.

FERREIRA, L. E.; CASTRO, P. M. N.; CHAGAS, A. C. S.; FRANÇA, S. C.; BELEBONI, R. O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 327-332, 2013.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: Ed. UFV, 2008. 421p.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1971. 31p.

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538-1543, 2008.

FONTANA, J. D.; PASSOS, M.; BARON, M.; NOSEDA, M.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E.; VILEGAS, J.; POMÍLIO, A. B.; VITALE, A.; WEBBER, A. C.; MAUL, A. A.; PERES, W. A.; FOERSTER, L. A. Selective polarity- and adsorption-guided extraction/purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. In: Finkelstein, M.; Davison, B. H. (Eds.). **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Colorado: Humana Press, 1998. p. 67-76.

FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. **Analytical Methods**, v. 2, p. 860-869, 2010.

FRANÇA, F. H. Por quanto tempo conseguiremos conviver com a traça-do-tomateiro? **Horticultura Brasileira**, v. 11, p. 176-178, 1993.

FRANÇA, F. H.; CASTELO BRANCO, M. Ocorrência de traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil Central. **Horticultura Brasileira**, v. 10, p. 6-10, 1992.

FRODIN, D. G. History and concepts of big plant genera, **Taxon**, v. 53, n. 3, p. 753-776, 2004.

GALLARDO, T.; ZAFRA-POLO, M. C.; TORMO, J. R.; GONZÁLEZ, M. C.; FRANCK, X.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Semisynthesis of antitumoral acetogenins: SAR of functionalized alkyl-chain bis-tetrahydrofuranic acetogenins, specific inhibitors of mitochondrial complex I. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 25, p. 4793-4800, 2000.

GARLET, T. M. B.; IRGANG, B. E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 4, p. 9-18, 2001.

GIUSTOLIN, T. A.; VENDRAMIM, J. D.; PARRA, J. R. P. Número de instares larvais de *Tuta absoluta* (Meyrick) em genótipos de tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 393-396, 2002.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.; VENDRAMIM, J. D. Modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 2, p. 215-220, 2004.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade do extrato aquoso de sementes de nim sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três formas de aplicação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 28-34, 2007.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; CAZÁRES, L. M. L.; GUZMÁN, M. A. S.; CHACÓN, I. D. C.; HERNÁNDEZ, G. L.; BRECEDA, S. F.; GERARDO, P. M. In vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. extracts against *Anastrepha ludens* larvae (Diptera, Tephritidae). **Interciência**, v. 37, n. 4, p. 284-289, 2012.

GRZYBOWSKI, A. **Fitolarvicidas para o controle do vetor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti***. 145f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GRZYBOWSKI, A.; TIBONI, M.; SILVA, M. A.; CHITOLINA, R. F.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 69, n. 5, p. 589-601, 2013.

GU, Z.-M.; ZHAO, G.-X.; OBERLIES, N. H.; ZENG, L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: potent mitochondrial inhibitors with diverse applications. *In*: ARNASON, J. T.; MATA, R.; ROMEO, J. T. (Eds.). **Recent advances in phytochemistry**. New York: Plenum Press, 1995, p. 249–310.

GUADAÑO, A.; GUTIÉRREZ, C.; DE LA PEÑA, E.; CORTES, D.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, p. 773-776, 2000.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L.C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

HADDI, K.; BERGER, M.; BIELZA, P.; CIFUENTES, D.; FIELD, L. M.; GORMAN, K.; RAPISARDA, C.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 7, p. 506-513, 2012.

HAJI, F. N. P. Aspectos biológicos da traça-do-tomateiro e seu controle. Petrolina: **Comunicado Técnico**, 13. 1984. 2p.

HAJI, F. N. P.; PARRA, J. R. P.; SILVA, J. P.; DE SORDI BATISTA, J. G. Biologia da traça do tomateiro sob condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 107-110, 1988.

HAMID, R. A.; FOONG, C. P.; AHMAD, Z.; HUSSAIN, M. K. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 630-641, 2012.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Overdispersion: models and estimation. **Comput Stat Data Anal**, v. 27, p. 151-170, 1998.

HUANG, R. C.; TADERA, K.; YAGI, F.; MINAMI, Y.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; NAKATANI, M. Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 581-583, 1996.

IMENES, S. D. L.; FERNANDES, M. A. U.; CAMPOS, T. B.; TAKEMATSU, A. P. Aspectos biológicos e comportamentais da traça-do-tomateiro *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 57, n. 1-2, p. 63-68, 1990.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 603-608, 2000.

ISMAN, M. B. Biopesticides based on phytochemicals. *In*: KOUL, O.; DHALIWAL, G. S. (Eds.). **Phytochemical biopesticides**. CRC Press, 2003. cap. 1, p. 1-12.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140-145, 2014.

JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; GONZALEZ, M. C.; ROBLEDO, S. M.; VELEZ, I. D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 183-186, 2000.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 3, p. 403-416, 2004.

KEMPRAJ, V.; BHAT, S. K. Acute and reproductive toxicity of *Annona squamosa* to *Aedes albopictus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 1, p. 82-86, 2011.

KÉÏTA, S. M.; VINCENT, C.; SCHMIT, J. P.; RAMASWAMY, S.; BÉLANGER, A. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 4, p. 355-364, 2000.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. **Biopesticide International**, v. 4, n. 1, p. 63-84, 2008.

LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 24, n. 2, p. 150-158, 2004a.

- LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. **Phytoparasitica**, v. 32, n. 1, p. 30-37, 2004b.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.
- LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J. F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alcaloïdes des Annonacées XXIX: Alcaloïdes de l'*Annona muricata* L. **Planta Medica**, v. 42, n. 05, p. 37-44, 1981.
- LIETTI, M. M.; BOTTO, E.; ALZOGARAY, R. A. Insecticide resistance in argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 113-119, 2005.
- LIMA, M. A. C. D.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; LIMA, J. R. G. The use of wax and 1-methylcyclopropene on refrigerated storage of soursop fruit (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 433-437, 2004.
- LIN, H.; KOGAN, M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the mexican bean beetle (Coleoptera; Coccinellidae): Comparisons of inducing factors. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 1852-1857, 1990.
- LLANOS, C. A. H.; ARANGO, D. L.; GIRALDO, M. C. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 34, n. 1, p. 76-82, 2008.
- LOPES, J. J.; MARX, C.; INGRASSIA, R.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P.; FERRAZ, A. D. B. F. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 1, p. 9-14, 2012.
- LOPEZ, E. Polilla del tomate: Problema crítico para la rentabilidad del cultivo de verano. **Empresa y Avance Agrícola**, v. 1, p. 6-7, 1991.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 640p.
- MAAS, P. J. M.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q. Annonaceae. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em< <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB110219>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.

MBATA, G. N.; OJI, O. A.; NWANA, I. E. Insecticidal action of preparation from the brown pepper, *Piper guineense* Schum, seeds to *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). **Discovery and Innovation**, v. 7, p. 139-142, 1995.

MCLAUGHLIN, J. L.; ZENG, L.; OBERLIES, N. H.; ALFONSO, D.; JOHNSON, H. A.; CUMMINGS, B. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: recent progress. In: HEDIN, P. A.; HOLLINGWORTH, R. M.; MASLER, E. P.; MIYAMOTO, J. THOMPSON, D. G. (Eds). **Phytochemicals for pest control**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium Series, 1997. p. 117 – 133.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MIHSFELDT, L. H.; PARRA, J. R. P. Biology of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) reared on artificial diet. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 769-776, 1999.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; YOSHIOKA, H.; NAKATANI, N. The Piperaceae amides I : Structure of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, p. 1609-1611, 1979.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; YOSHIOKA, H. Insecticidal joint action of pipericide and co-occurring compounds isolated from *Piper nigrum* L. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1701-1703, 1980.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (Eds.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 173–187.

MORAES, G. J.; NORMANHA FILHO, J. A. Surto de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no trópico semi-árido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 503-504, 1982.

MORGAN, E. D.; MANDAVA, N. B. **CRC handbook of natural pesticides, volume VI: insect attractants and repellents**. USA: CRC Press Inc., 1990. 264p.

MUSABYIMANA, T.; SAXENA, R. C.; KAIRU, E. W.; OGOL, C. P. K.; KHAN, Z. R. Effects of neem seed derivatives on behavioral and physiological responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 2, p. 449-454, 2001.

NAKATANI, M.; JAMES, J.; NAKANISHI, K. Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the Southern armyworm. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 5, p. 1228-1230, 1981.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.55, p. 621-626, 2000.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 135, p. 370-384, 1972.

NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

OEPP/EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Tuta absoluta*: Data sheets on quarantine pests. **Bulletin OEPP/EPPO**, v. 35, n. 3, p. 434-435, 2005.

OEPP/EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Pest and diseases**. 2009a. Disponível em: <http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2009/Rse-0809.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2012.

OEPP/EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Tuta absoluta* found on *Phaseolus vulgaris* in Sicilia. **EPPO Reporting Service**. 2009b, 16 pp.

OHSAWA, K.; KATO, S.; HONDA, H.; YAMAMOTO, I. Pesticidal active substances in tropical plants-insecticidal substance from the seeds of Annonaceae. **Journal of Agricultural Science**, v. 34, n. 4, p. 253-258, 1990.

OKONKWO, E. U. Plant materials used for controlling insect pests of stored products in Nigeria, families Annonaceae, Piperaceae, and Rutaceae. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 11, n. 1-2, p. 47-69, 2005.

ONIMAWO, I. A. Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of soursop (*Annona muricata*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 165-171, 2002.

PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; KHOSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 81-83, 1998.

PARA, 2010. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Relatório de atividades de 2011 e 2012**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 29/11/2013.

PARK, I. K.; LEE, S. G.; SHIN, S. C.; PARK, J. D.; AHN, Y. J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1866-1870, 2002.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; KUMAR, R.; WENGEL, S. K. S. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1069-1078, 1998.

PICANÇO, M.; LEITE, G. L. D.; GUEDES, R. N. C.; SILVA, E. A. Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. **Crop Protection**, v. 17, n. 5, p. 447-452, 1998.

QUIROZ, E. C. Nuevos antecedentes sobre la biología de la polilla del tomate, *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick). **Agricultura Técnica**, v. 36, n. 2, p. 82-86, 1976.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. 2012.

RAO, N. S.; SHARMA, K.; SHARMA, R. K. Anti-feedant and growth inhibitory effects of seed extracts of custard apple, *Annona squamosa* against Khapra Beetle, *Trogoderma granarium*. **Journal of Agriculture and Technology**, v. 1, p. 43-54, 2005.

RATNAYAKE, S.; RUPPRECHT, J. K.; POTTER, W. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Evaluation of the pawpaw tree, *Asimina triloba* (Annonaceae), as a commercial source of the pesticidal annonaceous acetogenins. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Eds.). **New crops**. New York: Wiley, 1993. p. 644-648.

PHILOGÈNE, B. J. R.; REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C. Botanicals: yesterday's and today's promises. In: **Biopesticides of plant origin**, p. 1-15, 2005.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.St. Hil. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, Serie B Botanik und Zoologie, Wien, v. 8B, p. 191-205, 2007.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B. J. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in Integrated Pest Management. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 1-2, p. 41-52, 2008.

RENWICK, J. A. A.; CHEW, F. S. Oviposition behavior in Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 39, n. 1, p. 377-400, 1994.

RIBEIRO, L. P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; ANDRADE, M. S.; FERNANDES, J. B.; MORAL, R. A.; DEMÉTRIO, C. G. B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55, p. 6-14, 2013.

RODITAKIS, E.; PAPACHRISTOS, D.; RODITAKIS, N. E. Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece. **EPPO Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 163-166, 2010.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, YU-HUA; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SACRAMENTO, C. D.; FARIA, J. C.; CRUZ, F. L. D.; BARRETO, W. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 329-331, 2003.

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

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA CPAC, 1998. 556p.

SANTOS, P. R. D. D.; MOREIRA, D. D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.

SÃO JOSE, A. R.; PIRES, M. M.; FREITAS, A. L. G. E.; RIBEIRO, D. P.; PEREZ, L. A. A. Actuality and perspectives of Annonaceous in the world. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 2014.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system: getting started with the SAS learning**. Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute. 2011.

SAXENA, R. C. Insecticides from Neem. *In*: ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; MORAND, P. (Ed.). **Insecticides of plant origin**. Washington: ACS, 1989. cap.9, p.110-129.

SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Journal of Insect Physiology**, v. 34, n. 7, p. 713-719, 1988.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 1, p. 271-297, 1990.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H.; NICOL, R.; LESAGE, L.; BRADBURY, R.; SANCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R. Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 4, p. 1390-1403, 2004.

SCOTT, I. M.; GAGNON, N.; LESAGE, L.; PHILOGÈNE, B. J. R.; ARNASON, J. T. Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 3, p. 845-855, 2005.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGÈNE, B. J.; ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 65-75, 2008.

SEFFRIN, R. C.; SHIKANO, I.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M. B. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, v. 29, n. 1, p. 20-24, 2010.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 58, p. 157-166, 1987.

SIGHAMONY, S.; ANEES, I.; CHANRAKALA, T.; OSMANI, Z. Efficacy of certain indigenous plant products as grain protectants against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.). **Journal of Stored Products Research**, v. 22, p. 21–23, 1986.

SILVA, G. A.; PICANÇO, M. C.; BACCI, L.; CRESPO, A. L. B.; ROSADO, J. F.; GUEDES, R. N. C. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 913-920, 2011.

SIMPSON, B. B.; OGORZALY, M. O. **Economic Botany: plants in our world**. 2. ed. New York: McGraw-Hill Inc., 1995. p 742.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; CATALAN, C.; DELAMPASONA, M. P. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 14, p. 1878-1884, 2004.

SIQUEIRA, H. A. A.; GUEDES, R. N. C.; PICANÇO, M. C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 2, n. 2, p. 147-153, 2000.

SIQUEIRA, H. A. A.; GUEDES, R. N. C.; FRAGOSO, D. D. B.; MAGALHAES, L. C. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, n. 4, p. 247-251, 2001.

SMITH, E. H.; SALKELD, E. H. The use and action of ovicides. **Annual Review of Entomology**, v. 11, n. 1, p. 331-368, 1966.

SOLÍS-FUENTES, J. A.; AMADOR-HERNÁNDEZ, C.; HERNÁNDEZ-MEDEL, M. R.; DURÁN-DE-BAZÚA, M. C. Physicochemical characterization and thermal behavior of guanabana (*Annona muricata*) seed “almond” oil. **Grasas y Aceites**, v. 61, n. 1, p. 58-66, 2010.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; CHASE, M. W. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 402-404, 1999.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle. Lavras: **Boletim Epamig**, 1992. 20p.

SOUZA G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-43, 2004.

SOUZA, R.; BENASSI, E.; SILVA, R. R.; AFONSO, S.; SCARMINIO, I. S. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 23-24, p. 4176-4185, 2009.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle piperine: A review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 735-748, 2007.

- TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; FREITAS, S. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Insecticide activity of piperine: Toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 21, p. 5301-5306, 2011.
- THACKER J. R. M. **An introduction to arthropod pest control**. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2002. 337p.
- THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 1, p. 13-17, 2000.
- TOMÉ, H. V. V.; MARTINS, J. C.; CORRÊA, A. S.; GALDINO, T. V. S.; PIKANÇO, M. C.; GUEDES, R. N. C. Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. **Crop Protection**, v. 46, p. 63-69, 2013.
- TORRES, J. B.; FARIA, C. A.; EVANGELISTA JR, W. S.; PRATISSOLI, D. Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. **International Journal of Pest Management**. v. 47, p. 173-178, 2001.
- TORRES, M. P.; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V.; PANDEY, P.; JOSHI, S.; MOORE, E. D.; BATRA, S. K. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer Letters**, v. 323, n. 1, p. 29-40, 2012.
- TRINDADE, R. C. P.; MARQUES, I. M. R.; XAVIER, H. S.; OLIVEIRA, J. D. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 407-413, 2000.
- TRIPATHI, A. K.; JAIN, D. C.; KUMAR, S. Secondary metabolites and their biological and medicinal activities of *Piper* species plants. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 18, p. 302-321, 1995.
- TROPEA GARZIA, G.; SISCARO, G.; COLOMBO, A.; CAMPO, G. *Tuta absoluta* recovered in Sicily. **L'Informatore Agrario**, v. 4, p. 71, 2009a.
- TROPEA GARZIA, G.; CASTAÑÉ, C.; PERDIKIS, D. *Physalis peruviana* L. (Solanaceae), a host plant of *Tuta absoluta* in Italy. **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 49, p. 231-232, 2009b.
- UCHOA FERNANDES, M. A.; VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Ritmo diário de atração sexual em *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, p. 63-73, 1995.
- UMPIÉRREZ, M. L.; LAGRECA, M. E.; CABRERA, R.; GRILLE, G.; ROSSINI, C. Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 339-350, 2012.
- URBANEJA, A.; VERCHER, R.; NAVARRO, V.; GARCÍA MARÍ, F.; PORCUNA, J. L. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. **Phytoma - España**, v. 194, p. 16-23, 2007.

USDA - United States Department of Agriculture. **Tomato leafminer (*Tuta absoluta*): New Pest Response Guidelines**. USA, 2011. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/emergency/downloads/Tuta-absoluta.pdf>. Acesso em: 20 Out. 2013.

VARGAS, H. C. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lepidoptero: Gelechiidae). **Idesia**, v. 1, p. 75-110, 1970.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Eds.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Palloti, 2000. cap. 8. p. 113-128.

VILA-NOVA, N. S.; DE MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; ALCANTARA, T. T. N.; FERREIRA, P. A. T.; CAVALCANTI, E. S. B.; WILSON, M. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 334-338, 2013.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M. S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales- *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.

XIE, Y. S.; ISMAN, M. B.; GUNNING, P.; MACKINNON, S.; ARNASON, J. T.; TAYLOR, D. R.; TOWERS, G. H. N. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 2, p. 129-136, 1994.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil: I. Piper-group I, II, III, IV. **Hoehnea**, v. 2, p. 21-366, 1972.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil: II. Piper-group V; Ottonia; Pothomorphe; Sarcorhachis. **Hoehnea**, v. 3, p. 29-284, 1973.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil: III. Peperomia; Taxa of uncertain status. **Hoehnea**, v. 4, n. 7, p. 1-236, 1974.