Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Avaliação do potencial inseticida de *Azadirachta indica* (Meliaceae) visando ao controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Márcio Alves Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Márcio Alves Silva
Engenheiro Agrônomo

Avaliação do potencial inseticida de *Azadirachta indica* (Meliaceae) visando ao controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ DJAIR VENDRAMIM**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Silva, Márcio Alves
Avaliação do potencial inseticida de *Azadirachta indica* (Meliaceae) visando ao controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) / Márcio Alves Silva. - - Piracicaba, 2010.
159 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Aleloquímicos 2. Insecta 3. Mosca-das-frutas 4. Resistência de plantas 5. Rutales
Título

CDD 632.774
S586a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais: José Mendes da Silva e Jacy Alves Natividades da Silva
A minha irmã: Márcia Alves Silva Soares Ao meu primo: Delmacio Antunes Alves

Por acreditarem em mim incondicionalmente.

Agradeço e ofereço.

A Gerane Celly Dias Bezerra Silva, pela compreensão, por me incentivar sempre, pelo amor e apoio inenarrável.

DEDICO

"Há homens que lutam um dia, e são bons;
Há outros que lutam um ano, e são melhores;
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;
Porém há os que lutam toda a vida
Estes são os imprescindíveis"
(Bertold Brecht)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e guiar meu caminho.

À Dra. Clarice Diniz Alvarenga Corsato, por acreditar no meu potencial e ampliar minha visão de ciência.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela oportunidade propiciada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Djair Vendramim, um exemplo de dedicação e profissionalismo, pela sua orientação, atenção, disponibilidade e paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Julio Marcos Melges Walder e à bióloga Maria de Lourdes Zamboni Costa, "Lia", ambos do Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP, pela atenção e presteza no fornecimento das moscas-das-frutas.

Ao Prof. Dr. Moacir Forim, do Departamento de Química da UFSCAR, pela colaboração na execução desse trabalho.

Ao empresário Roberto, da Empresa Baraúna Indústria e Comércio Ltda, pela atenção e doação das amêndoas e do óleo de nim.

À bióloga Solange Aparecida Vieira-Barros e Giuliano Pauli, pelo suporte técnico na liofilização dos extratos.

A Thiago Mastrangelo, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho, nas suas mais variadas interfaces, um grande amigo que eu ganhei em terras paulistas.

Aos companheiros da Biofábrica Moscamed Brasil.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas da ESALQ/USP: Ana Paula Korndorfer, Angelina Marcomini, Cristina Jensen, Eliane Grisoto, Elton Martins, Fátima Rampelotti, Leandro Ribeiro, Maria Auxiliadora Oriani (Cia), Mônica Santos, Paulo Bogorni, Rafael Pitta e Sheila Carvalho, pela amizade e experiências compartilhadas.

Ao meu companheiro de laboratório Marcos Lima e sua esposa Cynthia, pela amizade, paciência, auxílo e, sobretudo pela compreensão. Valeu Marcão!

Aos companheiros de república: Luzimário, Roque, Anderson, Vinicíus, Renata e "Julia", pelos momentos de alegria e distração.

Aos amigos: Cherre, Gleidyane, Amanda e Jaci, pelos grandes momentos. Na verdade, o mais importante é saber que posso contar com vocês sempre.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Zinsly, pela correção das referências e revisão do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia, pela amizade e auxílios prestados.

A todos os demais colegas do Departamento de Entomologia e Acarologia, pela convivência.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO..... 11
ABSTRACT..... 13
LISTA DE FIGURAS..... 15
LISTA DE TABELAS..... 17
1 INTRODUÇÃO..... 21
1.1 Revisão bibliográfica..... 23
1.1.1 Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)..... 23
1.1.1.1 Aspectos taxonômicos e biogeográficos..... 23
1.1.1.2 Aspectos bioecológicos de *Ceratitis capitata*..... 25
1.1.1.3 Aspectos bioecológicos de *Anastrepha fraterculus*..... 29
1.1.1.4 Importância econômica dos tefrítideos no contexto brasileiro..... 31
1.1.2 O nim (*Azadirachta indica*)..... 34
1.1.2.1 Caracterização da espécie..... 34
1.1.2.2 Aspectos químicos..... 36
1.1.2.3 Propriedade inseticida dos derivados do nim sobre insetos fitófagos..... 43
1.1.3 O nim no contexto do manejo integrado de moscas-das-frutas..... 46
Referências..... 52
2 EFEITO DE DERIVADOS DO NIM COMPONDO UMA ISCA E COMO REGULADOR DE CRESCIMENTO DE MOSCAS-DAS-FRUTAS..... 69
Resumo..... 69
Abstract..... 69
2.1 Introdução..... 70
2.2 Desenvolvimento..... 72
2.2.1 Material e Métodos..... 72
2.2.1.1 Criação de moscas-das-frutas em condições de laboratório..... 72
2.2.1.2 Obtenção e rendimento dos extratos aquosos e orgânicos de diferentes estruturas do nim..... 73
2.2.1.3 Determinação da azadiractina nos derivados do nim..... 74
2.2.1.4 Padronização de um atrativo alimentar para os bioensaios com adultos de moscas-das-frutas..... 75

2.2.1.5 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata*..... 77
2.2.1.6 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 77
2.2.1.7 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* 78
2.2.1.8 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 79
2.2.1.9 Análise estatística..... 79
2.2.2 Resultados e discussão..... 80
2.2.2.1 Rendimento dos extratos aquosos e orgânicos de diferentes estruturas do nim..... 80
2.2.2.2 Determinação da azadiractina nos derivados do nim..... 82
2.2.2.3 Padronização de um atrativo alimentar para os bioensaios com adultos de moscas-das-frutas..... 84
2.2.2.4 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* 85
2.2.2.5 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 89
2.2.2.6 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 98
2.2.2.7 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 101
2.3 Conclusões..... 109
Referências..... 110
3 EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE EXTRATOS DE NIM SOBRE A REPRODUÇÃO E A LONGEVIDADE DA MOSCAMED, *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)..... 117
Resumo..... 117
Abstract..... 117
3.1 Introdução..... 118

3.2 Desenvolvimento..... 119
3.2.1 Material e Métodos..... 119
3.2.1.1 Insetos..... 119
3.2.1.2 Extratos..... 120
3.2.1.3 Estimativa da $CL_{15,}$ CL_{30} e CL_{45} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Ceratitis capitata*..... 120
3.2.1.4 Efeitos de concentrações subletais de extratos de nim sobre adultos *Ceratitis capitata*..... 120
3.2.1.5 Análise estatística..... 122
3.2.2 Resultados e discussão..... 123
3.2.2.1 Estimativa da $CL_{15,}$ CL_{30} e CL_{45} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Ceratitis capitata*..... 123
3.2.2.2 Efeitos de concentrações subletais de extratos de nim sobre adultos de *Ceratitis capitata*..... 123
3.3 Conclusões..... 132
Referências..... 132
4 EFEITO DO NIM SOBRE O COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO DE *CERATITIS CAPITATA*: SUBSÍDIOS PARA O EMPREGO DA ESTRATÉGIA DE *PUSH-PULL* NO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL..... 137
Resumo..... 137
Abstract..... 137
4.1 Introdução..... 138
4.2 Desenvolvimento..... 140
4.2.1 Material e Métodos..... 140
4.2.1.1 Insetos..... 140
4.2.1.2 Extratos..... 140
4.2.1.3 Efeito sobre o comportamento de oviposição..... 141
4.2.1.3.1 Com chance de escolha..... 141
4.2.1.3.2 Sem chance de escolha..... 142
4.2.1.4 Análise estatística..... 143
4.2.2 Resultados e discussão..... 143

4.2.2.1 Efeito sobre o comportamento de oviposição com chance de escolha..... 143
4.2.2.2 Efeito sobre o comportamento de oviposição sem chance de escolha..... 152
4.3 Conclusões..... 155
Referências……..... 155

RESUMO

Avaliação do potencial inseticida de *Azadirachta indica* (Meliaceae) visando ao controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Avaliou-se a bioatividade de derivados do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) como componente de isca para adultos e como regulador de crescimento de *Ceratitis capitata* (Wied.) e *Anastrepha fraterculus* (Wied.), determinando-se, ainda, o efeito de concentrações subletais de extratos de nim e o efeito deterrente de oviposição do extrato metanólico de folhas sobre *C. capitata*. Utilizando o extrato aquoso de amêndoas de nim, estimou-se a CL_{50} para adultos e imaturos, cujos valores foram 7.522 e 1.368 ppm para os adultos e 13.028 e 9.390 ppm para os imaturos de *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente. Subsequentemente, o óleo de amêndoas, os extratos de folhas, de ramos e de amêndoas de nim em diferentes solventes (água, metanol, diclorometano e hexano) foram comparados com base nas CL_{50} obtidas para adultos e para imaturos. Posteriormente, foram estimadas concentrações subletais (CL_{15} = 39 ppm, CL_{30} = 225 ppm e CL_{45} = 888 ppm) do extrato aquoso de amêndoas para adultos de *C. capitata* e avaliou-se nessas concentrações o efeito do extrato aquoso de amêndoas, de folhas em metanol e de ramos em diclorometano sobre a reprodução e a longevidade dessa espécie. A deterrência de oviposição do extrato metanólico de folhas de nim em diferentes concentrações (10.000, 18.000, 32.000 e 56.000 ppm) para *C. capitata* foi avaliada tratando bagas de uva, que foram expostas às fêmeas com chance e sem chance de escolha. Verificou-se que os derivados do nim na concentração de até 7.522 e 1.368 ppm não afetaram os adultos de *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente. Já para a fase imatura, os extratos de amêndoas e de ramos em diclorometano na concentração de 13.028 ppm causaram mortalidade de *A. fraterculus* e na concentração de 9.390 ppm o extrato de amêndoas em metanol e em diclorometano causaram mortalidade de *C. capitata*. Houve redução da fecundidade total e da fertilidade no 8º dia quando os insetos foram alimentados com extrato de ramos em diclorometano a 888 ppm. A longevidade de machos e fêmeas e o período de pré-oviposição não foram afetados pelos tratamentos. O extrato de folhas em metanol provocou deterrência de oviposição para *C. capitata* em situação de chance de escolha, porém, em confinamento, o referido extrato não afetou o comportamento dessa espécie. A experiência recente de *C. capitata* não alterou a sua resposta em relação a bagas de uva tratadas. A atividade biológica dos derivados do nim em relação às moscas-das-frutas é discutida.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas, Nim, Aleloquímicos, Isca, Regulador de crescimento, Efeitos subletais, Deterrência de oviposição

ABSTRACT

Evaluation of the insecticidal potential of *Azadirachta indica* (Meliaceae) aiming the control of fruit flies (Diptera: Tephritidae)

The bioactivity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) as adult bait and as larval growth regulator for *Ceratitis capitata* (Wied.) and *Anastrepha fraterculus* (Wied.) was evaluated. Besides, the effect of sublethal concentrations of neem extracts and the oviposition deterrency of the methanolic extract from leaves on *C. capitata* was evaluated. The estimated LC_{50} of aqueous extract from seed kernels were 7,522 and 1,368 ppm for adults and 13,028 and 9,390 ppm for immatures of *A. fraterculus* and *C. capitata*, respectively. In addition, the oil from seed kernels and the extracts from leaves, branches and seed kernels in different solvents (water, methanol, dichloromethane and hexane) were compared based on the LC_{50} obtained for adults and immatures. After that, sublethal concentrations from aqueous extract from neem seed kernels for *C. capitata* adults were estimated (LC_{15} = 39 ppm, LC_{30} = 225 ppm and LC_{45} = 888 ppm) and the effects of such concentrations on the reproduction and logenvity of this species were also accessed. Oviposition deterrency of *C. capitata* to grapes treated with leaf methanolic extract at different concentrations (10,000; 18,000; 32,000 and 56,000 ppm) was evaluated in free-choice or no-choice test. It was verified that the neem extracts on the concentrations up to 7,522 and to 1,368 ppm did not affect the adults of *A. fraterculus* and *C. capitata*, respectively. On the other hand, the extract from seed kernels and branches in dichloromethane at 13,028 ppm provoked mortality in *A. fraterculus* larvae and the seed kernel extract in methanol and dichloromethane at 9,390 ppm provoked high mortality in *C. capitata* larvae. The total fecundity was reduced significantly and the fertility decreased on the 8th day when the insects were fed on branch extract in dichloromethane at 888 ppm. The longevity of males and females and the pre-oviposition period were not affected by treatments. The leaf extract in methanol provoked oviposition deterrency for *C. capitata* in free-choice test, but did not affect its behavior in no-choice test. The *C. capitata*'s early experience did not affect its answer to the grapes treated in free-choice and no-choice situations. The biological activity of the neem extracts to fruit flies is discussed.

Keywords: Fruit fly; Neem; Allelochemicals; Bait; Growth regulator; Sublethal effects; Oviposition deterrency

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química da azadiractina e substâncias correlacionadas..... 40

Figura 1.2 - Esquema do procedimento para obtenção de subprodutos de plantas inseticidas..... 42

Figura 2.1 - Sistema para avaliação dos atrativos (A); Limão 'Cravo' em tubete sobre suporte com areia esterilizada (B)..... 76

Figura 2.2 - Mortalidade (%) de adultos de moscas-das-frutas expostos ao extrato aquoso de amêndoas de nim + mel em diferentes concentrações em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h). Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 320 ppm do extrato (0,78 ppm de aza); 1.000 ppm do extrato (2,45 ppm de aza); 5.600 ppm do extrato (13,70 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (78,27 ppm de aza). [1] Resultado médio de dois experimentos..... 86

Figura 2.3 - Parcela experimental (A); Moscas-das-frutas com abdome azul após alimentação da isca com corante azul anis (B)..... 94

Figura 2.4 - Mortalidade de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* após a exposição da fase de larva-pupa a diferentes concentrações do extrato aquoso de amêndoas de *Azadirachta indica* em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h). Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 1.000 ppm do extrato (2,45 ppm de aza); 3.200 ppm do extrato (7,83 ppm de aza); 5.600 ppm do extrato (13,70 ppm de aza); 10.000 ppm do extrato (24,46 ppm de aza); 18.000 ppm do extrato (44,03 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (78,27 ppm de aza)..... 99

Figura 3.1 - Gaiola para exposição das moscas aos tratamentos. A) Detalhe da região anterior, evidenciando a tela de oviposição e a fonte de água (tratamentos); B) Vista lateral, monstrando a abertura para liberação dos insetos e a placa de Petri para coleta de ovos; C) Vista lateral, com o detalhe do suporte para fixação da gaiola..... 121

Figura 4.1 - Experimento de deterrência de oviposição. A) Moscamed ovipositando em baga de uva; B) Ensaio com chance de escolha; C) Ensaio sem chance de escolha..... 142

Figura 4.2 - Número médio de ovos por punctura de *Ceratitis capitata* (com e sem experiência recente) em bagas de uva, obtidos 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* em experimento com chance de escolha. Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14h. Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 10.000 ppm do extrato (0,0060 ppm de aza); 18.000 ppm do extrato (0,0108 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (0,0192 ppm de aza); 56.000 ppm do extrato (0,0336 ppm de aza) (Teste t : não significativo, na comparação entre tratamento e controle dentro de cada concentração)..... 149

Figura 4.3 - Porcentagem de puncturas de *Ceratitis capitata*, com e sem experiência recente, em bagas de uva nas faixas de 0 a 5, 6 a 10, 11 a 15 e acima de 15 ovos, 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* em experimento com chance de escolha em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h) (**indica diferença entre barras, Teste t, $P < 0,01$)..... 151

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Rendimento na obtenção de extratos aquosos de amêndoas, de folhas e de ramos de *Azadirachta indica*..... 81

Tabela 2.2 - Rendimento na obtenção de extratos em solvente hexano, em diclorometano e em metanol de amêndoas, de folhas e de ramos de *Azadirachta indica*..... 82

Tabela 2.3 - Teor de azadiractina em extratos orgânicos, aquosos e óleo de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*..... 83

Tabela 2.4 - Longevidade de adultos de *Ceratitis capitata* tratados com mel e Biofruit® em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14 h)..... 85

Tabela 2.5 - Estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim em relação a adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 87

Tabela 2.6 - Mortalidade (± EP) de adultos de *Anastrepha fraterculus* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)..... 90

Tabela 2.7 - Mortalidade (± EP) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14 h)..... 91

Tabela 2.8 - Mortalidade (± EP) em função do sexo de adultos de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14 h)..... 93

Tabela 2.9 - Mortalidade (± EP) por inanição de adultos de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)..... 95

Tabela 2.10 - Estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim em relação a fase de larva-pupa de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 100

Tabela 2.11 - Mortalidade e razão sexual (± EP) de imaturos de *Anastrepha fraterculus* expostos a derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)..... 104

Tabela 2.12 - Mortalidade e razão sexual (± EP) de imaturos de *Ceratitis capitata* expostos a derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)..... 105

Tabela 2.13 - Adultos normais emergidos (± EP) de imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* expostos a derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)..... 107

Tabela 3.1 - Estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim em relação a adultos de *Ceratitis capitata*..... 123

Tabela 3.2 - Longevidade média (± EP) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à água tratada com extratos de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*, em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14 h)..... 124

Tabela 3.3 - Médias (± EP) do período de pré-oviposição e fecundidade (ovos/fêmea) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à água tratada com extratos de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14 h)..... 127

Tabela 3.4 - Fertilidade média (± EP) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à água tratada com extratos de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*, em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14 h)..... 131

Tabela 4.1 - Porcentagem de ovos e de puncturas de *Ceratitis capitata* (com e sem experiência recente) em bagas de uva e índice de deterrência de oviposição (ID ± EP), obtidos 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* em experimento com chance de escolha em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase:14 h). 146

Tabela 4.2 - Número de ovos, de puncturas e de ovos por punctura (± EP) de *Ceratitis capitata* (com e sem experiência recente) em bagas de uva em experimento sem chance de escolha, obtidos 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase:14 h)..... 154

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com enorme potencial para o desenvolvimento de uma fruticultura sustentável, apresentando vocação e competitividade em nível mundial, em razão de sua dimensão territorial e condições naturais favoráveis. Embora o Brasil se constitua num grande produtor, perdendo apenas para China e Índia, sua participação nos negócios mundiais de frutas é pequena, ocupando apenas a 15ª posição no ranking dos maiores exportadores. Do total de frutas produzidas, 53 % são direcionadas para o processamento nas agroindústrias, das quais 29 % são vendidos para o mercado externo e 24 % para o mercado interno. Dos 47 % destinados ao consumo *in natura*, apenas 2 % são direcionados para exportação e o restante, 45 %, é direcionado para o mercado interno (CORRÊA et al., 2008).

Em geral, as áreas de fruticultura que se destinam à exportação de frutas *in natura* apresentam alto padrão de qualidade, apresentando controle fitossanitário eficiente, resultando em grande capacidade de competitividade internacional. A produção brasileira, entretanto, é concentrada em pólos regionais de desenvolvimento, caracterizados pela presença de produtores de pequeno, médio e grande porte, com pacote tecnológico variável e objetivos mercadológicos diversificados; afinal, o Brasil apresenta um mercado interno grande, pouco exigente e lucrativo. Nesse cenário, ocorre migração constante de insetos-praga, principalmente tefritídeos. Oriundos de áreas produtoras abandonadas ou de áreas com controle fitossanitário deficiente (a qual inclui áreas com produção direcionada para o processamento nas agroindústrias e áreas cuja produção é voltada para o mercado brasileiro de frutas *in natura*), para as áreas exportadoras, resultando em aumento de custo de produção e posterior desestímulo ao modelo exportador.

Um dos maiores entraves à produção e livre comercialização de frutas frescas no Brasil e no resto do mundo é a presença de moscas-das-frutas nas áreas comerciais (MALAVASI, 2000a). Os frutos destinados à comercialização no mercado interno ou para exportação são invariavelmente atacados por várias espécies de moscas-das-frutas (NASCIMENTO; CARVALHO, 2000), provocando grandes perdas econômicas, as quais também estão relacionadas com as restrições às exportações, às práticas quarentenárias exigidas e aos altos custos de controle ou erradicação (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992).

As moscas-das-frutas, *Ceratitis capitata* (Wied.) e *Anastrepha fraterculus* (Wied.), constituem-se no maior obstáculo para a produção e comercialização de frutas no país, sendo

consideradas as espécies mais prejudiciais, causando mais dano à agricultura do que qualquer outra.

No momento, o controle químico por meio de aplicações de iscas tóxicas e pulverizações em cobertura é o método mais amplamente usado (SUGAYAMA, 2000). A isca tóxica é usada em aspersão na planta por meio de brocha, trincha, pulverizador costal ou pistola de pulverização (CARVALHO, 1988). Embora seja efetivo, o controle químico acarreta problemas ambientais (desequilíbrio biológico), de saúde humana (problemas para o aplicador e resíduos nos frutos), sociais (opinião pública contrária) e econômicos (atualmente os importadores de frutas *in natura* exigem frutos com baixos níveis de agrotóxicos e sem moscas-das-frutas) (CARVALHO; NASCIMENTO, 2002),

Como medida alternativa ao método de controle tradicional de populações de tefritídeos-praga no Brasil, o qual depende basicamente do uso de iscas à base de inseticida mais atraente alimentar (MALAVASI et al., 1994), o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) poderia equacionar o problema de resíduos de inseticida e ao mesmo tempo reduzir a população de moscas-das-frutas a um nível aceitável (ALVARENGA; GIUSTOLIN; QUERINO, 2006). Vários são os estudos avaliando o efeito dos derivados do nim sobre insetos-praga (BUTTERWORTH; MORGAN, 1971; TANZUBIL; MCCAFERRY, 1990; CORREIA et al., 2009) e inclusive o efeito direto sobre moscas-das-frutas (STARK; VARGAS; THALMAN, 1990; DI ILIO et al., 1999).

Seus derivados apresentam atividade inseticida sobre mais de 500 espécies diferentes de insetos (SCHMUTTERER; SINGH, 2002). Do ponto de vista de sua utilização, algumas características específicas do nim o tornam bastante promissor para uso no controle de pragas: a planta não precisa ser destruída para se produzirem os extratos; possui uma multiplicidade de compostos, o que torna mais difícil aos insetos adquirirem resistência; a concentração dos compostos ativos é alta; os compostos são solúveis em água, são fáceis de extrair e com baixo custo; pela sua forma de ação os compostos são, de modo geral, mais tóxicos às pragas do que aos inimigos naturais; os produtos são praticamente inócuos ao ambiente e ao homem; são totalmente biodegradáveis, com baixa persistência no ambiente (MARTINEZ, 2002).

Alguns experimentos conduzidos para avaliação do efeito do nim sobre moscas-das-frutas têm utilizado formulações comerciais. Por outro lado, pouco foi realizado avaliando os extratos das diferentes estruturas vegetais do nim sobre moscas-das-frutas. Diante do exposto, com o

presente trabalho objetivou-se avaliar o potencial inseticida de *A. indica* (Meliaceae) em relação a *C. capitata* e *A. fraterculus* (Diptera: Tephritidae).

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

As moscas-das-frutas pertencem à ordem Diptera (que tem asas posteriores atrofiadas e transformadas em balancins), subordem Brachycera (com antenas curtas, normalmente com três segmentos), série Schizophora (com fissura ptilinal), seção Acalyptratae (sem caliptra), família Tephritidae (com nervura subcostal dobrada em ângulo) (ZUCCHI, 2000).

1.1.1.1 Aspectos taxonômicos e biogeográficos

A família Tephritidae apresenta grande diversidade taxonômica e distribui-se por todas as regiões temperadas e tropicais do mundo (THOMPSON, 1998). São reconhecidas 4.448 espécies e subespécies agrupadas em 484 gêneros, mas esse número deve ser muito maior, já que muitas permanecem sem descrição (NORRBOM, 2008a).

A maioria das espécies-praga da família Tephritidae pertencem aos gêneros *Anastrepha* Schiner, *Bactrocera* Macquart, *Ceratitis* Macleay, *Dacus* Fabricius e *Rhagoletis* Loew. Apenas algumas pragas são encontradas nos gêneros *Carpomya* Costa, *Euphranta* Loew, *Monacrostichus* Bezzi, *Neoceratitis* Hendel, *Toxotrypana* Gerstaecker e *Zonosemata* Benjamin (NORRBOM; CARROLL; FREIDBERG, 1998). Os gêneros representados por espécies economicamente importantes são classificados na subfamília Trypetinae, tribo Toxotrypanini (*Anastrepha* e *Toxotrypana*) e tribo Carpomyinae (*Rhagoletis*) e na subfamília Dacinae, tribo Ceratitidini (*Ceratitis*) e tribo Dacini (*Bactrocera* e *Dacus*) (NORRBOM, 2008a).

De acordo com Malavasi, Zucchi e Sugayama (2000), os gêneros economicamente importantes de Tephritidae estão distribuídos mundialmente da seguinte forma: *Anastrepha* na América Latina, sul do Texas e centro-sul da Flórida na América do Norte; *Bactrocera*, principalmente na Ásia tropical, Austrália e Ilhas do Pacífico, com distribuição secundária na Ásia temperada, África tropical, sul da Europa e América do Sul (Suriname, Guiana Francesa e

Brasil); *Ceratitis* em toda a África, sul da Europa (zona do Mediterrâneo), Oriente Médio, América, Austrália e Ilhas do Pacífico; *Dacus* na África tropical, subcontinente indiano, Ilhas do Oceano Índico, Oriente Médio e Austrália; *Rhagoletis* na América e Europa e *Toxotrypana* na América.

No Brasil, são registrados os gêneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Rhagoletis* e *Toxotrypana* (ZUCCHI, 2000). O gênero *Anastrepha* apresenta 99 espécies registradas no país, o que representa 47 % das 212 espécies descritas, sendo que, atualmente, o Brasil é o país com maior número de espécies conhecidas de *Anastrepha* (ZUCCHI, 2007). De acordo com a Fruit Flies Species Database (NORRBOM, 2008b), um terço das espécies de *Anastrepha* registradas para o Brasil ocorre exclusivamente nesse país.

Até recentemente, *Bactrocera* era considerado subgênero de *Dacus*, tendo sido elevado ao *status* de gênero por Drew (1989), cujo trabalho foi baseado, principalmente em caracteres larvais, passando a reunir as espécies mais importantes economicamente do antigo gênero *Dacus*. No Brasil, o gênero é representado por uma única espécie, *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock, restrita ao estado do Amapá, onde a fruticultura ainda é incipiente. Entretanto, a presença desta espécie em território brasileiro tem sido motivo de alarme para a fruticultura nacional, razão pela qual o Ministério da Agricultura vem desenvolvendo um programa de erradicação para a mesma.

O gênero *Ceratitis* é constituído por aproximadamente 65 espécies, que ocorrem principalmente na África tropical (ZUCCHI, 2001), sendo representado no Brasil por uma única espécie, *Ceratitis capitata* (Wied.), conhecida vulgarmente por mosca-do-mediterrâneo (moscamed). Sua primeira detecção data do início do século XX (IHERING, 1901) e, desde então, esta espécie se estabeleceu e se dispersou pelo território nacional, sendo registrada em 17 estados brasileiros (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000), ocorrendo desde o sul até a região norte, cujo limite é o estado do Pará.

O gênero *Rhagoletis* compreende 62 espécies (NORRBOM; CARROLL; FRIDBERG, 1998), das quais apenas quatro ocorrem no Brasil, *R. adusta* Foote, *R. blanchardi* Aczél, *R. ferruginea* Hendel e *R. macquarti* (Loew), e de modo geral não têm expressão econômica (ZUCCHI, 2000). Entretanto, na América do Norte e na Europa existem espécies desse gênero qualificadas como praga primária, atacando principalmente frutas da família Rosaceae. É

adaptada ao clima frio, com apenas uma ou duas gerações anuais e diapausa no inverno (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000).

No gênero *Toxotrypana* existem sete espécies descritas, sendo que apenas a mosca-do-mamão, *T. curvicauda* Gerstaecker, tem importância econômica (ZUCCHI; HERNANDEZ-ORTIZ, 1999; ZUCCHI, 2000; MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000). Na América do Sul, essa espécie ocorre na Colômbia e Venezuela, não ocorrendo no Brasil, embora, outras espécies desse gênero já tenham sido detectadas no país (ZUCCHI, 2000).

Do ponto de vista da entomologia econômica, duas espécies de moscas-das-frutas são apontadas como as mais prejudiciais, *Anastrepha fraterculu*s (Wied.) e *C. capitata*, sendo consideradas o maior obstáculo para a produção e a comercialização de frutas no país, causando mais dano à agricultura do que qualquer outra espécie de tefritídeo.

C. capitata, introduzida no país há aproximadamente 100 anos, é considerada a mais prejudicial, cosmopolita e invasora entre todos os tefrítideos em escala mundial (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000; ZUCCHI, 2000). O grau de importância dessa espécie refere-se à sua polifagia e à severidade com a qual ataca seus hospedeiros.

Já *A. fraterculus*, conhecida como mosca-sul-americana e considerada a espécie de maior importância econômica dentro do gênero, está distribuída entre os dois extremos latitudinais do gênero, ocupando ambientes bastante distintos. Em termos de taxonomia, comportamento e genética, é a espécie mais intrigante e que, portanto, apresenta os maiores problemas para serem esclarecidos (ZUCCHI et al., 1999).

1.1.1.2 Aspectos bioecológicos de *Ceratitis capitata*

A moscamed, *C. capitata*, a exemplo do que ocorre com os demais tefrítideos, completa seu desenvolvimento através de quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto, ou seja, são insetos de metamorfose completa (holometábolos) (MORGANTE, 1991; ALUJA, 1994; SALLES, 1995; SALLES, 2000).

O ciclo de vida ocorre nos hospedeiros, onde os adultos buscam proteção, alimento e local para a corte e a cópula. No fruto, as fêmeas depositam seus ovos e as larvas se desenvolvem alimentando-se da polpa, sendo que a larva, totalmente desenvolvida, sai do fruto e penetra no

solo para se transformar em pupa, de onde, posteriormente, os adultos emergem reiniciando um novo ciclo (MALAVASI; BARROS, 1988; MORGANTE, 1991; ALUJA, 1994).

A emergência geralmente ocorre nas primeiras horas do dia. Ao emergir, o adulto possui coloração predominante clara e translúcida; nos minutos seguintes, começa a distender as asas, adquirindo cores e tonalidades características (asa com transparência rosada e com listras amarelas, sombreadas), ocorrendo, a seguir, o enrijecimento do corpo. Após esse período, os adultos se tornam ávidos por alimento, sendo a fase adulta o único estádio com vida livre e com franca mobilidade (MORGANTE, 1991), se alimentando de grande variedade de substratos, desde porções exsudadas dos frutos hospedeiros até fezes de pássaros, matéria orgânica em decomposição, néctar, pólen, entre outros (CHRISTENSON; FOOTE, 1960).

A maturação ovariana e a carga de ovos são influenciadas pela alimentação, especialmente pela alimentação protéica (CRESONI-PEREIRA; ZUCOLOTO, 2009). Os machos apresentam menor requerimento protéico e seu amadurecimento sexual é mais precoce do que o das fêmeas, contudo, é sabido que machos alimentados com fonte protéica exercem maior atração sobre as fêmeas, copulando mais do que os machos que não se alimentaram (ZUCOLOTO, 2000).

Para atração das fêmeas, os machos da moscamed formam agregados denominados *leks* na folhagem, que pode ou não ser da planta hospedeira. Uma vez agregados, os machos apresentam comportamento elaborado, vibrando as asas, quando ocorre a emissão de sons, simultaneamente à liberação de feromônios. As fêmeas atraídas para esses agregados interagem com vários machos do *lek* antes de escolher seu parceiro (PROKOPY; HENDRICHS, 1979; SIVINSKI; BURK, 1989; HENDRICHS et al., 1991).

Após a cópula e estando na planta hospedeira, as fêmeas de moscas-das-frutas exibem uma seqüência de comportamentos que são interpretados em termos de “decisões”, que são tomadas à medida que elas acumulam informações sobre o hospedeiro potencial (PROKOPY; ROITBERG, 1989; FLETCHER; PROKOPY, 1991; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000; SUGAYAMA; MALAVASI, 2000).

O comportamento de oviposição foi estudado em varias espécies de moscas-das-frutas e para *C. capitata* ocorre em quatro etapas: chegada ao fruto, procura, punctura e arrasto (PROKOPY; ROITBERG, 1989; FLETCHER; PROKOPY, 1991). Na chegada ao fruto, a fêmea utiliza, à curta distância, estímulos visuais e avalia o fruto quanto ao seu tamanho, cor e formato (PROKOPY; ROITBERG, 1984). Durante a procura, a fêmea percorre toda a superfície do fruto,

tocando-o com a parte anterior da cabeça, o labelo e o sintergosternito 7 (bainha do ovipositor). Nessa etapa, ela analisa as características físicas (tamanho e formato) e químicas do fruto (PROKOPY; ROITBERG, 1989; FLETCHER; PROKOPY, 1991; YUVAL; HENDRICHS, 2000; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000). Para fazer a punctura, a fêmea insere o acúleo na polpa do fruto, mantendo a "bainha do ovipositor" em posição perpendicular à superfície (YUVAL; HENDRICHS, 2000; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000). A deposição de ovos não é obrigatória, e, em alguns casos, a fêmea retira o acúleo sem ovipositar, fazendo, portanto, apenas a punctura (BARROS, 1986). Finalmente, na fase de arrasto, a fêmea percorre novamente a superfície do fruto, mas com o acúleo protraído. Durante esta etapa, ela deposita um feromônio, o FMH (Feromônio de Marcação do Hospedeiro), cuja finalidade é sinalizar para as demais fêmeas da espécie que aquele fruto já foi infestado (PROKOPY; ZIEGLER; WONG, 1978).

A fêmea da moscamed é capaz de depositar de 300 a 1000 ovos durante o seu ciclo de vida (FLECHTER, 1989; YUVAL; HENDRICHS, 2000). Dependendo do fruto (forma, tamanho e propriedades da casca), a praga pode colocar de 1 a 10 ovos por oviposição (GALLO et al., 2002), tendo sido registrados, por exemplo, em média, 10,5 ovos por postura em pêssego; 5,76 em café e 5,27 em maçã (SOUZA et al., 1983). Foi observada a ocorrência de dois picos de oviposição ao longo do dia, sendo 20 % dessa atividade nas primeiras horas da manhã e 71 % no final da tarde (HENDRICHS; HENDRICHS, 1990).

O ovo é alongado e ligeiramente curvo (SELIVON; PERONDINI, 2000), tem 1 mm de comprimento e assemelha-se a uma pequena banana de coloração branca (GALLO et al., 2002). O período embrionário depende da temperatura, sendo que Messenger e Flitters (1958), pesquisando o efeito da temperatura no período de incubação e na viabilidade dos ovos, obtiveram um período embrionário de 56,5 h a 23,9ºC (com viabilidade de 95,2 %), 44,3 h a 26,7ºC (com viabilidade de 87,2 %), 36,8 h a 29,4º C (com viabilidade de 82,6 %) e 35 h a 30,8ºC (com viabilidade de 86 %); determinaram ainda o limite máximo para temperatura de 35,6ºC e um limiar mínimo de 11,7ºC.

Após a eclosão, a larva tipo vermiforme (ápoda e com cabeça não diferenciada) penetra no endocarpo ou polpa, fazendo galerias em direção ao centro (MORGANTE, 1991; ZUCCHI, 2001; GALLO et al., 2002). O desenvolvimento larval depende da quantidade e da qualidade nutricional do alimento e, apesar de sua relativa imobilidade, as larvas de moscamed são capazes de selecionar o alimento ou a porção mais adequada para o seu desenvolvimento (FERNANDES-

DA-SILVA; ZUCOLOTO, 1993). O período larval também pode ser influenciado pela temperatura, variando de 22,7 dias a 15ºC a 5,8 dias a 30ºC, com valores intermediários de 11,5 dias a 20ºC e 7,7 dias a 25ºC (MC BRIDE, 1935 apud PEDROSO, 1972).

O estágio larval é composto por três momentos temporalmente definidos por mudas (ecdises) (ALUJA, 1994). A larva completamente desenvolvida mede cerca de 8 mm de comprimento, é de coloração branco-amarelada, afilada na parte anterior, e truncada e arredondada na parte posterior (GALLO et al., 2002). No final do terceiro ínstar, que pode ou não coincidir com a queda do fruto, as larvas o abandonam apresentando comportamento "saltador" (mecanismo estudado por MAITLAND, 1992), motivado pela busca de um local adequado para pupar, sendo o único período da fase imatura em que o inseto é exposto à luz direta, pois as larvas apresentam fototropismo negativo.

As larvas penetram no solo (1 a 10 cm), dependendo do tipo de solo (arenoso ou argiloso) e da umidade. De acordo com Gallo et al. (2002), a pupa tem a forma de um pequeno barril, medindo cerca de 5 mm de comprimento e é de coloração marrom-escura. O estágio pupal inicia-se com a apólise larval-pupal e finaliza com a transformação da pupa criptocefálica (pupa em processo de histólise dos tecidos larvais e diferenciação dos tecidos corporais) em uma pupa fanerocefálica que é determinada pela evaginação da cabeça e dos discos imaginais dos apêndices torácicos, levando à formação do adulto (QUESADA-ALLUÉ, 1994).

Em *C. capitata*, observa-se atraso na pupação com diminuição da temperatura ambiente e/ou aumento da umidade relativa (QUESADA-ALLUÉ, 1994). Entre os fatores que influenciam o período pupal no solo, é possível elencar três como principais: textura do solo, umidade e temperatura. A influência da umidade e do tipo de solo foi constatada em vários estudos (MILWARD-DE-AZEVEDO; PARRA, 1989). Com relação à temperatura, trabalho pioneiro desenvolvido por Mc Bride (1935) apud Pedroso (1972), registrou duração pupal de 34,3 dias a 15ºC (temperatura ambiente); 17,7 dias a 20ºC; 11,9 dias a 25ºC e 9 dias a 30ºC.

Após esse período emergem os adultos, sendo que Weens Jr. (1981) observou que o ciclo de vida (estágio de ovo à fase adulta) dessa espécie varia entre 19 e 34 dias, enquanto outros autores como Gallo et al. (2002) afirmam que o ciclo evolutivo completo é de 31 dias.

Os machos e fêmeas de *C. capitata* medem de 4 a 5 mm de comprimento e de 10 a 12 mm de envergadura e apresentam coloração castanho-escura com manchas brancas simétricas na região dorsal do tórax (WEENS JR., 1981). As asas são transparentes, com algumas manchas

escuras na parte basal e algumas faixas amarelo-castanho na parte distal (ZUCCHI, 2000). O abdome é amarelado e apresenta duas faixas transversais mais claras e, tal como em espécies de *Anastrepha*, *C. capitata* apresenta dimorfismo sexual, sendo que o macho possui cerda orbital anterior proclinada e expandida no ápice, enquanto a fêmea tem os últimos segmentos do abdome (sintergosternito 7 e acúleo) adaptados para oviposição (ZUCCHI, 2001).

1.1.1.3 Aspectos bioecológicos de *Anastrepha fraterculus*

Em linhas gerais, o ciclo de vida da mosca-sul-americana *A. fraterculus* é semelhante ao descrito anteriormente para *C. capitata*. As fêmeas desta espécie após a emergência necessitam ingerir alimento, sobretudo protéico e, assim como foi descrito por Hendrichs et al. (1991) para a moscamed, o comportamento alimentar das moscas do gênero *Anastrepha* envolve quatro modalidades (ALUJA et al., 1993; 2000): (i) pastagem, que consiste no toque da probóscide várias vezes seguidas sobre a superfície do alimento, permitindo que a mosca experimente porções de nutrientes da superfície explorada; (ii) sucção, que consiste em estender a probóscide para absorver líquido de um fruto, de gota d'água ou de fezes frescas de pássaros; (iii) borbulhar, que é a formação de uma bolha líquida de tamanho variado na probóscide quando as moscas estão em repouso; e (iv) regurgitação, que é a deposição de uma série de gotas egurgitadas sobre a superfície da folha ou do fruto e a reingestão.

Em condições naturais, o comportamento de corte e cópula da mosca-sul-americana é similar à espécie anterior, iniciando-se nas primeiras horas do dia (entre 7:00 e 10:00h, com maior freqüência na primeira hora), quando a temperatura atinge 18ºC e a intensidade luminosa é de 800 lux (MALAVASI; PROKOPY; MORGANTE, 1982).

A fêmea leva de 4 a 7 dias para atingir a maturidade sexual (MORGANTE et al., 1983) e o período de pré-oviposição varia entre 7 e 30 dias (SALLES, 2000). A fêmea coloca em torno de 400 ovos durante o período reprodutivo (FLETCHER, 1989). A postura ocorre exclusivamente em frutas, geralmente com um ovo por ato de postura, podendo ser de até cinco unidades em cada fruto, o que aumenta o potencial de dano (NORA; HICKEL, 1997; SALLES, 1998). Em estudos conduzidos por Souza et al. (1983), foi constatada uma média de ovos de 1,16; 1,04 e 1,00 por oviposição em café, pêssego e maçã, respectivamente.

As larvas no interior dos frutos passam por três ínstares. O tamanho médio das larvas de primeiro ínstar é de 1,1 mm, aumentando para 3 a 5 mm durante o segundo ínstar, chegando, ao final do terceiro ínstar larval, a 8,6 mm quando criadas em papaia; nesse último estádio, o peso é de 181 mg (TAUFER, 1995).

Após o desenvolvimento da larva, normalmente o fruto se decompõe e cai ao solo, permitindo a saída da larva, havendo então a penetração desta no solo e a completa imobilização. Segundo Da Cruz et al. (2000), esse intervalo (saída do fruto até a completa imobilização) é de 5 a 8 h, podendo durar até mais de 24 h caso a larva não penetre no solo. Paralelamente, ocorre retração do tamanho corporal e, simultaneamente, células da epiderme começam a secretar uma nova camada de cutícula (DA CRUZ et al., 2000). O tamanho das pupas dessa espécie, quando oriundas de larvas criadas em mamão, varia de 5 a 6 mm de comprimento por 2 a 2,5 mm de largura (TAUFER, 1995).

Entre os fatores abióticos que podem afetar diretamente a biologia dessa espécie, a temperatura é um dos mais importantes em qualquer um dos estágios do ciclo de vida da mosca-sul-americana. A temperatura-base, os limites térmicos inferiores e superiores e a quantidade de horas em graus-dias (constante térmica) com a temperatura acima da temperatura básica para o desenvolvimento dos estágios e do ciclo de vida de *A. fraterculus* foram determinados por Martins (1986) e Machado, Salles e Loeck (1995). Segundo os autores, para *A. fraterculus* completar o ciclo de vida são necessárias mais de 430 h com temperaturas acima de 10,7ºC.

Em estudos realizados com temperatura constante entre 10 e 35ºC, houve registro de desenvolvimento na faixa de 15 a 30ºC, sendo que a 25ºC ocorre o mais rápido desenvolvimento de qualquer um dos estágios da praga (BAKER, 1945; MARTINS, 1986; SALLES, 1993). De acordo com dados compilados por Martins (1986) e Salles (1993), à temperatura de 25ºC o desenvolvimento dos principais eventos biológicos são: período de pré-oviposição de 15 a 35 dias (média de 22,7 dias); oviposição até no máximo 150 dias de vida adulta (média de 79,1 dias); número de ovos por dia de até 40 ovos (média de 25,2 ovos), podendo uma fêmea produzir, no total, até 979 ovos (média de 394,2). O período embrionário varia de 1 a 3 dias, com média de 2,7 dias.

A longevidade média dos adultos de *A. fraterculus* em condições de laboratório (25°C, 60-80 % UR, 16 h de luz) é de até 170 dias, sendo que as fêmeas vivem menos do que os machos (SALLES, 1995). Cardoso et al. (2002) observaram que *A. fraterculus*, quando submetida a

temperaturas alternadas de 6 e 20ºC, apresentou alta incidência de maturação ovariana até 90 dias de idade, atrasando o potencial reprodutivo, o que aumenta o período funcional e a expectativa de vida quando comparadas com indivíduos submetidos ao regime alternado de 13 e 20ºC e aos regimes constantes a 6ºC e a 25ºC. Desse modo, percebe-se que, na natureza, como as condições de temperatura não são constantes, o ciclo de vida de *A. fraterculus* pode ser diferente daquele obtido em laboratório.

1.1.1.4 Importância econômica dos tefrítideos no contexto brasileiro

As moscas-das-frutas da família Tephritidae estão entre as principais pragas do mundo. Numerosas espécies estão envolvidas em infestações de uma grande variedade de frutas e olerícolas de considerável valor econômico (WHITE; ÉLSON-HARRIS, 1992).

O *status* de praga das espécies de importância econômica pode variar de país para país, e em um mesmo país a importância de uma espécie pode variar segundo o hospedeiro, a região ou a época do ano (HERNANDEZ-ORTIZ; ALUJA, 1993). No Brasil, três gêneros da família Tephritidae apresentam espécies com expressão econômica (*Anastrepha*, *Bactrocera* e *Ceratitis*), cujo *status* de praga pode variar entre 9 e 12 espécies, de acordo com Zucchi (2000), sendo o primeiro representado por sete espécies: *A. grandis* (Macquart), *A. fraterculus*, *A. obliqua* (Macquart), *A. pseudoparallela* (Loew), *A. sororcula* Zucchi, *A. striata* Schiner e *A. zenildae* Zucchi. Entretanto, três espécies, *A. bistrigata* Bezzi, em goiaba no Sudeste; *A. distincta* Greene, em mimosáceas da Amazônia e *A. serpentina* (Wied.), em sapotáceas do nordeste, em razão dos frutos que atacam e da relativa abundância, poderão vir a ser de importância econômica (ZUCCHI, 2000). As outras duas espécies, *C. capitata* e *B. carambolae*, são exóticas, tendo sido ambas registradas no Brasil no século passado, em 1901 e em 1996, respectivamente (IHERING, 1901; MALAVASI, 2001).

As fêmeas danificam diretamente os frutos desde o momento em que introduzem o ovipositor na epiderme dos mesmos. A punctura em si, mesmo sem a introdução do ovo, já configura o dano, pois, ao perfurar a epiderme, provoca deformação e depreciação do fruto, podendo ficar com inúmeras pontuações escuras na epiderme devido à grande quantidade de puncturas, formando uma espécie de cortiça no local da punctura (SALLES; KOVALESKI, 1990; SALLES, 1995; CARVALHO, 2005). No orifício feito pelo ovipositor ocorre

apodrecimento, resultando em queda do fruto (GALLO et al., 2002) e facilitando também a entrada de microrganismos causadores de doenças como a podridão parda *Monilinia fructicola* (Wint.) em pêssego (NORA; HICKEL, 1997; SALLES, 1998).

As larvas consomem a polpa dos frutos. Não existe um padrão de deslocamento das larvas no interior do fruto, embora elas sejam mais frequentemente encontradas na parte central da polpa. Em geral, as larvas produzem apodrecimento interno da polpa, ficando a área atacada, decomposta, úmida e escurecida (SALLES, 1995). Quando as larvas saem dos frutos, se percebe facilmente o orifício de sua saída na casca, e ao pressionar-se o fruto, o extravasamento de suco por esse orifício indica que houve infestação (SALLES, 1995). As larvas podem destruir totalmente a polpa dos frutos, tornando-os imprestáveis para o consumo *in natura* ou para o processamento.

Segundo Alvarenga, Giustolin e Querino (2006), em algumas regiões do Brasil, dependendo das condições climáticas e da presença de plantas hospedeiras, as moscas-das-frutas podem comprometer até 100 % da produção. Segundo Hickel (2002), o exemplo clássico de alto custo de produção devido, principalmente, à incidência de moscas-das-frutas (*A. fraterculus*) é o que ocorre nos pomares de macieira no sul do Brasil, onde o gasto anual com inseticidas para controle dessa praga é estimado em dois milhões de dólares, ou o equivalente a 100 mil litros de fention (o inseticida mais empregado) para uma área aproximada de 20.000 ha, aplicando-se de 4 a 5 tratamentos por ano.

Diversos autores (CAREY; DOWEL, 1989; ALUJA, 1994; MALAVASI, 2001) mencionam os danos indiretos associados à presença de moscas-das-frutas nas áreas produtivas. A tolerância ao dano é muito baixa e, para produtos de exportação, essa tolerância é zero e, em muitos casos, por ser considerada praga quarentenária, a exportação é embargada pela simples presença da mosca na região de produção ou até mesmo no país exportador (WALDER, 2002).

Com a criação da Organização Mundial do Comércio (OMC) e do Codex Alimentarius, houve uma sensível redução das barreiras alfandegárias para exportação por barreiras não-tarifárias ao comércio, conhecidas como barreiras técnicas, que podem ser divididas em duas principais: as relacionadas às pragas e as relacionadas à inocuidade alimentar. Entre os insetos-praga, sobretudo da fruticultura, as moscas-das-frutas são o principal obstáculo à livre comercialização de frutas em escala mundial, tanto pelo risco de introdução da praga, como pela inocuidade do alimento.

No Brasil, as principais espécies frutíferas exportadas *in natura* (uva, melão, manga, maçã, banana, limão e mamão) representaram, em 2007, 89,71 % do valor arrecadado (US$ 576.690.115) e 85,76 % do volume exportado em kg (787.943.869) (SECEX/DATAFRUTA-IBRAF, apud CORRÊA et al., 2008).

O sucesso dessas sete espécies frutíferas invariavelmente está relacionado com o controle de moscas-das-frutas nas áreas de produção, o que vem enfatizar a importância econômica desse grupo de insetos, com maior evidência para *A. fraterculus* e *C. capitata*. Um breve histórico da evolução das estratégias de controle de moscas-das-frutas nessas frutíferas é necessário para demonstrar essa íntima relação comentada anteriormente.

Inicialmente, visando à abertura das exportações de frutas frescas para os mercados norte-americano e japonês, iniciou-se em 20 de junho de 1989, o monitoramento de moscas-das-frutas no Submédio do Vale do São Francisco (HAJI; MIRANDA, 2000). Com a proibição dos fumigantes químicos para tratamento quarentenário contra moscas-das-frutas, adotou-se, nessa região, o tratamento hidrotérmico (quarentenário) para a exportação de frutos de manga, de acordo com os trabalhos de Nascimento (1990; 1992) e Nascimento et al. (1992). Além disso, o Brasil possui autorização para exportar uva para os EUA desde que submetida a baixas temperaturas, o que causa desinfestação da moscas-das-frutas. O tratamento deve ser de 11 dias a 0ºC, 13 dias a 0,55ºC, 15 dias a 1,11ºC ou 17 dias a 1,66ºC (GOULD, 1994). Por conta da fruticultura, direcionada principalmente para exportação, Juazeiro (BA) e Petrolina (PE) (municípios do Submédio do Vale do São Francisco) apareceram pela primeira vez entre os dez municípios brasileiros com maiores valores de produção agrícola (R$ 519,5 e 430,9 milhões, respectivamente) em 2007, sendo que as exportações de manga e de uva dessa região representaram 93 e 99,1 % das exportações brasileiras dessas duas frutas, respectivamente (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2007; CORRÊA et al., 2008).

As exportações de melão, atualmente a principal fruta em termos de volume exportado (22,26 % do volume total de frutas exportadas *in natura* pelo país) (SECEX/DATAFRUTA-IBRAF apud CORRÊA et al., 2008), se deve ao estabelecimento de uma área livre da mosca-das-cucurbitáceas, *A. grandis*, na região de Mossoró e Assu (RN), região reconhecida como área livre desde 1990, após cinco anos de estudos exaustivos (ARAÚJO; LIMA; ZUCCHI, 2000).

A banana e o limão não são hospedeiros das moscas-das-frutas registradas no Brasil e esse fato tem justificado a ascensão das exportações dessas frutíferas em comparação às demais. O Brasil exporta atualmente apenas 5 % do limão e da banana que produz (CORRÊA et al., 2008), sendo que a última é a segunda fruta em produção no Brasil, com volume exportado de 185.720.644 kg, perdendo apenas para o melão.

O mamão brasileiro é uma das principais *commodities* de exportação em conseqüência das pesquisas inicialmente realizadas em Linhares e São Mateus no Espírito Santo, a partir de 1994, visando à aplicação do *Systems Approach* (MALAVASI, 2000b). O desenvolvimento desse sistema, após ser analisado pelo APHIS/USDA, possibilitou, a partir de 1998, a exportação de frutos de mamão produzidos no norte do Espírito Santo para os EUA (MARTINS; URAMOTO; MALAVASI, 2000). A exportação iniciou-se com o mamão Havaí (cultivares Golden e Sunrise) e posteriormente se expandiu para o grupo Formosa, cujos principais estados produtores são Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Norte.

Apesar do atrativo mercado interno, a maçã é o quarto fruto em termos de volume de exportação (112.075.637 kg) e de valor arrecadado (US$ 68.617.642). O tratamento quarentenário exigido pelos países importadores é o tratamento térmico com baixas temperaturas, permitindo a acessibilidade em diferentes mercados. Atualmente, os principais clientes são os mercados europeus, entretanto, existe uma intenção declarada de ampliar as exportações dessa fruta para os países do Oriente Médio.

Atualmente, as barreiras não-tarifárias no comércio internacional sob a bandeira da segurança do patrimônio fitossanitário, são uma das estratégias advindas do processo de globalização e nesse contexto, o controle das moscas-das-frutas tornou-se um passo primário na conquista por mercados.

1.1.2 O nim (*Azadirachta indica*)

1.1.2.1 Caracterização da espécie

O gênero *Azadirachta*, pertencente à ordem Rutales, subordem Rutinae, família Meliaceae, subfamília Melioideae, tribo Melieae (PENNINGTON; STYLES, 1975), contém apenas três espécies: *Azadirachta indica* A. Juss, *A. siamensis* Valeton e *A. excelsa* (Jack) Jacobs

(KANOKMEDHAKUL et al., 2005), sendo a primeira delas a mais estudada e difundida por todo o mundo.

Planta com várias denominações, *A. indica* é mais conhecida internacionalmente por *neem*, sendo que no Brasil o nome foi aportuguesado para nim (MARTINEZ, 2002). O centro de origem dessa planta é o sul e sudeste da Ásia, mas atualmente está estabelecida em áreas tropicais e subtropicais da África, América e Austrália. Nos últimos 20 anos, o nim foi introduzido em vários países principalmente para reflorestamento e produção de madeira em áreas secas, mas também é utilizado para outros propósitos, incluindo o uso para sombreamento e para produção de inseticidas naturais (SCHMUTTERER, 1990).

No Brasil, o nim foi introduzido em 1984 e, atualmente, se encontra em quase todas as regiões do País, pois este possui áreas com condições climáticas adequadas para o plantio, principalmente nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (MARTINEZ, 2002). A planta tem boa adaptação em locais com pH do solo de 5,0 a 7,0, precipitação anual de 400 a 800 mm e temperatura entre 21 e 32ºC, podendo tolerar secas severas, solos pobres e salinos. No entanto, não tolera temperaturas mínimas inferiores a 14ºC e geadas (SCHMUTTERER, 1990).

O nim é uma planta perene bastante resistente e de crescimento rápido, com tronco semi-reto a reto de 30 a 80 cm de diâmetro, relativamente curto e duro, de coloração marrom-avermelhada. O seu porte varia normalmente de 15 a 20 m de altura, mas caso haja condições edafoclimáticas favoráveis pode atingir até 25 m. Possui uma copa com folhagem verde-escura que pode atingir até 15 m de diâmetro e flores com odor de mel. O sistema radicular da planta é composto por uma raiz pivotante, que é a sua principal sustentação e que possibilita a retirada de água e nutrientes de profundidades consideráveis, e por raízes laterais auxiliares (HEDGE, 1993).

As folhas são compostas e imparipinadas, ficando aglomeradas nos extremos dos ramos, simples e sem estípulas. As flores são de coloração branca e reunidas em inflorescências densas com estames crescentes formando um tubo, actinomórficas, pentâmeras e hermafroditas (SCHMUTTERER, 1990).

De modo geral, a floração se inicia a partir do segundo ano de idade da planta e a produção de frutos começa a ser significativa após três anos, com 2,4 kg por árvore, podendo atingir cerca de 8 kg / planta no terceiro ano e superando 25 kg / planta a partir do quinto ano (GRUBER, 1992). As épocas de floração e de produção de frutos variam muito de região para região. Na Índia, as árvores de nim florescem de janeiro a abril e os frutos amadurecem de maio a

agosto (KOUL; ISMAN; KETKAR, 1990). No Brasil, dada a grande amplitude de condições climáticas, as floradas ocorrem em diversas épocas nas diferentes regiões. As primeiras floradas ocorrem na Região Central, Norte e Nordeste do Brasil com a produção de frutos iniciando-se em dezembro, indo até março; na Região Sudeste, a produção de frutos predomina de fevereiro a abril, e na Região Sul, inicia-se em maio e chega até julho, podendo haver uma segunda florada improdutiva em setembro/outubro (MARTINEZ; LIMA; BOIÇA JUNIOR, 1998).

A semente consiste em um pericarpo carnudo com uma concha moderadamente macia no seu interior, a qual armazena o óleo. O pericarpo contém uma massa resinosa e enrugada quando seca (KOUL; ISMAN; KETKAR, 1990). Os frutos possuem forma oval medindo de 1,4 a 2,4 cm de comprimento, e quando maduros, apresentam polpa doce amarelada e tegumento branco contendo um óleo marrom no interior de sua semente (SCHMUTTERER, 1990).

A importância do nim como planta inseticida foi revelada para o mundo ocidental pelo professor Dr. Heinrich Schmutterer (Universidade de Giessen, Alemanha) na década de 50 do século passado, ao constatar que durante as migrações destruidoras dos gafanhotos (*Schistocerca gregaria* (Forskal)) no Sudão, apenas as árvores de nim restavam intocadas (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000; ISMAN, 2006; VEITCH; BOYER; LEY, 2008). Posteriormente, foram intensificadas as pesquisas sobre a composição química da planta em diferentes centros de pesquisa no mundo.

1.1.2.2 Aspectos químicos

A ordem Rutales, à qual o nim pertence, inclui plantas que são uma das fontes mais ricas e diversas de metabólitos secundários em Angiospermas (WATERMAN, 1993). Dentro de um amplo universo de classes de compostos com características ou potencial inseticida encontrados em plantas dessa ordem, destacam-se os limonóides, substâncias amargas conhecidas como meliacinas ou tetranortriterpenóides. Em particular, os limonóides caracterizam os membros da família Meliaceae, onde são diversos e abundantes. Um número limitado de estruturas pode ainda ser encontrado em outras duas famílias do reino vegetal (Rutaceae e Cneoraceae) e em espécies do gênero *Harrisonia* (Família Simaroubaceae) (DA SILVA et al., 1984; CHAMPAGNE et al., 1992; ROY; SARAF, 2006).

Apesar de os limonóides apresentarem estruturas bastante diversas, a sua rota biossintética em plantas tem como precursor o tirucalol ou o eufol (CONNOLY, 1983; AKHILA; RANI, 1999). Num primeiro momento ocorre uma isomerização (migração) na dupla ligação desses compostos para o C-7 formando uma classe de triterpenos denominada protolimonóides (FORIM, 2006). Limocinona, meliantriol, odoratona, nimbocenona, nimolinona, limocinol e kulactona são protolimonóides isolados de diferentes estruturas de *A. indica* (SCHMUTTERER; ASCHER, 1987; LEY; DENHOLM; WOOD, 1993; KELECOM; CABRAL; GARCIA, 1996; AERTS; MORDUE (LUNTZ), 1997; AKHILA; RANI, 1999; LUO et al., 2000; SIDDIQUI et al., 2003). Posteriormente, os protolimonóides originam o grupo dos apo-protolimonóides, precursores mais diretos dos limonóides que apresentam a mesma insaturação ou uma posterior oxidação da ligação dupla como ocorre nos limonóides (FORIM, 2006). Em resumo, os limonóides são originados pela perda de quatro átomos de carbono do precursor inicial (CHAMPAGNE et al., 1992; VIEIRA; MAFEZOLI; BIAVATTI, 2007). Essa rota biossintética envolve vários passos reacionais levando às mais variadas estruturas, mas que invariavelmente contêm 26 átomos de carbono no seu esqueleto central (VIEIRA; MAFEZOLI; BIAVATTI, 2007).

A partir da formação do esqueleto básico de um limonóide pode ocorrer uma série de transformações levando aos diferentes grupos de limonóides (MENEZES, 2001). Champagne et al. (1992) propuseram uma correlação entre os vários tipos de esqueletos de limonóides com sua ação contra insetos e classificaram os limonóides em ordem decrescente de atividade biológica:

1. Limonóides com o anel C-*seco*. Ex: Azadiractina
2. Limonóides com esqueleto *apo*-eufol intacto; epóxido a C14/C15 e cicloexanona no anel A. Ex: Cedrelona.
3. Limonóides com anel D-*seco*. Ex: Gedunina
4. Limonóides com anéis A, D-*seco*. Ex: Limonina
5. Limonóides com anéis A, B ou B-*seco*. Ex: Toonacilina

Apenas plantas da família Meliaceae são especialistas na produção de limonóides com o anel C-seco (ROY; SARAF, 2006). O nim apresenta compostos nas cinco escalas propostas por Champagne et al. (1992). De diferentes partes da planta já foram isolados mais de 200 compostos, dos quais cerca de 130 são limonóides (KANOKMEDHAKUL et al., 2005). Entre os limonóides já isolados dessa árvore, a azadiractina é o mais investigado e considerado o tetranortriterpenóide com maior potencial para o manejo de pragas.

A azadiractina foi isolada das sementes de nim por Butterworth e Morgan (1968), período em que a comunidade científica estava revendo seus conceitos com relação ao controle de insetos, principalmente devido à publicação do livro “Silent Spring” de Raquel Carson em 1962. Oportunamente, vários esforços de pesquisa foram voltados ao estudo dos limonóides com ênfase para a azadiractina (MORGAN, 2009).

A sua estrutura molecular foi proposta primeiramente por Nakanishi (ZANNO et al., 1975), contudo na década de 80 foi demonstrado haver erros nessa proposta, e somente em 1987 estudos simultâneos e independentes realizados nos laboratórios de S. Ley, W. Kraus e Nakanishi elucidaram a estrutura da azadiractina (BILTON et al., 1987; KRAUS et al., 1987; TURNER et al., 1987). Uma revisão sobre esse assunto consta em Ley, Denholm e Wood (1993) em “The Chemistry of Azadirachtin” e em Veitch, Boyer e Ley (2008) em “The Azadirachtin Story”.

O mais abundante limonóide encontrado em sementes é usualmente o azadiradione, inicialmente isolado do óleo da semente (LAVIE; JAIN, 1967) e posteriormente sintetizado (COREY; HAHL, 1989). Entre os limonóides mais polares extraídos juntamente com azadiractina, a salanina (isolada do óleo da semente por HENDERSON et al., 1968) é o mais abundante, seguido pela própria azadiractina e em menor escala pelo 3-tigloylazadirachtol (JOHNSON; MORGAN; PEIRIS, 1996), nomeado como azadiractina B e identificado pelo grupo do Dr. Kraus (KLENK; BOKEL; KRAUS, 1986).

Nas sementes da árvore de nim existem moléculas com estrutura química muito semelhante à azadiractina, porém com atividade biológica variável (REMBOLD, 1989). Durante muitos anos convencionou-se nomear essas estruturas como isômeros da azadiractina (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, M, N). Contudo, a comunidade científica tem procurado salientar que é incorreta a adoção do termo isômeros da azadiractina, indicando que esses limonóides devem ser qualificados com o seu nome químico (Figura 1.1) (MORDUE (LUNTZ); MORGAN; NISBET, 2005).

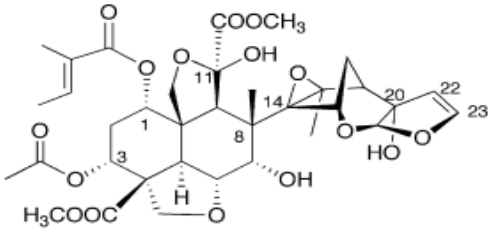
A azadiractina B (3-tigloylazadirachtol) muito provavelmente foi o composto isolado por Butterworth e Morgan (1971) com menor polaridade em relação à “A”, não sendo investigado pelos autores posteriormente. Na década seguinte, o grupo do Dr. Kubo isolou uma substância da semente e nomeou como deacetylazadirachtinol (KUBO et al., 1984; 1986), no entanto, essa molécula corresponde ao 3-tigloylazadirachtol (azadiractina B) elucidado no trabalho de Klenk, Bokel e Kraus (1986). Com relação à azadiractina C, Rembold (1989) descreveu a sua possível estrutura, no entanto, segundo Ley, Denholm e Wood (1993) e Morgan (2009) ela nunca foi

descrita totalmente, e esse nome “C” não é usual, sendo que os únicos trabalhos desenvolvidos com essa molécula foram publicados por Rembold (1989). O nome correto da azadiractina D é l-tigloyl-3-acetyl-l1α-hydroxy-4β-methylmeliacarpin, cujo isolamento e descrição foram feitos em 1993 (ROJATKAR; NAGASAMPAGI, 1993); outros trabalhos têm demonstrado o isolamento e ou a estrutura da molécula desse composto (GOVINDACHARI; SANDHYA; GANESH RAJ, 1991; RAMJI; VENKATAKRISHNAN; MADYASTHA, 1998).

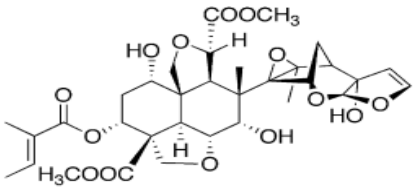
A azadiractina E corresponde ao detigloylazadiracntin, a “F” e a “G” são estruturalmente relacionadas com o 3-tigloylazadirachtol (LEY; DENHOLM; WOOD, 1993). O processo de isolamento e descrição das azadiractinas H, I, J e K foram conduzidos pelo grupo do Dr. Govindachari na Índia (GOVINDACHARI; SANDHYA; GANESH RAJ, 1991; GOVINDACHARI; SANDHYA; GANESH RAJ, 1992; GOVINDACHARI et al., 1996; MALATHI et al., 2003). As azadiractinas M (29-oxymethylene-11-demethoxycarbonyl-11R-hydroxyazadirachtin) e N (22,23-dihydro-23R-hydroxy-3-tigloyl-11-deoxyazadirachtinin) foram isoladas e descritas estruturalmente por Luo et al. (1999).

Em *A. excelsa* também foi registrada a presença de azadiractina (ERMEL; KALINOWSKI; SCHMUTTERER, 1991) e uma molécula relacionada foi nomeada como “marrangin” ou azadiractina L (KALINOWSKI; ERMEL; SCHMUTTERER, 1993). Mais recentemente, três compostos relacionados à azadiractina foram registrados nessa espécie, sendo qualificadas como azadiractina O (1-isovaleroyl-3-acetylazadirachtol), P (1-isovaleroyl-11R-hydroxyazadirachtin H) e Q (1,3-diacetylazadirachtol) (KANOKMEDHAKUL et al., 2005).

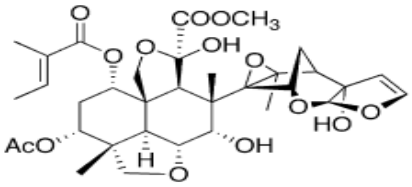
As azadiractinas A e B são os principais metabólitos presentes nas sementes do nim e são consideradas as mais importantes para a comercialização de subprodutos da planta como inseticida. Klenk, Bokel e Kraus (1986) e Rembold (1990) relataram que, nas sementes de nim, a porcentagem de azadiractina B, em relação à azadiractina A, é de 1 a 5 %, valor bem maior em comparação às outras azadiractinas (Figura 1.1) que variam de 0,1 a 0,01 % em relação à azadiractina A. O registro de azadiractina em outras partes da planta de nim não é um fato comum. Sundaram (1996) analisou amostras de sementes, cascas, folhas, raízes e ramos oriundos de árvores do sul da Índia. Baseado no peso seco da amostra o autor registrou o seguinte resultado: sementes (0,03 %); folhas ($0,9 \times 10^{-3}$ %); cascas ($0,5 \times 10^{-3}$ %); raízes ($0,3 \times 10^{-3}$ %) e ramos ($0,2 \times 10^{-3}$ %).



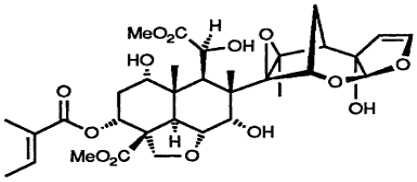
Azadiractina



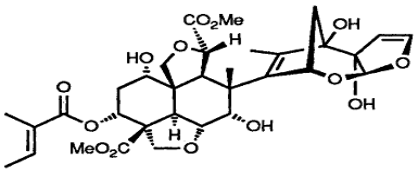
3-tigloylazadirachtol
(Azadiractina B)



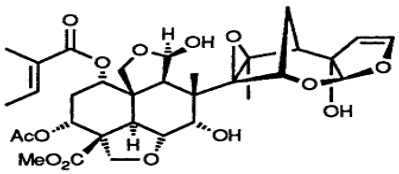
l-Tigloyl-3-acetyl-11α-hydroxy-4β-methylmeliacarpin
(Azadiractina D)



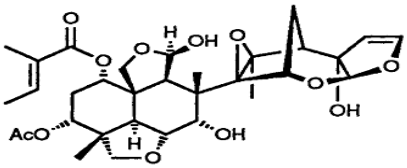
(Azadiractina F)



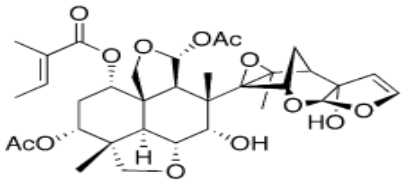
(Azadiractina G)



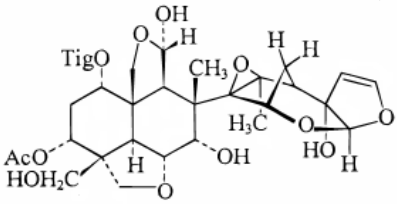
11-Demethoxicarbonylazadirachtin
(Azadiractina H)



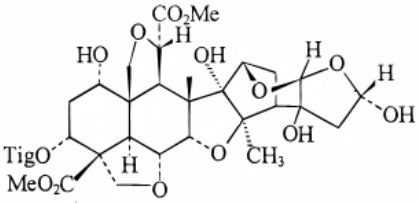
(Azadiractina I)



11-Acetyl-11-demethoxicarbonylazadirachtin
(Azadiractina L)



29-oxymethylene-11-demethoxycarbonyl-11R-hydroxyazadirachtin
(Azadiractina M)



22,23-dihydro-23R-hydroxy-3-tigloyl-11-deoxyazadirachtinin
(Azadiractina N)

Figura 1.1 - Estrutura química da azadiractina e substâncias correlacionadas

Por outro lado, Forim (2006) investigou diversas estruturas da planta (amêndoa em diferentes estágios de maturação, casca, ramo, flor e folha) e registrou a presença de azadiractina em diferentes quantidades, exceto nas folhas. Os resultados apontados por Sundaram (1996) indicam que as folhas possuem uma quantidade bastante inferior de azadiractina, sendo que o resultado obtido por Forim (2006) pode ter sido influenciado pelo método de extração. O próprio autor alerta que se a azadiractina estiver presente na folha, certamente será em quantidades ínfimas. A determinação da azadiractina nas diversas partes da planta e, sobretudo na folha, é um desafio e, de acordo com Morgan (2009), o aperfeiçoamento da quantificação de azadiractina nas folhas é um dos principais focos de pesquisa dos fitoquímicos atualmente.

A molécula da azadiractina é muito complexa (VEITCH; BOYER; LEY, 2008). Após 22 anos de esforços do grupo do Dr. Ley, a síntese completa da azadiractina foi realizada em 71 etapas, com o rendimento de 0,00015 % (VEITCH et al., 2007). Todo o processo de síntese ao longo dos 22 anos foi registrado em recente revisão do Dr. Ley e seus 45 colaboradores, "The Synthesis of Azadirachtin: A Potent Insect Antifeedant" (LEY et al., 2008). Esse trabalho de síntese é o início para o desenvolvimento de produtos comerciais à base de azadiractina. Atualmente, todos os produtos existentes no mercado são preparados a partir de compostos extraídos da planta.

Os derivados do nim podem ser empregados na forma de pós, extratos aquosos, extratos orgânicos e óleos (fixos ou essenciais) (Figura 1.2). Os óleos podem ser obtidos a partir da prensagem do material vegetal (geralmente frutos ou sementes), os quais podem ser frescos ou secos (geralmente ao sol). Após a prensagem, o óleo é extraído e armazenado em recipientes apropriados. Estes são os chamados óleos "fixos". Os óleos essenciais ou voláteis podem ser obtidos de diferentes maneiras, sendo que uma das formas mais utilizadas é o arraste com vapor d'água (SANTOS et al., 2004; TAVARES, 2006).

Para obtenção dos pós, após a coleta do material vegetal (sementes, frutos, folhas, caules e ou raízes), este é submetido à secagem e moído na granulometria desejada. No caso dos extratos aquosos, após a coleta, secagem e moagem, os pós são submetidos à imersão em água (configurando o período de extração) e posterior filtração. O extrato aquoso deve ser utilizado até 24 h após a extração ou submetido à liofilização e posterior armazenamento. Existem diferentes formas para obtenção de extratos orgânicos provenientes de plantas. O fato comum entre os procedimentos é a utilização de solventes em polaridade crescente: hexano (apolar), acetato de

etila (polaridade intermediária) e metanol (polar). Dessa forma, os extratos vegetais obtidos apresentaram diferença na sua constituição, pois solventes polares dissolvem os seus semelhantes (substâncias polares), apolares dissolvem apolares e, assim, sucessivamente (Figura 1.2).

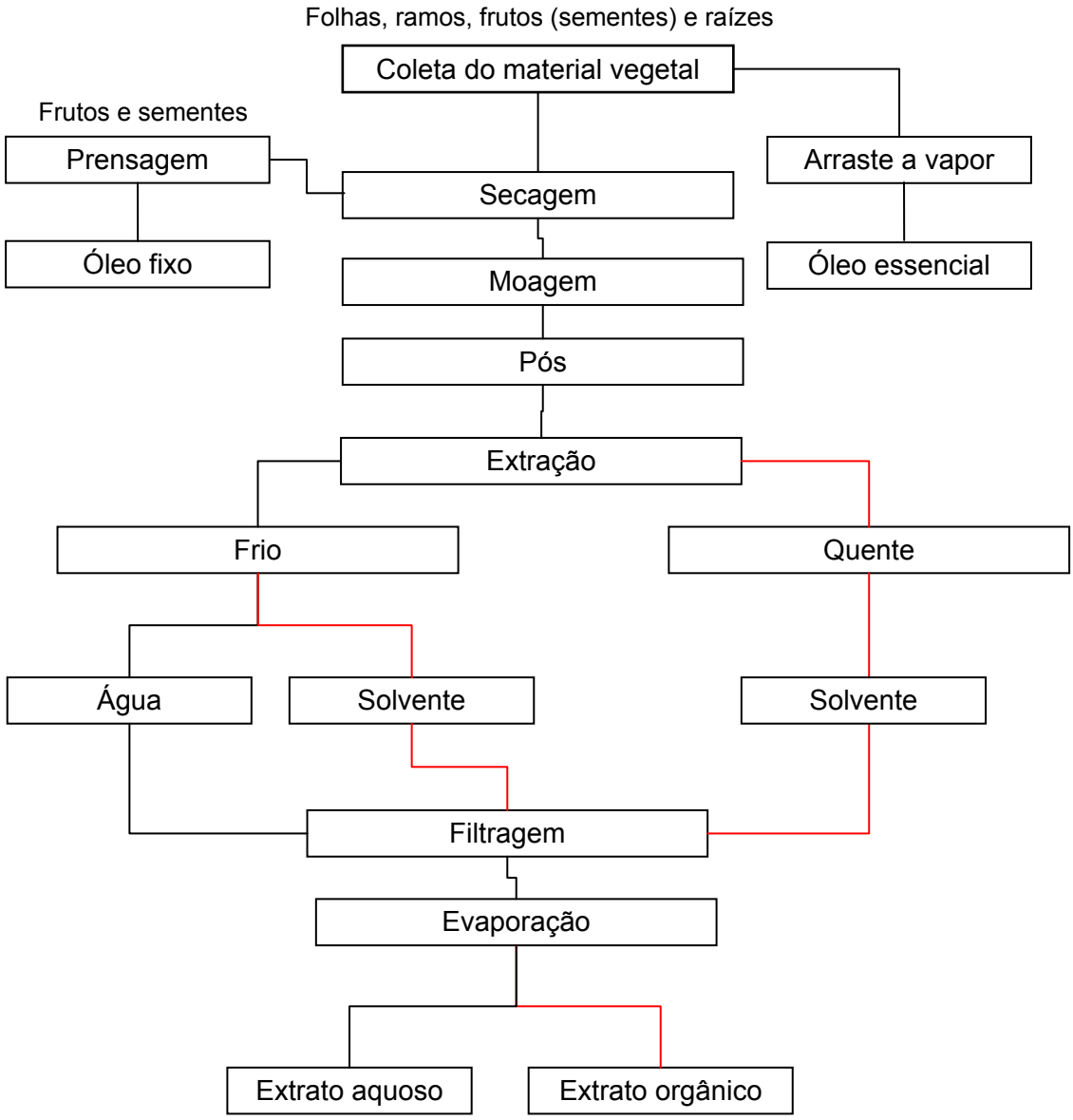


Figura 1.2 - Esquema do procedimento para obtenção de subprodutos de plantas inseticidas

A azadiractina, principal substância com atividade sobre insetos, é altamente polar, sendo, consequentemente, solúvel em solventes orgânicos polares (etanol, metanol) e ligeiramente solúvel em água (MORGAN, 2009). Outras substâncias com polaridade próxima à da

azadiractina geralmente são extraídas em conjunto, como, por exemplo, a salanina e o 3-tigloylazadirachtol, assim como outros compostos correlacionados (MORGAN, 2009).

1.1.2.3 Propriedade inseticida dos derivados do nim sobre insetos fitófagos

Os derivados do nim possuem vários modos de ação sobre insetos, entre os quais é interessante destacar a sua atuação como repelente, deterrente alimentar (KOUL, 2005), deterrente de oviposição (NAUMANN; ISMAN, 1995), regulador de crescimento e esterilizante. Diversos outros efeitos também podem ser observados, tanto em nível fisiológico, hormonal e celular, como em nível comportamental (SCHUMUTTERER, 1990; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; MARTINEZ, 2002).

No processo de seleção hospedeira por insetos fitófagos, os repelentes são os fatores que determinam resposta negativa do inseto, levando-o a se afastar da planta e, embora nessa etapa inicial do processo, em muitos casos, a cor do substrato vegetal seja importante, há outras situações em que essa seleção é mediada principalmente por substâncias químicas de natureza volátil (VENDRAMIM; GUZZO, 2009). Em estudos com a cigarrinha *Nilapavarta lugens* (Stal) foi demonstrado que a aplicação de óleo de nim a 3 % em plantas de arroz reduziu o número de cigarrinhas voando em direção às plantas pulverizadas, sendo que nesse caso específico não houve sequer contato dos insetos com a planta tratada (HEYDE; SAXENA; SCHMUTTERER, 1984). Para detectar os odores, os insetos contam com um sistema olfativo formado por células receptoras presentes em sensilos localizados principalmente nas antenas (SMITH, 2005). Existe grande diversidade no número e no arranjo desses sensilos nas antenas de várias espécies de insetos, o que permite cada um responder especificamente a uma dada quantidade e qualidade de odores em mistura (VENDRAMIM; GUZZO, 2009). Essa variabilidade parece existir até mesmo entre sexos da mesma espécie, pois em estudo realizado por Mikami e Ventura (2008), enquanto os machos de *Microtheca punctigera* (Achard) foram fortemente repelidos por discos foliares de rabanete tratados com óleo de nim, as fêmeas não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento controle.

A maioria dos aleloquímicos que inibem a alimentação estimula um receptor gustatório deterrente (inibição primária); há outros que bloqueiam ou interferem na percepção dos estimulantes de alimentação (inibição primária) e outros ainda que, atuando em nível de impulsos

elétricos no sistema nervoso, podem impedir o inseto de adquirir informação gustativa adequada para poder selecionar seu alimento (inibição secundária) (ISMAN, 2002). A azadiractina afeta a alimentação inicialmente por meio da quimiorrecepção (inibição primaria), mas também por meio da redução do alimento ingerido devido ao efeito tóxico (inibição secundária) (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993). Considerando a inibição primária, parece que a azadiractina, além de estimular um receptor deterrente em diversas espécies de insetos, parece também suprimir os receptores de açúcar e de inositol em várias outras espécies (SCHOONHOVEN, 1988, apud KOUL, 2005).

Os lepidópteros são bastante sensíveis à azadiractina, dependendo da espécie, apresentando efetiva inibição de alimentação, em concentrações que variam de <1 a 50 ppm (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). Isman (1993) estudou seis espécies de noctuídeos e encontrou variação de mais de 30 vezes entre a espécie mais sensível (*Spodoptera litura* (F.)) e a menos sensível (*Actebia fennica* (Tauscher)). Coleoptera e Hemiptera são menos sensíveis à referida molécula, com inibição da alimentação em concentrações variando de 100 a 600 ppm, embora existam algumas espécies de afídeos que também mostram alta sensibilidade (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). A ordem Orthoptera mostra enorme variação na sensibilidade à azadiractina incluindo desde *Schistocerca gregaria* (espécie polífaga que tem quimiorreceptores especializados a vários compostos secundários de plantas), *Locusta migratoria* L. (espécie que se alimenta de gramíneas e não tem quimiorreceptores especializados à deterrência alimentar), até *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) que é extremamente insensível, não apresentando quimiorrecepteros sensíveis à azadiractina (SCHUMUTTERER, 1985).

Quando ocorre deterrência de oviposição, a planta é rejeitada pela praga, como também pode haver somente a punctura no substrato ou mesmo menor número de ovos por postura. Esse fenômeno ocorre devido ao comportamento exploratório realizado pelo inseto ao pousar sobre o sítio de oviposição, que se dá pelo contato superficial das antenas, tarsos, aparelho bucal e ou ovipositor, antes da aceitação ou rejeição do hospedeiro (BENTO; NARDI, 2009). Em Lepidoptera, a seleção do substrato para oviposição é feita por meio de estímulos sensitivos, sendo os tarsos e a probóscis os principais órgãos quimiorreceptores (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993). Demonstrando o efeito deterrente de oviposição em *Plutella xylostella* (L.), Torres et al. (2006) deduziram que o menor número de ovos colocados nas superfícies das folhas tratadas com o extrato de nim tinha sido ocasionado pela irritabilidade das fêmeas em

contato com a superfície da folha no momento da oviposição. A deterrência de oviposição tem sido reportada por vários produtos do nim sobre quatro ordens de insetos: Coleoptera (SHOWLER; GREENBERG; ARNASON, 2004), Diptera (SINGH; SINGH, 1998), Hemiptera (COUDRIET; PRABHAKER; MEYERDIRK, 1985) e Lepidoptera (AYYANGAR; RAO, 1989).

Em nível fisiológico, a azadiractina causa interferência no sistema neurossecretor do cérebro, afetando a síntese do hormônio protoracicotrópico e ou dos neuropeptídeos (alatostatinas e alatotropinas), que controlam respectivamente a função das glândulas protorácicas e dos *corpora allata*. Na ausência da estimulação do hormônio protoracicotrópico, as glândulas protorácicas não produzem o hormônio da muda (ecdisteróides), que por sua vez tem a função de controlar a ecdise e a formação da nova cutícula, enquanto que a produção elevada de hormônio juvenil pelos *corpora allata*, dada pela inibição das alatostatinas ou indução das alatotropinas, induz a manutenção dos indivíduos no estágio larval (MORDUE; NISBET, 2000). Um mecanismo similar de ação leva à esterilização de fêmeas adultas (SCHUMUTTERER, 1990; MORDUE; NISBET, 2000; MARTINEZ, 2002). Esse fato foi observado para *Manduca sexta* (L.) (SCHLÜTER; BIDMON; GREWE, 1985), *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (DORN; RADEMACHER; SEHN, 1986), *Galleria mellonella* (L.) (MALCZEWSKA; GELMAN; CYMBOROWSKI, 1988) e *Tenebrio molitor* (L.) (MARCO et al., 1990), onde os autores relataram que a azadiractina causou diminiuição da quantidade de ecdisteróides.

Rembold (1989) registrou o efeito regulador de crescimento da azadiractina e outras substâncias relacionadas sobre larvas de *Epilachna varivestis* Mulsant. As azadiractinas (A-G, ver nome químico na Figura 1) apresentaram as seguintes CL_{50} em ppm: A (1,66), B (1,30), C (12,97), D (1,57), E (2,80), F (1,15) e G (7,69), enquanto para salanina a CL_{50} obtida foi maior que 100 ppm.

Mais recentemente o efeito dos derivados do nim sobre o comportamento de insetos tem sido alvo de estudos. Em trabalho pioneiro realizado por Saxena, Zhang e Boncondin (1993), foi demonstrado que a azadiractina alterou o comportamento de corte e acasalamento da cigarrinha *N. lugens*, observando que alguns insetos não conseguiram emitir o som de chamamento e outros emitiram sons irreconhecíveis.

1.1.3 O nim no contexto do manejo integrado de moscas-das-frutas

O manejo integrado de tefritídeos no Brasil avançou significativamente na última década e no momento as tecnologias utilizadas consistem no seguinte: a) monitoramento populacional de adultos utilizando armadilhas tipo Jackson com feromônio sexual trimedlure específicas para a moscamed e ou armadilhas tipo Mcphail com atrativo alimentar (proteína hidrolizada de milho, suco de frutas, entre outros) (NASCIMENTO; CARVALHO; MALAVASI, 2000); b) uso do método cultural que consiste na coleta e destruição dos frutos maduros na árvore e no solo antes e depois da colheita, poda e ensacamento de frutos, práticas utilizadas exclusivamente ou em conjunto (NASCIMENTO; CARVALHO, 2000); c) adoção do controle biológico por meio da produção massal e liberação inundativa do parasitóide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), ainda que, atualmente, seja apenas uma perspectiva (CARVALHO; NASCIMENTO, 2002); d) emprego da macho-esterilidade, sendo que atualmente são liberados machos estéreis de *C. capitata* em áreas de produção de manga e uva, existindo perspectiva de produção de machos estéreis de *A. fraterculus*; e) Controle químico, que é o método mais utilizado e, muitas vezes, o único em áreas de produção, podendo ser realizado em cobertura total da planta permitindo o controle da fase larval no fruto devido ao efeito de profundidade; o mais comum é a utilização da isca tóxica (atrativo alimentar acrescido de inseticida). Recentemente foi lançado o Success®, inseticida cujo princípio ativo é o espinosade (derivado da fermentação do actinomiceto *Sacharopolyspora spinosa*); no Brasil, o produto foi recentemente registrado para citros e manga, podendo ser utilizado na agricultura orgânica com período de carência de apenas um dia em cultivos de manga. Além disso, há também a opção de cultivar espécies de frutíferas resistentes às moscas-das-frutas (ex: mamão) ou mesmo optar pelo plantio de variedades resistentes (ex: maçã), contudo, esta prática não é comum entre os fruticultores. Para finalizar, existe a opção de se fazer o plantio em áreas livres ou de baixa prevalência da praga, como ocorre no Rio Grande do Norte (área livre de *A. grandis*) (MALAVASI, 2000a) e em áreas de exportação, após a colheita, pode ser realizado algum tratamento quarentenário, como o tratamento hidrotérmico para exportação de manga (DUARTE; MALAVASI, 2000). Na floresta Amazônica (estado do Amapá), adotou-se a técnica de aniquilação de machos para erradicação da mosca-da-carambola.

Pesquisas recentes têm estudado a utilização de derivados do nim para controle de moscas-das-frutas, tendo como premissa básica a substituição e ou redução das aplicações de inseticidas no campo. Diferentemente dos produtos sintéticos, os derivados do nim apresentam maior

diversidade na sua forma de utilização, podendo ser útil ao produtor e também integrar as alternativas de controle.

No cenário brasileiro, a maçã e a uva, duas frutas que apresentam alto valor agregado, são produzidas em regiões geográficas diferentes (região Sul e Nordeste, respectivamente) e o que possuem em comum é que não existem populações de moscas residentes nos pomares dessas frutíferas, devido à baixa adequação delas como hospedeiras. Contudo, anualmente as maçãs são infestadas por *A. fraterculus* e as uvas por *C. capitata*. O aumento populacional da primeira ocorre em áreas de mata e em fundos de quintal na região produtora de maçã (KOVALESKI; SUGAYAMA; MALAVASI, 2000). Já no Submédio São Francisco, *C. capitata* utiliza hospedeiros primários, tais como goiaba, acerola e manga, cultivados no perímetro de irrigação próximo de áreas com uva. Após amadurecerem sexualmente, os adultos se dispersam para os pomares e as fêmeas ovipositam nas frutas (maçã e uva), o que explica a concentração do dano e das capturas em armadilhas nas bordaduras dos pomares.

Nesse momento, seria ideal a utilização de substâncias dissuasoras de oviposição ou mesmo repelentes principalmente nas bordas do pomar. Alguns estudos com nim têm demonstrado a deterrência de oviposição ou repelência para tefritídeos, o que seria útil para essas culturas (maçã e uva), principalmente por não existir populações residentes nos pomares.

Chen et al. (1996) avaliaram o efeito deterrente de oviposição de extratos da amêndoa de nim sobre *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (espécie com hábito generalista, como a moscamed e a mosca-sul-americana) em pulverização sobre frutos de goiaba em condições de laboratório, em testes com e sem chance de escolha. No teste sem chance, os autores reportaram que o extrato a 4 % causou redução de 99,5 % na oviposição, enquanto que no experimento com chance de escolha houve redução superior a 96 % nos tratamentos com concentração igual ou superior a 1,0 %. Na verdade, a deterrência pode ter sido um erro de interpretação, pois os autores, avaliando o número de fêmeas pousadas nos frutos, constataram elevado grau de repelência aos insetos.

De forma similar, Singh e Singh (1998) também apontaram deterrência para oviposição quando extratos aquosos e orgânicos da amêndoa de nim foram pulverizados sobre frutos de goiaba e abóbora e expostos a *B. dorsalis* e *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), respectivamente. Por outro lado, Prokopy e Powers (1995), trabalhando com *Rhagoletis pomonella* (Walsh), tefritídeo-praga da macieira nos Estados Unidos, não constataram deterrência para oviposição

quando frutos de um hospedeiro nativo (*Crataegus mollis* (Torr. e A.Gray) Scheele) foram tratados com um produto à base de nim (Margosan-O®) em condições de laboratório.

Valencia-Botín, Bautista-Martinez e López-Buenfil (2004), estudando o efeito do nim sobre a oviposição de *Anastrepha ludens* Loew, expuseram aos insetos frutos de laranja tratados com extratos aquosos de sementes (3 e 5 %) e com um produto comercial à base de nim (Neemix 5 %), além da testemunha e, após oito dias, avaliaram o número de larvas por tratamento. Verificaram que nos frutos tratados com extrato a 5 % e com o Neemix não houve registro de larvas; no extrato com menor concentração (3 %) registraram-se, em média, três larvas por fruto e na testemunha, 26 larvas por fruto. Os autores justificaram a ausência ou menor número de larvas como sendo devido à repelência; no entanto, como não foi avaliado o número de fêmeas pousadas nos frutos, essa redução pode ter sido resultante da deterrência para oviposição ou mesmo do efeito de profundidade dos tratamentos, causando mortalidade de ovos e ou de larvas.

A possibilidade de utilização de extratos vegetais à base de nim diretamente sobre o fruto é uma grande vantagem em relação aos inseticidas comerciais, cuja restrição devido ao período de carência inviabiliza a utilização no campo, sendo que no Brasil a pulverização de inseticidas com essa finalidade ocorre apenas em cultivos de maçã. Estudos realizados por VanRanden e Roitberg (1998) verificaram que o nim, quando adicionado à dieta de larvas de primeiro e segundo ínstares de *Rhagoletis indifferens* Curran, reduziu significativamente a viabilidade larval em concentrações baixas (0,05 % de inseticida à base de nim). Dessa forma, são necessárias investigações com o objetivo de verificar se os derivados do nim possuem efeito de profundidade nos frutos, já que o efeito sistêmico (GILL; LEWIS, 1971) e translaminar (SOUZA; VENDRAMIM, 2005) já foram demonstrados.

As tecnologias de manejo disponíveis atualmente geralmente são direcionadas para a fase adulta do inseto e pouca atenção tem sido dada à fase de pupa, estádio em que o inseto fica imobilizado no solo e, consequentemente, bastante vulnerável a medidas de controle. Em outros países, como nos Estados Unidos, no México e na Argentina, existem registros de produtos químicos para tratamento de solo abaixo da copa das árvores, cuja finalidade é o controle de moscas-das-frutas.

De forma pioneira, Stark, Vargas e Thalman (1990) avaliaram os efeitos da azadiractina na metamorfose, longevidade e reprodução de *C. capitata*, *B. dorsalis* e *B. cucurbitae*, observando que, ao se exporem larvas de terceiro ínstar das moscas à azadiractina, na dosagem de 14 ppm,

foi inibida a emergência dos adultos de *C. capitata* e *B. dorsalis*, constatando-se o mesmo resultado para *B. cucurbitae* com 10 ppm. A exposição desses mesmos estágios do inseto a 4,66 ppm de azadiractina permitiu a emergência de adultos; entretanto, após 10 dias, 75 % dos adultos de *B. dorsalis* e 64 % de *C. capitata* haviam morrido. Em *B. cucurbitae*, exposta a 2,77 ppm, 24 % das moscas haviam morrido aos dez dias após a emergência. Frequentemente, tratamentos de solo com o inseticida diazinon são usados sob árvores frutíferas na Califórnia como componentes da erradicação quando introduções incipientes de moscas-das-frutas são detectadas (STARK; VARGAS; THALMAN, 1990; STARK; VARGAS, 2009). Os autores hipotetizaram a utilização de produtos à base de nim no programa de erradicação de moscas-das-frutas na Califórnia, buscando menor efeito deletério ao ambiente.

A fruticultura brasileira é difundida em pólos regionais de desenvolvimento, sendo que na região Nordeste do país os pólos são caracterizados por grande diversidade de espécies frutíferas produzindo durante todo o ano em função da irrigação. Assim, de forma diferente da estratégia anteriormente referida (repelência e ou deterrência de oviposição), pode-se propor a aplicação de extratos à base de nim para controle da fase de pupa via irrigação (insetigação), sendo indicada para espécies hospedeiras primárias de tefritídeos, onde o ciclo biológico da praga ocorre em gerações superpostas, como, por exemplo, nos pomares de goiaba e acerola no pólo irrigado de Petrolina e Juazeiro.

Outra possível aplicação do nim seria a substituição dos inseticidas sintéticos por produtos à base de nim na composição da isca tóxica, atraindo e matando o inseto adulto, já que as fêmeas necessitam, no período de pré-oviposição, de proteínas e carboidratos. Silva, Nascimento e Santos Neto (2003), estudando o efeito de óleo de nim como componente de isca tóxica em diferentes concentrações (0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,3; 0,5 e 0,7 %), visando ao controle de *C. capitata* em condições de laboratório, registraram mortalidade significativa nas diferentes concentrações e constataram efeito repelente em concentrações superiores a 0,10 %.

Estudos avaliando os efeitos negativos do nim sobre moscas-das-frutas, sobretudo na reprodução, têm sido relatados por vários autores. Steffens e Schmutterer (1983) relataram a redução da fecundidade e da capacidade de vôo de *C. capitata* quando suas larvas são alimentadas com dieta contendo extrato da semente de nim. Di Ilio et al. (1999), ao avaliarem o efeito de diferentes concentrações de extrato da semente de nim adicionada à dieta dos adultos de *C. capitata*, observaram redução significativa no número de ovos depositados. O aumento das

concentrações testadas levou à esterilidade das fêmeas, além de causar leve redução na longevidade. Salles e Rech (1999), estudando o efeito de torta de nim dissolvida em água e ingerida pelo adulto, notaram uma redução significativa no número de ovos por fêmea e na eclosão de larvas, observando ainda efeito na formação das pupas de *A. fraterculus*. Em ensaio visando ao controle de moscas-das-frutas, Nakano e Romano (2002) estudaram o efeito esterilizante do nim e concluíram que a azadiractina, na forma comercial Nim 4000 EEC na dosagem de 30 ppm, pode ser empregada no controle de *C. capitata* causando efeito de esterilidade com até 100 % de eficiência. Singh (2003), estudando os efeitos de extratos aquosos da semente de nim e da azadiractina na fecundidade, fertilidade e desenvolvimento pós-embrionário de *B. cucurbitae* e de *B. dorsalis*, relatou que os resultados indicam claramente que uma baixa concentração de azadiractina pode inibir a fecundidade, a fertilidade e a emergência do adulto.

Além do efeito sobre o inseto, outra vantagem do uso de extratos vegetais, principalmente quando comparados aos agrotóxicos, é a sua compatibilidade com técnicas alternativas de controle, como o uso de parasitóides e de entomopatógenos.

Assim, o uso do nim associado ao controle biológico pode ser favorecido pelo fato de a azadiractina ser mais eficiente por ingestão do que por contato. A isso se soma a rápida eliminação da azadiractina no organismo do inseto (cerca de 24 h, tempo suficiente para que o desenvolvimento do inseto seja comprometido), o que evita a exposição dos inimigos naturais às mesmas doses a que as presas foram submetidas (MARTINEZ, 2002). Stark et al. (1992) avaliaram o efeito da azadiractina quando larvas de terceiro ínstar de *B. dorsalis* parasitadas por *D. longicaudata* e *Psyttalia incisi* (Silvestri) e larvas de *C. capitata* parasitadas por *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) foram acondicionadas em recipientes com areia tratada em várias concentrações (0, 20, 50 e 100 ppm). Somente o parasitóide *P. incisi* foi negativamente afetado pela azadiractina, apresentando maior mortalidade na emergência e menor porcentagem de progênies. Em termos de manejo das moscas-das-frutas no Brasil esses resultados contribuem positivamente, pois nesse trabalho foi comprovado que existe seletividade da azadiractina em relação a *D. longicaudata* (parasitóide com previsão de liberação inundativa no país) quando a fase de pupa no solo é o alvo do controle, podendo haver inclusive efeito aditivo.

Os nematóides entomopatogênicos pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são promissores no controle de mosca-das-frutas, já que o comportamento desse inseto de

abandonar o fruto e penetrar no solo para desenvolvimento das pupas permite a ação do nematóide. Existem referências de estudos demonstrando o efeito de nematóides sobre várias espécies de moscas-das-frutas, tais como: *Anastrepha suspensa* (BEAVERS; CALKINS, 1984), *A. ludens* (TOLEDO et al., 2005), *C. capitata* (GAZIT; ROSSLER; GLAZER, 2000), *B. cucurbitae* e *B. dorsalis* (LINDEGREN; VAIL,1986), *Bactrocera zonata* (Saunders) (ATTALLA; FATMA; EWEIS, 2002) e *R. indifferens* (STARK; LACEY, 1999). Recentemente, Mahmoud (2007) realizou um trabalho bastante promissor, combinando o uso do extrato aquoso da semente ou de produtos à base de nim (NeemAzal T 5 % e Neemix 4,5 %) com o nematóide *Steinernema feltiae* (Filipjev) em diferentes concentrações e avaliou o efeito sobre larvas de terceiro ínstar de *B. zonata*. Foi constatado efeito aditivo quando se utilizaram 50 ou 100 nematóides e 5 % do extrato (causando 92 e 96 % de mortalidade respectivamente); com a utilização de 400 ou 800 nematóides e o extrato a 10 %, registrou-se mortalidade de 100 % das larvas. Utilizando o produto comercial NeemAzal T 5 %, o autor registrou efeito aditivo (0,15 % do produto + 400 nematóides) e efeito sinérgico nos outros tratamentos, sendo que nas concentrações do produto a 1,25 % e 2,5 %, independentemente da quantidade de nematóides infectivos (50, 100, 200, 400 ou 800), observou-se 100 % de mortalidade e nas concentrações menores do produto (0,15; 0,3 e 0,6 %) a mortalidade foi acima de 48 %, atingindo 100 % na maior concentração do nematóide independentemente da concentração do produto. O Neemix 4,5 % causou mortalidade acima de 80 % quando se utilizaram 400 ou 800 juvenis infectivos associados a diversas concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 %) do produto.

Na natureza, os entomopatógenos são importantes reguladores da população de tefritídeos, com maior incidência sobre as pupas e as larvas em trânsito (pré-pupas), sendo que a compatibilidade de extratos e produtos à base de nim com entomopatógenos aumenta o leque das opções de utilização destes no manejo integrado de moscas-das-frutas.

A utilização do nim no controle de moscas-das-frutas é restrita a trabalhos de pesquisa, sendo necessárias investigações pormenorizadas para validação desse modelo no campo. Assim, os relatos de aplicação do nim no manejo integrado de moscas-das-frutas nessa revisão estão fundamentados em hipóteses e na necessidade de um exemplo de sucesso na utilização de plantas inseticidas em programas de MIP.

Referências

AERTS, R.J.; MORDUE (LUNTZ), A.J.J. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 9, p.2117-2132, 1997.

AKHILA, A.; RANI, K. Chemistry of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Vienna, v. 78, p. 47–149, 1999.

ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 155-178, 1994.

ALUJA, M.; JACOME, I.; BIRKE, A.; LOZADA, N.; QUINTERO, G. Basic patterns of behavior in *Anastrepha striata* (Diptera, Tephritidae) flies under field-cage conditions. **Annals of the Entomological Society of America**. Lanham, v. 86, p. 776-793, 1993.

ALUJA, M.; PIÑERO, J.; JACOME, I.; DIAS-FLEISHER, F.; SIVINSKI, J. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). In: ALUJA, M.; NORRBOM, A.L (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae):** phylogeny and evolution of behavior. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 375-406.

ALVARENGA, C.D.; GIUSTOLIN, T.A.; QUERINO, R.B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Coord.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. cap. 11, p. 227-252.

ARAÚJO, E.L.; LIMA, F.A. M.; ZUCCHI, R.A. Rio Grande do Norte. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 23, p. 223-228.

ATTALLA, A.; FATMA, A.; EWEIS, M.A. Preliminary investigation on the utilization of entomopathogenic nematodes as biological control agents against the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). **Egyptian Journal of Agricultural Research**, Cairo, v. 80, n. 3, p. 1045-1053, 2002.

AYYANGAR, G.S.G.; RAO, U.J. Neem extracts as larval repellant and ovipositional deterrents to *Spodoptera litura* (Fabr.). **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 51, p. 121–124, 1989.

BAKER, E.W. Studies on the Mexican fruit fly know as *Anastrepha fraterculus*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 38, p. 95-100, 1945.

BARROS, M.D. **Estudo da estratégia de oviposição em três espécies de tefritídeos (Diptera) no estado de São Paulo**. 1986. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

BEAVERS, J.B.; CALKINS, C.O. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to steinernematid and heterorhabitid nematodes in laboratory studies. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 13, n. 1, p. 137-139, 1984.

BENTO, J.M.S.; NARDI, C. Bioecologia e nutrição *vs* ecologia química: as interações multitróficas mediadas por sinais químicos. In: PANIZZI, A.R.; PARA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos:** base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 7, p. 277-296.

BILTON, J.N.; BROUGHTON, H.B.; JONES, P.S.; LEY, S.V.; LIDERT, Z.; MORGAN, E.D.; RZEPA, H.S.; SHEPPARD, R.N.; SLAWIN, A.M.Z.;WILLIAMS, D.J. An x-ray crystallographic, mass spectroscopic, and NMR study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives. **Tetrahedron**, London, v. 43, n. 12, p. 2805-2815, 1987.

BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. **Chemical Communications**, London, n. 1, p. 23-24, 1968.

_____. Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 969-977, 1971.

CARDOSO, V.V.; FERREIRA, M.P.; MONTAGNER, J.M.; FERNANDEZ, C.G.; MOREIRA, J.C.; OLIVEIRA, A.K. The effects of constant and alternating temperatures on the reproductive potential, life span, and life expectancy of *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4b, p. 775-786, 2002.

CAREY, J.R.; DOWEL, R.V. Exotic fruit fly pests and California Agriculture. **California Agriculture**, Berkeley, v. 43, n. 3, p. 39-40, 1989.

CARVALHO, R.P.L. Alternativas de controle: métodos culturais, atraentes, resistência vegetal e controle biológico. In: ENCONTRO SOBRE MOSCAS-DAS-FRUTAS, 1., 1988, Campinas. **Moscas-das-frutas no Brasil:** anais... Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 86-107.

CARVALHO, R.S. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais**. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPH, 2005. 17 p. (EMBRAPA, CNPH. Circular Técnica, 75).

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.) **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 165-179.

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 377-394, 1992.

CHEN, C.; DONG, Y.; CHENG, L.; HOU, R.F. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in guava. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 462-466, 1996.

CHRISTENSON, L.D.; FOOTE, R.H. Biology of fruit flies. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v. 5, p. 171-192, 1960.

CONNOLY, J.D. Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and the Cneoraceae. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M.F. (Ed). **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. New York: Academic Press, 1983. p. 175–213. (Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 22).

COREY, E.J.; HAHL, R.W. Synthesis of a limonoid, azadiradione. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 30, n. 23, p. 3023–3026, 1989.

CORRÊA, S.; SILVEIRA, D.; SANTOS, C.; LINDEMANN, C.; REETZ, E.R.; BELING, R.R. **Anuário brasileiro da fruticultura 2008**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2008. 138 p.

CORREIA, A.A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; OLIVEIRA, J.V. DE.; TORRES, J.B. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2009.

COUDRIET, D.L.; PRABHAKER, N.; MEYERDIRK, D.E. Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): effects of neem-seed extract on oviposition and immature stages**. Environmental Entomology**, Lanham, v. 14, n. 6, p. 776-779, 1985.

CRESONI-PEREIRA, C.; ZUCOLOTO, F.S. Moscas-das-frutas (Diptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos:** base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 18, p. 733-766.

DA CRUZ, I.B.M.; NASCIMENTO, J.C.; TAUFER, M.; OLIVEIRA, A.K. Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 6, p. 55-66.

DA SILVA, M.F.G.F.; GOTTLI, O.R.; DREYER, D.L. Evolution of limonoids in the Meliaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 299-310, 1984.

DÍAZ-FLEISCHER, F.; PAPAJ, D.R.; PROKOPY, R.J. NORRBOM, A.L. & ALUJA, M. Evolution of fruit fly oviposition behavior. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A.L. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae):** phylogeny and evolution behavior. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap. 30, p. 811-841.

DI ILIO, V.; CRISTOFARO, M.; MARCHINI, D.; NOBILI, P.; DALLAI, R. Effects of a neem compound on the fecundity and longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 76-82, 1999.

DORN, A.; RADEMACHER, J.M.; SEHN, E. Effects of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system, and ovaries in last-instar larvae of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 32, n. 3, p. 231-238, 1986.

DREW, R.A. The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australian and Oceanian regions. **Memorial Queensland Museum**, Brisbane, v.26, p. 1-521, 1989.

DUARTE, A.L.; MALAVASI, A. Tratamentos quarentenários. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 25, p. 187-192.

ERMEL, K.; KALINOWSKI, H.O.; SCHMUTTERER, H. Isolierung und Charakterisierung von Marrangin, einer neuen, die Insektenmetamorphose störenden Substanz aus Samenkernen des Marrangobaumes *Azadirachta excelsa* (Jack). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 112, p. 512–519, 1991.

FERNANDES-DA-SILVA, P.G.; ZUCOLOTO, F.S. The influence of host nutritive value on the performance and food selection in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 39. p. 883-887, 1993.

FLECHTER, B.S. Life history strategies of tephritid fruit flies. In: ROBINSON, A.S.; HOOPER, G. (Ed.). **Fruit flies, their biology, natural enemies and control.** Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 195-208. (World Crop Pest, 3B).

FLETCHER, B.S.; PROKOPY, R.J. Host location and oviposition in tephritid fruit flies. In: BAILEY, W.J.; RIDSDILL-SMITH, J. (Ed.). **Reproductive behavior and mechanisms**. London: Chapman & Hall, 1991. p. 139-171.

FORIM, M.R. **Estudo fitoquímico do enxerto de *Azadirachta indica* sobre *Melia azedarach*:** quantificação de substâncias inseticidas. 2006. 320 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GAZIT, Y.; ROSSLER, Y.; GLAZER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 10, n. 2, p. 157-164, 2000.

GILL, J.S.; LEWIS, C.T. Systemic action of an insect feeding deterrent. **Nature**, London, v. 232, p. 402-403, 1971.

GOULD, W.P. “Cold Storage”. In: SHARP, J.L.; HALLMAN, G.J. (Ed.). **Quarantine treatments for pests of food plants**. Boulder: Westview Press, 1994. p. 119-132.

GOVINDACHARI, T.R.; SANDHYA, G.; GANESH RAJ, S.P. Isolation of novel azadirachtins H and I by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, New York, v. 31, n. 5-6, p. 303-305, 1991.

_____. Azadirachtins H and I: Two new tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica.* **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 55, n. 5, p. 596-601, 1992.

GOVINDACHARI, T.R.; GOPALAKRISHNAN, G.; RAJAN, S.S.; KABALEESWARAN, V.; LESSINGER, L. Molecular and crystal structure of azadirachtin-H. **Acta Crystallografica**, Copenhagen, v. B52, n. 1, p. 145-150, 1996.

GRUBER, A.K. Biología y ecología del árbol de Nim (*Azadirachta indica* A.Juss.): Extracción, medición, toxicidad y potencial de crear resistencia. **Ceiba,** Honduras 1992, v. 33, n. 1, pt. B, p. 249-256, 1992. Apresentado CONGRESO INTERNACIONAL DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, 4., 1992, Honduras. **Memoria...**:

HAJI, F.N.P.; MIRANDA, I.G. Pernanbuco. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 23, p. 229-233.

HEDGE, N.G. Improving the producivity of neem trees. World Neem Conference. **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 50, p. 147-150, 1993.

HENDERSON, C.R.; MCCRINDLE, R.; MALERA, A.; OVERTON, K.H. Tetranortriterpenoids-IX[1, 2]: The constitution and stereochemistry of salannin. **Tetrahedron**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 1525-1528, 1968.

HENDRICHS, J.; HENDRICHS, M.A. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: Location and diel pattern of feeding and other activities on fruiting and nonfruiting hosts and nonhosts. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 83, p. 632-641, 1990.

HENDRICHS, J.; KATSOYANNOS, B.I.; PAPAJ, D.R.; PROKOPY, R.J. Sexual differences in movement between natural feeding and mating sites and trade-offs between food consumption, mating success and predator evasion in Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Oecologia**, Berlin, v. 86, p. 223-231, 1991.

HERNANDEZ-ORTIZ, V.; ALUJA, M. Listado del género Neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) com notas sobre su distribución y plantas hospederas. **Folia Entomológica Mexicana**, México, v. 88, p. 89-105, 1993.

HEYDE, J.V.D.; SAXENA, R.C.; SCHMUTTERER, H. Neem oil and neem extracts as potential insecticides for control of Hemipterous rice pests. In: SCHMUTTERER, H.; ASCHER, K.R.S. (Ed.). **Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants**. Eschborn: Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit, 1984. v. 161, p. 377-390.

HICKEL, E.R. Espessura da polpa como condicionante do parasitismo de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) por Hymenoptera: Braconidae. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32 p. 1005-1009, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Comunicação social. 2007.** Disponível em: <http:www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.hp> Acesso em: 28 dez 2007.

IHERING, H.V. Laranjas bichadas. **Revista Agrícola**, São Paulo, v. 6, n. 70, p. 179-181, 1901.

ISMAN, M.B. Growth inhibitory and antifeedant effects of azadirachtin on six noctuids of regional economic importance. **Pesticide Science,** Inglaterra, v. 38, p. 57–63, 1993.

_____. Insect antifeedants. **Pesticide Outlook**, Washington, v. 13, p. 152–57, 2002.

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

JOHNSON, S.; MORGAN, E.D.; PEIRIS, C.N. Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seeds of neem (*Azadirachta indica*). **Annals of Botany**, London, v. 78, p. 383-388, 1996.

KALINOWSKI, H.O.; ERMEL, K.; SCHMUTTERER, H. Strukturaufklärung eines Azadirachtin derivates aus dem Marrangobaum *Azadirachta excelsa* durch NMR-Spektroskopie. **Liebigs Annalen der Chemie**, Weinheim, n. 9, p. 1033-1035, 1993.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANIKMEDHAKUL, K.; PRAJUABSUK, T.; PANICHAJAKUL, S.; PANYAMEE, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa.* **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, n. 7, p. 1047–1050, 2005.

KELECOM, A.; CABRAL, M.M.O.; GARCIA, E.S. A new euphane from the Brazilian *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 7, p. 39-41, 1996.

KLENK, A.; BOKEL, M.; KRAUS.W. 3-Tigloylazadirachtol (tigloyl = 2-methylcrotonoyl), an insect growth regulating constituent of *Azadirachta indica* **Journal of the Chemical Society**, London, n. 7**,** p. 523-524, 1986.

KOUL, O. **Insect antifeedants**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 1005 p.

KOUL, O.; ISMAN, M.B.; KETKAR, C.M. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*, **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, n. 1, p. 1-11, 1990.

KOVALESKI, A.; SUGAYAMA, R.L.; MALAVASI, A. Controle químico em macieiras. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 17, p. 135-141.

KRAUS, W.; BÖKEL, M.; BRUHN, A.; CRAMER, R.; KLAIBER, I.; KLENK, A.; NAGEL, G.; PÖHNL, H.; SALDO, H.; VOGLER, B. Structure determination by NMR of azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **Tetrahedron**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 2817-2830, 1987.

KUBO, I; MATSUMOTO, A.; MATSUMOTO, T.; KLOCKE, J. New insect ecdysis inhibitory limonoid deacetylazadirachtinol isolated from *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil. **Tetrahedron**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 489-496, 1986.

KUBO, I.; MATSUMOTO T.; MATSUMOTO, A.; SHOOLERY, J.N. Structure of deacetylazadirachtinol application of 2D^{1}H-^{1}H and ^{1}H-^{13}C shift correlation spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v, 25, n. 42, p. 4729-4732, 1984.

LAVIE, D.; JAIN, M.K. Tetranortriterpenoids from *Melia azadirachta* L. **Chemical Communication**, London, n. 6, p. 278–280, 1967.

LEY, S.V.; DENHOLM, A.A.; WOOD, A. The chemistry of azadirachtin. **Natural Products Reports**, London, n. 2, v. 10, p. 109-157, 1993.

LEY, S.V.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ANDERSON, J.C.; AYATS, C.; BONTELI, R.; BECKMANN, E.; BOYER, A.; BRASCA, M.G.; BRICE, A.; BROUGHTON, H.B.; BURKE, B.J.; CLEATOR, E.; CRAIG, D.; DENHOLM, A.A.; DENTON, R.M.; DURAND-REVILLE, T.; GOBBI, L.B.; GOBEL, M.; GRAY, B.L.; GROSSMANN, R.B.; GUTTERIDGE, C.E.; HAHN, N.; HARDING, S.L.; JENNENS, D.C.; JENNENS, L.; LOVELL, P.J.; LOVELL, H.J.; PUENTE, M.L.; KOLB, H.C.; KOOT, W.; MASLEN, S.L.; MCCUSKER, C.F.; MATTES, A.; PAPE, A.R.; PINTO, A.; SANTAFIANOS, D.; SCOTT, J.S.; SMITH, S.C.; SOMERS, A.Q.; SPILLING, C.D.; STELZER, F.; TOOGOOD, P.L.; TURNER, R.M.; VEITCH, G.E.; WOOD, A.; ZUMBRUNN, C. The synthesis of Azadirachtin: a potent insect antifeedant. **Chemistry A-European Journal**, v. 14, n. 34, p. 10683-10704, 2008.

LINDEGREN, J.E.; VAIL, P.V. Susceptibility of Mediterranean fruit fly, melon fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 15, n. 3, p. 465-468, 1986.

LUO, X.; MA, Y.; WU, S.; WU, D. Two novel azadirachtin derivatives from *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**. Washington. v. 62, p. 1022-1024, 1999.

LUO, X.-D.; WU, S.-H.; MA, Y.-B.; WU, D.-G. A new triterpenoid from *Azadirachta indica*. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, p. 668–672, 2000.

MACHADO, A.E.; SALLES, L.A.B.; LOECK, A.E. Exigências térmicas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) e estimativa do número de gerações anuais em Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, p. 573-578, 1995.

MAHMOUD, F.M. Combining the botanical insecticides NSK Extract, NeemAzal T 5 %, Neemix 4.5 % and the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* Cross N 33 to control the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders). **Plant Protect Science**, Praha v. 43, n. 1, p. 19-25, 2007.

MAITLAND, D.P. Locomotion by jumping in the Mediterranean fruit-fly larva *Ceratitis capitata*. **Nature**, London, v. 355, n. 6356, p. 159-161, 1992.

MALATHI, R.; KABALEESWARAN, V.; RAJAN, S.S.; GOPALAKRISHNAN, G.; GOVINDACHARI, T.R. Structure of azadirachtin-I, 11 β-H epimer. **Journal of Chemical Crystallography**, New York, v. 33, n. 4, p. 229-232, 2003.

MALAVASI, A.; BARROS, M.D. Comportamento sexual e de oviposição em moscas-das-frutas (Tephritidae). In: SOUZA, H.M.L. (Ed.). **Moscas-das-frutas no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 25-53.

MALAVASI, A.; PROKOPY, R.J.; MORGANTE, J.S. Oviposition deterring pheronome in *Anastrepha fraterculus* flies. **Journal of Chemical Ecolology**, New York, v. 8, p. 763-771, 1982.

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, S.D.A. Moscas-das-frutas no MIP-Citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS-MIP, 3., 1994, Campinas. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p. 211-231.

MALAVASI, A. Áreas livres ou de baixa prevalência. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000a. cap. 23, p. 175-181.

_____. Systems Approach. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000b. cap. 24, p. 183-186.

_____. Mosca-da-carambola, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F.(Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 4, p. 39-41.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A.; SUGAYAMA, R.L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 10, p. 93-98.

MALCZEWSKA, M.; GELMAN, D.B.; CYMBOROWSKI, B. Effect of azadirachtin on development, juvenile hormone and ecdysteroid titres in chilled *Galleria mellonela* larvae. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 34, p. 725-732, 1988.

MARCO, M.P.; PASCUAL, N.; BELLÉS, X.; CAMPS, F.; MESSEGEUR, A. Ecdysteroid depletion by azadirachtin in *Tenebrio molitor* pupae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 38, p. 60-65, 1990.

MARTINEZ, S. **O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MARTINEZ; S.S.; LIMA, J.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Avaliação agronômica e fitoquímica do neem, *Azadirachta indica*, de diferentes procedências em vários locais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SEB, 1998, p. 1053.

MARTINS, J.C. **Aspectos biológicos de *Anastrepha fraterculus* (Wied. 1830) (Diptera: Tephritidae) em dieta artificial, sob diferentes condições de laboratório**. 1986. 79 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

MARTINS, D.S.; URAMOTO, K.; MALAVASI, A. Espiríto Santo. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 37, p. 253-258.

MENEZES, A.C.S. **Atividade inseticida e tripanocida de *Trichilia casaretti* e *Azadirachta indica***. 2001. 177 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

MESSENGER, P.S.; FLITTERS, N.E. Effect of constant temperature environment on the egg stage of three species of Hawaiian fruit flies. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 51, n. 2, p. 109-119, 1958.

MIKAMI, A.Y.; VENTURA, M.U. Repellent, antifeedant and insecticidal effects of neem oil on *Microtheca punctigera*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p.1121-1126, 2008.

MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V.; PARRA, J.R.P. Influência da umidade em dois tipos de solo, na emergência de *Ceratitis capitata***. Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 321-327, 1989.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: An update. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 39, p. 903-924, 1993.

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

MORDUE (LUNTZ), A.J.; MORGAN, E.D.; NISBET, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 117-134.

MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v, 17, p. 4096–4105, 2009.

MORGANTE, J.S. **Moscas-das-frutas (Tephritidae):** características biológicas, detecção e controle. Brasília: SENIR, 1991, 19 p. (Boletim Técnico, 2).

MORGANTE, J.S.; SELIVON, D.; SOLFERINI, V.N.; MATIOLI, S.R. Evolutionary patterns in specialist and generalist species of *Anastrepha*. In: ALUJA, M.; LIEDO, P. (Ed.). **Fruit flies:** biology and management. New York: Springer-Verlag, 1983. p. 15-20.

NAKANO, O.; ROMANO, F.C.B. Uso de reguladores de crescimento na esterilização da mosca-do-mediterrâneo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 115-125, 2002.

NASCIMENTO, A.S. **Aspectos ecológicos e tratamento pós-colheita de moscas-das-frutas (Tephritidae) em manga, *Mangifera indica***. 1990. 97 p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

_____. **Tratamento hidrotérmico de manga (*Mangifera indica* L.):** procedimentos na pré e pós-colheita, visando o controle de moscas-das-frutas (Dip.: Tephritidae). Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1992. 19 p. (EMBRAPA, CNPMF. Circular Técnica, 17).

NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S. Manejo integrado de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 22, p.169-173.

NASCIMENTO, A.S.; MALAVASI, A.; MORGANTE, J.S.; DUARTE, A.L. Hot water immersion treatmant for mangoes infested with *Anastrepha fraterculus*, *A. obliqua* and *Ceratitis capitata* in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 456-460, 1992.

NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S.; MALAVASI, A. Monitoramento populacional. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 23, p. 109-112.

NAUMANN, K.; ISMAN, M.B. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed extracts and oils as oviposition deterrents to noctuid moths. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 76, p. 115-120, 1995.

NORA, I.; HICKEL, E. **Controle integrado de moscas-das-frutas:** manual do produtor. Florianópolis: EPAGRI, 1997. 21 p.

NORRBOM, A.L. **Fruit fly (Diptera: Tephritidae) classification and diversity.** Disponível em: <http:www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/ClasDivT.html>
Acesso em: 08 jul 2008a.

_____. **Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species database.** Disponível em: <http:www.sel.barc.usda.gov:591/diptera/Tephritidae/TephName/search.html>. Acesso em: 08 jul. 2008b.

NORRBOM, A.L.; CARROLL, L.E.; FREIDBERG, A. Status of knowledge. In: THOMPSON, F.C. (Ed.). **Fruit fly expert identification system and systematic information database**. Leiden: Backhuys, 1998. p. 9-47.

NORRBOM, A.L.; ZUCCHI, R.A.; HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. Phylogeny of the genero *Anastrefa* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotripanini) based on morphology. In: NORRBOM, A.L.; ALUJA, M. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae):** phylogeny and evolution of behevior. Boca Raton: CRC Press, 1999. chap. 12, p. 299-342.

PEDROSO, A.S. **Dados bionomicos da *Ceratitis capitata* Wied., 1824 (Diptera: Tephritidae) obtidos em laboratório em regime de dieta artificial**. 1972. 127 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

PENNINGTON, T.D.; STYLES, B.T. A generic monograph of the Meliaceae. **Blumea**, Leiden, v. 22, p. 419, 1975.

PROKOPY, R.J.; HENDRICHS, J. Mating behavior of *Ceratitis capitata* on a field-caged host tree. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 72, p. 642-648, 1979.

PROKOPY, R.J.; POWERS, P.J. Influence of neem seed extract on oviposition and mortality of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) adults. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 119, n. 1, p. 63-65, 1995.

PROKOPY, R.J.; ROITBERG, B.D. Foraging behavior of true fruit flies. **American Scientist**, New Haven v. 72, p. 41-49, 1984.

_____. Fruit fly foraging behavior. In: ROBINSON, A.S.; HOOPER, G. (Ed.). **Fruits flies, their biology, natural enemies and control.** Amsterdam: Elsevier, 1989. v. 3A, p. 293-306.

PROKOPY, R.J.; ZIEGLER, J.R.; WONG, T.T.Y. Deterrence of repeated oviposition by fruit marking pheromone in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 4, p. 55-63, 1978.

QUESADA-ALLUÉ, L.A. **La mosca mediterránea:** guia de laboratório. Buenos Aires: Talleres Trama SRL Press, 1994. 72 p.

RAMJI, N.; VENKATAKRISHNAN, K.; MADYASTHA, K.M. 11-epi-azadirachtin D: an epimeric azadirachtin analogue from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 1, p. 265-267, 1998.

REMBOLD, H. Azadirachtins, their structure and mode of action. In: ARNASAN, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 1-10. (ACS. Symphosium Series, 387).

_____. Isomeric azadirachtins and their mode of action. In: JACOBSON, M. **The neem tree.** London: CRC Press, 1990. p. 47-67.

ROJATKAR, S.R.; NAGASAMPAGI, B. 1-tigloyl-3-acetyl-11-hydroxy-4β-methylmeliacarpin from *Azadirachta indica***. Phytochemistry**, New York, v. 32, n. 1, p. 213-214, 1993.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 191-201, 2006.

SALLES, L.A.B. Efeito da temperatura constante na oviposição e no ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 22, p. 47-55, 1993.

_____. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas Sul-americana**. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, 1995. 58 p.

_____. Principais pragas e seu controle. In: MEDEIROS A.C.; RASEIRA, M. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Pelotas: Embrapa, CPACT, 1998. p. 205-239.

_____. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.). In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 81–86.

SALLES, L.A.B.; KOVALESKI, A. Moscas-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **HortiSul**, Pelotas, v. 1, p. 5-9, 1990.

SALLES, L.A.B.; RECH, N.L. Efeito de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 225-227, 1999.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório.** Belém: EMBRAPA, CPATU, 2004. 6 p. (EMBRAPA, Comunicado Técnico, 99).

SAXENA, R.C.; ZHANG, Z.T.; BONCONDIN, M.E.M. Neem oil affects courtship signals and mating behaviour onf brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homopotera: Delphacidae) females. **Journal of Applied Entomomology**, Berlin, v. 116, p. 127-132, 1993.

SCHLÜTER, U.; BIDMON, H.J.; GREWE, S. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Insect Phisiology**, London, v. 31, p. 773-777, 1985.

SCHMUTTERER, H. **The neem tree *Azadirachtia indica* A. Juss and other meliaceous plants:** sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. Weinheim: VCH, 1985. 696 p.

_____. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 35, p. 271-297, 1990.

SCHMUTTERER, H.; ASCHER, K.R.S. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. In: INTERNATIONAL NEEM CONFERENCE, 3., 1987, Nairobi. **Proceedings…** Nairobi: GTZ Eschborn, 1987. p. 703.

SCHMUTTERER, H.; SINGH, R.P. List of insect pests susceptible to neem products. In: SCHMUTTERER, H. (Ed.). **The neem tree**: *Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants - sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. 2nd ed. Mumbai: Neem Foundation, 2002. p. 411-456.

SELIVON, D.; PERONDINI, A.L. Morfologia dos ovos de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha*. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 5, p. 49-54.

SHOWLER, A.T.; GREENBERG, S.M.; ARNASON, J.T. Deterrent effects of four neem-based formulations on gravid female boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition on cotton squares. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 2, p. 414 – 421, 2004.

SIDDIQUI, S.B.; ALI, S.T.; RASHEED, M.; KARDAR, M.N. Chemical constituents of the flowers of *Azadirachta indica*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 86, n. 8, p. 2787-2796, 2003.

SILVA, V.E.S.; NASCIMENTO, A.S.; SANTOS NETO, C. Efeito do óleo de nim *Azadirachta indica* na mortalidade e repelência de *Ceratitis capitata* (Tephritidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro. **Anais…** São Pedro: SICOMBIOL, 2003. p. 171.

SINGH, S. Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, p. 540-547, 2003.

SINGH, S.; SINGH, R.P. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, n. 3, p. 191-197, 1998.

SIVINSKI, J.; BURK, T. Reproductive and mating behavior. In: ROBINSON, A.S.; HOOPER, G. (Ed.). **Fruit flies:** their biology, natural enemies and control. New York: Elsevier Science, 1989. p. 343-350. (World Crop Pests, 3A).

SMITH, C.M. **Plant resistance to arthropods:** molecular and conventional approaches. Berlin: Springer, 2005. 423 p.

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v. 34, n. 1, p. 83-87, 2005.

SOUZA, H.M.L.; CYTRYNO WICZ , M.; MORGANTE , J.S.; PAVAN , O.H.O. Occurrence of *Anastrepha fraterculus* (Wied.), *Ceratitis capitata* (Wied.) and *Silba* spp. eggs in oviposition bore sonthre e hostfruit. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 27, p. 191-195, 1983.

STARK, J.D.; VARGAS, R.I.; THALMAN, R.K. Azadirachtin: Effects on metamorphosis, longevity, and reproduction of three tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 6, p. 2168-2174, 1990.

STARK, J.D.; VARGAS, R.I. An evaluation of alternative insecticides to diazinon for control of tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) in soil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 1, p. 139-143, 2009.

STARK, J.D.; WONG, T.T.Y.; VARGAS, R.I.; THALMAN, R.K. Survival, longevity, and reproduction of tephritid fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) reared from fruit flies exposed to azadirachtin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, n. 4, p. 1125-1129, 1992.

STARK, J.E.P.; LACEY, L.A. Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, n. 2, p. 206-208, 1999.

STEFFENS, R.J.; SCHMUTTERER, H. The effects of a crude methanolic neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extract on metamorphosis and quality of adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Dip: Tephritidae). **Zeitschrift fur angewandte entomologie**, Hamburg, v. 94, p. 98-103, 1983.

SUGAYAMA, R.L. ***Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na região produtora de maçãs do Rio Grande do Sul:** relação com seus inimigos naturais e potencial para o controle biológico. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2000.

SUGAYAMA, R.L.; MALAVASI, A. Ecologia comportamental. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 12, p. 103-108.

SUNDARAM, K.M.S. Azadirachtin biopesticide: A review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health.** Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, New York, v. 31, n. 4, p. 913-948, 1996.

TAUFER, M. **Aspectos biológicos e o efeito de esteróides e análogos no desenvolvimento pré-imaginal e imaginal de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)**. 1995. 81 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

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

TAVARES, M.A.G.C. **Busca de compostos em *Chenopodium* spp. (Chenopodiaceae) com bioatividade em relação a pragas de grãos armazenados.** 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

THOMPSON, F.C. Introduction. In: THOMPSON, F.C. (Ed.). **Fruit fly expert identification system and systematic information database**. Leiden: Horth American Dipterists' Society, Backhuys, 1998. p. 5-6.

TOLEDO, J.; IBARRA, J.E.; LIEDO, P.; GÓMEZ, A.; RASGADO, M.A.; WILLIANS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 15, n. 6, p. 627-634, 2005.

TORRES, A.L.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; MEDEIROS, C.A.M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella.* **Bragantia**, Campinas, v. 65, p. 447-457, 2006.

TURNER, C.J.; TEMPESTA, M.S.; TAYLOR, R.B.; ZAGORSKI, M.G.; TERMINI, J.S.; SCHROEDER, D.R.; NAKANISHI, K. An NMR spectroscopic study of azadirachtin and its trimethyl ether. **Tetrahedron**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 2789- 2803, 1987.

UEBEL, E.C.; WARTHEN, J.D.; JACOBSON, M. Preparative reversed-phase liquid chromatographic isolation of azadirachtin from neem kernels. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 2, n. p. 875–882, 1979.

VALENCIA-BOTÍN, A.J.; BAUTISTA-MARTINEZ, N.; LÓPEZ-BUENFIL, J.A. Uso de extractos acuosos de nim, *Azadirachta indica* A. Juss, en la oviposición de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) en naranja Valencia. **Fitosanidad**, Playa, v. 8, n. 4, p. 57-59, 2004.

Van RANDEN, E.J.; ROITBERG, B.D. Effect of a neem (*Azadirachta indica*)-based insecticide on oviposition deterrence, survival, behavior and reproduction of adult western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Hawaii, v. 91, n. 1, p. 123-131, 1998.

VEITCH, G.E.; BOYER, A.; LEY, S.V. The azadirachtin story. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 47, n. 49, p. 9402-9429, 2008.

VEITCH, G.E.; BECKMANN, E.; BURKE, B.J.; BOYER, A.; MASLEN, S.L.; LEY, S.V. Synthesis of azadirachtin: A long but successful journey. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 46, n. 40, p. 7629-7632, 2007.

VENDRAMIM, J.D.; GUZZO, E.C. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos:** base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 25, p. 1055-1105.

VIEIRA; P.C.; MAFEZOLI; J.; BIAVATTI, M.W. Inseticidas de origem vegetal. In: CORREA, A.G.; VIEIRA; P.C. (Ed.). **Produtos naturais no controle de insetos**. 2. ed. São Paulo: EdUFScar, 2007. cap. 4. p. 69-104.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. cap. 11. p. 181-188.

WATERMAN, P.G. Phytochemical diversity in the order Rutales. In: DOWNUM, K.; ROMEO, J.T.; STAFFORD, H. (Ed.). **Phytochemical potential of tropical plants**. New York: Plenum, 1993. p. 203-233.

WEENS JR, H.V. **Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied.)**. Gainesville: Florida Department of Agriculture, Division of Plant Industry, 1981. 12 p. (Entomology Circular, 230).

WHITE, I.M.; ÉLSON-HARRIS, M.M. **Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics**. Wallingford: CAB International, 1992 601 p..

YAMASAKI, R.B.; KLOCKE, J.A.; LEE, S.M.; STONE, G.A.; DARLINGTON, M.V. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 356, p. 220–226, 1986.

YUVAL, B.; HENDRICHS, J. Behavior of flies in the genus *Ceratitis* (Dacinae: Ceratitidini). In: ALUJA, M.; NORRBOM, A.L. (Ed.). **Fruit fly (Tephritidae):** phylogeny and evolution behavior. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap. 17, p. 429-458.

ZANNO, P.R.; MIURA, I.; NAKANISHI, K.; ELDER, D.L. Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Application of PRFT/CWD Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 97, n. 7, p. 1975-1977, 1975.

ZUCCHI, R.A.; ARAÚJO, E.L.; CANAL-DAZA, N.A.; UCHOA-FERNANDES, M.A. **La mosca Sudamericana de las frutas, *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en el Brasil. In The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.):** advances in artificial rearing taxonomic status and biological studies. Chile: Proceedings of the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. 1999. p. 5-12.

ZUCCHI, R.A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 1, p. 13-24.

_____. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), In: VILELA, E.F.: ZUCCHI, R.A.: CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 15-22.

_____. Diversidad, distribución y hospederos del gênero *Anastrepha* en Brasil. In: HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (Ed.). **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae):** diversidad, biologia y manejo. México: S y G editores, 2007. p. 77-100.

ZUCOLOTO, F.S. Alimentação e nutrição de moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 7, p. 67-80.

2 EFEITO DE DERIVADOS DO NIM COMPONDO UMA ISCA E COMO REGULADOR DE CRESCIMENTO DE MOSCAS-DAS-FRUTAS

Resumo

Avaliou-se a bioatividade de extratos aquosos e orgânicos e do óleo de amêndoas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) compondo uma isca para adultos e como regulador de crescimento de imaturos para *Anastrepha fraterculus* (Wied.) e *Ceratitis capitata* (Wied.). Inicialmente, foi realizada a seleção do atrativo para compor a isca. Em seguida, utilizando-se o extrato aquoso de amêndoas de nim, estimou-se a CL_{50} para adultos expostos à isca (solução de mel a 20 % + nim) e para imaturos mantidos sobre areia tratada. Para os adultos, as CL_{50} estimadas foram 7.522 ppm para *A. fraterculus* e 1.368 ppm para *C. capitata*. Já para a fase imatura, foram estimadas CL_{50} de 13.028 e de 9.390 ppm para as duas espécies, respectivamente. Subsequentemente, extratos de folhas, de ramos e de amêndoas de nim em diferentes solventes (água, metanol, diclorometano e hexano) e óleo de amêndoas foram comparados empregando-se a CL_{50} obtida, compondo uma isca (solução com mel a 20 % + derivado do nim) para adultos e tratando o substrato de pupação das moscas (areia esterilizada) para o qual foram transferidas larvas de 3º ínstar. Como controles, nos dois casos, foram utilizados: mel, mel + corante azul anis e mel + corante + acetona a 5 %). Foram também determinados o rendimento de extração e os teores de azadiractina dos derivados do nim. Verificou-se que os derivados do nim na concentração de até 7.522 e 1.368 ppm não afetaram os adultos de *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente. Já para a fase imatura de *C. capitata*, os extratos de amêndoas em metanol e em diclorometano causaram 98,5 e 100 % de mortalidade na concentração de 9.390 ppm, respectivamente, diferindo dos demais tratamentos. Em relação aos imaturos de *A. fraterculus*, os extratos de amêndoas em diclorometano e de ramos em diclorometano na concentração de 13.028 ppm causaram 86,01 e 98,13 % de mortalidade, respectivamente, diferindo dos demais tratamentos. O extrato de ramos em diclorometano apresentou bioatividade como regulador de crescimento das duas espécies de moscas-das-frutas. A água propiciou maior rendimento de extração de substâncias químicas do nim do que os solventes orgânicos. A azadiractina foi encontrada em maior quantidade nas amêndoas do que nas folhas e nos ramos de *A. indica*. O metanol apresentou maior capacidade de extração de azadiractina quando comparado com diclorometano, hexano e água. O efeito do uso de derivados do nim em isca e como regulador de crescimento é discutido.

Palavras-chave: Plantas inseticidas, Mosca-sul-americana, Moscamed, Limonóides, Azadiractina

Abstract

The bioactivity of aqueous and organic extracts and seed kernel oil of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) as adult bait and as larval growth regulator for *Anastrepha fraterculus* (Wied.) and *Ceratitis capitata* (Wied.) was evaluated. Initially, the selection of the attractant to make the bait was performed. Then, using the aqueous extract from neem seed kernels, the LC_{50} was estimated for adults exposed to the bait (a solution of 20 % honey + neem) and for larvae in

contact with treated sand. For adults, the estimated LC_{50} was 7,522 ppm for *A. fraterculus* and 1,368 ppm for *C. capitata*. For larvae, the estimated LC_{50} was 13,028 and 9,390 ppm for the two species, respectively. The efficacy of extracts from leaves, branches and seed kernels in different solvents (water, methanol, dichloromethane and hexane) and of seed kernel oil was compared using the estimated LC_{50} as component of a bait (solution of 20 % honey + neem) for adults and as treated sand for third instar larvae. The controls used, in both cases, were honey, honey + blue dye, and honey + 5 % acetone + blue dye. Furthermore, the extraction yield and the azadirachtin levels of the neem derivatives were determined. The neem extracts in the concentrations of 7,522 and 1,368 ppm did not affect the adults of *A. fraterculus* and *C. capitata*, respectively. For the *C. capitata* larvae, otherwise, the extracts of seed kernels in methanol and in dichloromethane provoked 98.5 and 100 % mortality, respectively, differing from the other treatments. In relation to the larvae of *A. fraterculus*, the extracts of seed kernels and branches in dichloromethane in the concentration of 13,028 ppm provoked 86.01 and 98.13 % of mortality, respectively, differing from the other treatments. The extract from branches in dichloromethane showed bioactivity as growth regulator for the two fruit flies species. Water allowed a higher yield of chemical substance extraction than the organic solvents. Higher amounts of azadirachtin were found in the seed kernels than in the leaves and branches of *A. indica*. The methanol presented higher capacity of azadirachtin extraction when compared with dichloromethane, hexane and water. The neem's effect as a component of bait and as growth regulator is discussed.

Keywords: Insecticidal plants, South American fruit fly, Medfly, Limonoids, Azadirachtin

2.1 Introdução

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) constituem um complexo de insetos que infestam uma grande variedade de plantas, cultivadas ou silvestres, em várias regiões do mundo (ALUJA, 1999; CLARKE et al., 2005). Apresentam *status* de principal obstáculo à livre comercialização de frutas em escala mundial, tanto pelo risco de introdução da praga, como pela inocuidade do alimento (MALAVASI, 2000a; ALUJA; MANGAN, 2008). Na América do Sul, duas espécies possuem maior notoriedade, a mosca-sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wied.) e a mosca-do-mediterrâneo, moscamed, *Ceratitis capitata* (Wied.), em razão dos danos causados e da sua ampla distribuição geográfica.

No Brasil, os produtos utilizados para o seu controle são os mesmos usados há quatro décadas e incluem principalmente os organofosforados (malathion, dimethoate e fenthion) aplicados através de iscas tóxicas para controle de adultos e ou pulverização em cobertura total da planta para controle de larvas no fruto. Alguns piretróides também foram registrados, mas com uso bastante limitado, e, assim, a única inovação recente nesse campo do conhecimento foi a descoberta do espinosade. Diferentemente, em outros países, existem registros de inseticidas (ex:

diazinon) para tratamento de solo abaixo da copa das árvores para controle de moscas-das-frutas (STARK; VARGAS, 2009).

As duas espécies são altamente sensíveis à maioria dos inseticidas químicos. Entretanto, recentemente, foi demonstrado que existem populações resistentes de C. *capitata* ao organofosforado malathion (MAGAÑA et al., 2007), cujo impacto negativo sobre insetos benéficos já é conhecido de longa data (HOELMER; DAHLSTEN, 1993). De forma análoga, existem registros de espinosade causando mortalidade de inimigos naturais (VARGAS et al., 2001; CISNEROS et al., 2002), porém com menor intensidade. Por outro lado, o diazinon, usado sob árvores frutíferas na Califórnia, quando introduções incipientes de moscas-das-frutas são detectadas, não é muito efetivo em campo e também causa impacto sobre organismos benéficos (STARK; VARGAS, 2009).

A busca por alternativas aos agrotóxicos para o manejo de tefrítideos não é uma novidade no meio científico mundial, podendo ser representadas pela técnica do inseto estéril (MASTRANGELO et al., 2010), pela técnica de aniquilação de machos com o paraferomônio metil eugenol (MALAVASI, 2000b), por liberações massais de parasitóides (BARANOWSKI; GLENN; SIVINSKI, 1993; ALVARENGA et al., 2005), aplicação de ácido giberélico (BIRKE et al., 2006), estudos com entomopatógenos, fungos ou nematóides, (STARK; LACEY, 1999; GAZIT; ROSSLER; GLAZER, 2000; TOLEDO et al., 2005; QUESADA-MORAGA; RUIZ-GARCÍA; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006), utilização de produtos fototóxicos (MORENO et al., 1996), deterrentes de oviposição, tais como o feromônio de marcação do hospedeiro (PROKOPY; ZIEGLER; WONG, 1978; PAPAJ et al., 1990; 1992). Por outro lado, pouco ou nenhuma pesquisa têm sido dedicada ao estudo de metabólitos secundários utilizadas pelas plantas para a defesa contra esse grupo de pragas.

A ordem Rutales, à qual o nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) pertence, inclui plantas que são uma das fontes mais ricas e diversas de metabólitos secundários em Angiospermas (WATERMAN, 1993). Dentro de um amplo universo de classes de compostos com características ou potencial inseticida encontrados em plantas dessa ordem, destacam-se os limonóides (DA SILVA et al., 1984; CHAMPAGNE et al., 1992; ROY; SARAF 2006). De diferentes partes do nim já foram isolados mais de 200 compostos, dos quais cerca de 130 são limonóides (KANOKMEDHAKUL et al., 2005), entre os quais, a azadiractina é o mais investigado e considerado o tetranortriterpenóide com maior potencial para o manejo de pragas.

Os subprodutos do nim podem ser aplicados no manejo de tefritídeos, pois são seletivos aos seus inimigos naturais (STARK et al.,1992) e compatível com outras medidas de controle (MAHMOUD, 2007), além de serem biodegradáveis e praticamente atóxicos ao homem. Assim, produtos à base de nim na composição da isca tóxica podem ser empregados em substituição aos inseticidas sintéticos (ALVARENGA; QUERINO; GIUSTOLIN, 2006) ou, numa perspectiva diferente, empregá-los no controle da fase de larva em trânsito e ou de pupa, estádio em que o inseto fica imobilizado no solo e, consequentemente, bastante vulnerável a medidas de controle. Nesse sentido, avaliou-se o efeito dos extratos de nim compondo uma isca e como regulador de crescimento dos estágios imaturos (larva em trânsito e ou pupa).

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Criação de moscas-das-frutas em condições de laboratório

Para início da criação de *C. capitata* (selvagem) no Laboratório de Plantas Inseticidas foram obtidas pupas da colônia mantida no Laboratório de Radioentomologia no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Piracicaba, SP.

As pupas foram acondicionadas em recipientes de vidro no interior da gaiola de criação do adulto e, após a emergência, os adultos foram alimentados com proteína hidrolisada e açúcar (proporção de 1:3) e água deionizada, sendo mantidos sob temperatura de 25 ± 2ºC, umidade relativa do ar de 60 ± 10 % e fotofase de 14 h. A gaiola de criação de adultos possui a parte superior e anterior de acrílico e a parte posterior e as laterais teladas. A parte posterior recebia uma iluminação artificial para estimular a oviposição na tela e apresentava uma inclinação de cerca de 10 % para permitir a coleta de ovos em uma bandeja com água deionizada, mantida externamente, logo abaixo da gaiola. Diariamente, os ovos eram coletados e peneirados em tecido *voil* e, com auxílio de um pincel, distribuídos em bandejas plásticas contendo dieta artificial para a alimentação das larvas.

A fase larval foi mantida em BOD (25 ± 1ºC, umidade relativa do ar de 60 ± 5 % e fotofase de 14 h) em uma dieta composta por água deionizada, farelo (soja e trigo), açúcar, levedo de cerveja, metilparahidroxibenzoato (nipagin), benzoato de sódio e ácido cítrico. As larvas no final do 3º ínstar (pré-pupa), com cerca de 8 dias após a inoculação dos ovos, eram retiradas da dieta

artificial e acondicionadas em vidros contendo vermiculita para pupação, sendo estes fechados com tecido *voil*. Posteriormente, os adultos emergiam reiniciando uma nova geração. Os insetos foram criados conforme metodologia adaptada de Carvalho e Nascimento (2002) e Walder (2002).

Em relação a *A. fraterculus* (Wied.), em todos os ensaios com adultos e ou larvas de 3º ínstar (pré-pupa), os insetos foram obtidos da colônia mantida no Laboratório de Radioentomologia do CENA/USP.

2.2.1.2 Obtenção e rendimento dos extratos aquosos e orgânicos de diferentes estruturas do nim

Para obtenção dos derivados para os bioensaios, foram obtidas amêndoas e óleo de amêndoas de *A. indica* da Empresa Baraúna Indústria e Comércio Ltda. Nessa empresa, as sementes foram colhidas em agosto de 2008 na propriedade localizada em Catanduva-SP e as cascas das sementes foram retiradas resultando nas amêndoas, estrutura da qual foi extraída o óleo. Os ramos e as folhas de *A. indica* foram coletados em árvores no campus da ESALQ/USP no período de março a abril de 2009.

As estruturas (folhas, ramos e amêndoas) foram desidratadas em estufa a 40ºC, por 48 a 96 h e, em seguida, trituradas em moinho de facas de modo a se obterem os pós vegetais, que foram acondicionados em frascos de vidro hermeticamente fechados.

Para obtenção dos extratos aquosos liofilizados de folhas, de ramos e de amêndoas de *A. indica* foi realizada uma extração por maceração em Erlenmeyer, utilizando-se 100 g de pó de cada estrutura vegetal (folhas, ramos ou amêndoas,) em 500 ml de água deionizada durante 72 h. A cada 24 h, filtrava-se o material através de tecido *voil* até a obtenção das soluções (extraído + água) e em seguida o material era recondicionado no Erlenmeyer e acrescidos 500 ml de água deionizada. Após as 72 h a torta remanescente foi descartada.

A partir de tais soluções, em liofilizador Pump Savant VLP 80®, obtiveram-se os referidos extratos aquosos liofilizados. A liofilização possibilita o armazenamento do extrato, a determinação do rendimento de extração e finalmente a diluição dos extratos em função do que foi realmente extraído, em vez de diluir com base no peso inicial do material submetido à extração, evitando sub ou superestimação da amostra.

Posteriormente foram obtidos três extratos orgânicos de cada parte da planta (folhas, ramos e amêndoas) com os solventes hexano, diclorometano e metanol em ordem crescente de polaridade. Para a obtenção dos extratos, os pós-vegetais foram submetidos à extração em sistema de Soxhlet. Na extração, uma amostra de cerca de 200 g de pó de cada estrutura foi distribuída em cinco extratores de Soxhlet, sendo que em cada extrator eram colocados 40 g de pó dentro de um cartucho de papel filtro junto com 300 ml de solvente para folhas e para amêndoas e 200 ml de solvente para ramos.

O tempo de extração variou conforme a estrutura e o solvente utilizado. Para as folhas, a amostra ficou sob refluxo durante 24 h no solvente hexano, 12 h no diclorometano e 13 h no metanol; para os ramos os períodos foram 5 h no solvente hexano, 3 h no diclorometano e 5 h no metanol e para as amêndoas, os referidos períodos foram 6, 4 e 4 h, respectivamente. O término da extração foi determinado pela mudança de coloração do solvente, ou seja, quando o mesmo passava a apresentar tonalidade incolor ao passar pela amostra indicando que a extração foi feita até exaustão, usando-se a seguir o solvente de polaridade imediatamente superior.

Esse procedimento foi repetido até completar a quantidade de massa total extraída para cada estrutura da planta e solvente. Em seguida, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a 40°C, à pressão reduzida, mediante o uso de trompa de água. Após esse processo os extratos foram armazenados em frascos de vidro e colocados em capela com fluxo de ar até completa evaporação dos solventes. Com base na quantidade de extrato obtido, foi possível calcular o rendimento de extração, já que se partiu de uma quantidade de pó conhecida para cada parte da planta. Além desses tratamentos, foi utilizada uma formulação comercial de óleo de amêndoas de nim.

2.2.1.3 Determinação da azadiractina nos derivados do nim

As amostras (extratos aquosos e orgânicos, e óleo de nim) foram submetidas a um processo de limpeza (fracionamento). Inicialmente o cartucho SPE-CN (100 mg / 1 ml) foi acondicionado com 5 ml de n-hexano e, em seguida, a amostra (extrato ou óleo de nim) foi solubilizada com 1 ml de n-hexano, homogeneizada em agitador de tubos e transferida para o cartucho SPE. Posteriormente, a amostra foi eluída sem auxílio de vácuo e lavada com 4 ml de n-hexano

deixando o cartucho secar no final. Os analitos de interesse foram removidos com 1 ml de metanol e transferidos para um frasco de injetor automático (vial).

Para análise cromatográfica das amostras, utilizou-se uma coluna analítica Agilent Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm – S/N USKH040659) acoplada a uma coluna de segurança C18 (Phemonemex® – 4 x 3 mm), com uma vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 µl e um comprimento de onda de detecção fixo de 217 nm (λmáx absorção). Uma separação eficiente para os extratos sólidos foi obtida com uma fase móvel binária constituída de H_2O:ACN nas proporções de 65:35. Os parâmetros encontrados mostraram-se seletivos e foram utilizados em todas as amostras analisadas.

Para determinação da concentração de azadiractina ($\mu g.ml^{-1}$) na solução utilizou-se a fórmula: $c_o = (A_i \pm b)/a$, onde: c_o = Concentração de azadiractina ($\mu g.ml^{-1}$) na solução; A_i = Valor medido experimentalmente (área da banda cromatográfica); *b* = Coeficiente de interceptação da curva de calibração e a = Coeficiente angular da curva de calibração.

Para determinação da quantidade de azadiractina nas amostras (extratos aquosos e orgânicos, e óleo de nim), utilizou-se a fórmula: $C = (c_o \,.\, D_{dil} \,.\, 1000) / (M)$, onde: C = Concentração de azadiractina ($mg.kg^{-1}$) na solução; c_o = Concentração de azadiractina da amostra em solução ($\mu g.ml^{-1}$); D_{dil} = Volume de diluição após remoção do cartucho SPE (ml) e M = Massa da amostra pesada (mg).

2.2.1.4 Padronização de um atrativo alimentar para os bioensaios com adultos de moscas-das-frutas

Por meio de testes preliminares onde foi constatado que o extrato vegetal atua lentamente sobre os adultos de *C. capitata* e *A. fraterculus* foi possível estimar o período de duração necessário para os experimentos. Dessa forma, se fez necessária a padronização de um atrativo alimentar adequado de forma que o mesmo atraísse e também permitisse a sobrevivência do inseto, o que foi feito com base no tratamento controle. Foi conduzido um experimento com o atrativo Biofruit®, mel e a uma mistura Biofruit® + mel. Os dois primeiros foram diluídos em água deionizada em quatro concentrações (5, 10, 15 e 20 %), sendo a mistura diluída nessas mesmas concentrações na proporção 1:1.

Para instalação dos experimentos, inicialmente foram individualizados 5 casais em tubos de vidro por um período de 12 h sem alimentação. Após esse período, os atrativos (tratamentos) foram pulverizados sobre plantas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* L. Osbeck) em tubetes, sendo a pulverização feita por meio de pistola tipo gravidade (Arprex®, modelo 5, 20/30 lb/pol2 com bico de 0,8 mm) adaptada como mini-atomizador acoplado a uma bomba de vácuo. Em cada planta foram pulverizados 5 ml do tratamento numa única vez, permitindo uma cobertura total das plantas (ramos e folhas).

As plantas utilizadas possuíam cerca de seis a 10 folhas e 15 a 20 cm de altura. Estas foram colocadas em um suporte plástico descartável contendo areia esterilizada e individualizadas em gaiolas confeccionadas com garrafas "PET" poli (tereftalato de etileno) transparentes. Para tal, foram retirados os fundos das garrafas para facilitar a adaptação em placas de Petri médias e feita uma abertura na parte frontal da gaiola, a qual foi vedada com tecido *voil*. Na boca da garrafa também foi colocado *voil* preso com elástico e sobre o *voil* um algodão umedecido trocado a cada 8 h. Posteriormente, os casais foram liberados nas gaiolas (Figura 2.1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 13 tratamentos e cinco repetições, totalizando 65 parcelas.

Figura 2.1 - Sistema para avaliação dos atrativos (A); Limão 'Cravo' em tubete sobre suporte com areia esterilizada (B)

2.2.1.5 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata*

Para estimativa das CL_{50} para os adultos das duas espécies de mosca-das-frutas foram instalados experimentos com o extrato aquoso de amêndoas de nim em diferentes concentrações espaçadas em escala logarítmica (320; 1.000; 5.600 e 32.000 ppm) associado a um atrativo alimentar (mel a 20 %), compondo uma isca (extrato + mel). A essa mistura também foi adicionado um corante alimentício de cor azul (azul anis - 0,125 %) com o objetivo de verificar se o inseto realmente estava se alimentando da isca. Como tratamento controle foi utilizada uma solução de água deionizada + mel, a 20 %, sendo também adicionado o corante alimentício. Para instalação dos experimentos, inicialmente foram individualizados cinco casais em tubos de vidro por um período de 12 h sem alimentação. Após esse período foi realizada a pulverização da isca sobre plantas de limão 'Cravo' em tubetes por meio de um mini-atomizador (descrito no item 2.2.1.4). Em cada planta foram pulverizados 5 ml do tratamento numa única vez.

As plantas foram individualizadas em gaiolas semelhantes à descrita no item 2.2.1.4 (Figura 2.1). Os insetos com abdome sem coloração azul (Figura 2.3) que estavam dentro do tubo de liberação após 3 h foram substituídos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições, totalizando 25 parcelas. Para *A. fraterculus* o ensaio foi repetido duas vezes e os resultados expostos representam as médias dos dois ensaios.

2.2.1.6 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a adultos de *Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata*

Após estimativa da CL_{50} para adultos das duas espécies de moscas-das-frutas, foram instalados experimentos para avaliar o efeito dos extratos aquosos e dos extratos orgânicos em três solventes com ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol) das diferentes estruturas vegetais (folhas, ramos e amêndoas), além de uma formulação comercial de óleo de amêndoas de nim. Esses extratos e a formulação foram adicionados a um atrativo alimentar (solução de mel, a 20 %), compondo uma isca (nim + mel). A essa mistura foi adicionado também um corante conforme descrito no item 2.2.1.5. Os extratos orgânicos foram

diluídos inicialmente em acetona (5 % da solução para isca), uma vez que estes não diluem totalmente em água e em seguida foi acrescentada a mistura solução de mel, a 20 % e corante alimentício. Como controles foram utilizados: solução de mel a 20 %; solução de mel a 20 % e corante azul anis (0,125 %); e solução de mel a 20 %, corante azul anis (0,125 %) e acetona a 5 %. Para instalação dos experimentos, inicialmente foram individualizados cinco casais em tubos de vidro por um período de 12 h sem alimentação. Após esse período, foi instalado o bioensaio por meio da pulverização dos tratamentos sobre plantas de limão 'Cravo' em tubetes através de um mini-atomizador. Essas plantas foram individualizadas em gaiolas semelhantes à descrita no item 2.2.1.4 (Figura 2.1). Os insetos com abdome sem coloração azul (Figura 2.3) que estavam dentro do tubo de liberação após 3 h foram substituídos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 16 tratamentos e cinco repetições, totalizando 80 parcelas.

2.2.1.7 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para imaturos de *Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata*

Para estimativa da CL_{50} para imaturos das duas espécies de mosca-das-frutas foram instalados experimentos com extrato aquoso de amêndoas de nim em diferentes concentrações espaçadas em escala logarítmica. Para *A. fraterculus*, as concentrações utilizadas foram 3.200; 5.600; 10.000; 18.000 e 32.000 ppm e para *C. capitata*, 1.000; 3.200; 5.600; 10.000 e 18.000 ppm. Como controle, foi utilizada água deionizada. Para *A. fraterculus*, foram instalados experimentos utilizando potes plásticos com capacidade para 100 ml com tampas vedadas com tecido *voil*. Nesses potes foram colocados 100 g de areia esterilizada e em seguida aplicados, por meio de uma micropipeta, 10 ml dos tratamentos por pote. Para *C. capitata*, utilizaram-se caixas de acrílico (6 x 2,5 cm), as quais tiveram sua tampa perfurada num diâmetro de 5,5 cm e coberta com tecido *voil*. Nessas caixas foram colocadas 30 g de areia esterilizada e em seguida foram aplicados por meio de uma micropipeta 3 ml dos tratamentos por caixa. Para ambas as espécies, foram transferidas 20 larvas de 3º ínstar (pré-pupa) para os respectivos recipientes. Após a emergência e morte dos adultos, a areia foi peneirada e foi avaliada a viabilidade da fase imatura e realizada a sexagem dos insetos emergidos. A areia foi esterilizada em estufa a uma temperatura de cerca de 140º C por um período de 12 h. O delineamento experimental foi

inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 10 repetições, num total de 200 larvas por tratamento para cada espécie de mosca-das-frutas.

2.2.1.8 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a imaturos de *Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata*

Após estimativa da CL_{50} para os imaturos, foram instalados experimentos para avaliar o efeito dos extratos aquosos e dos extratos orgânicos em três solventes com ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol) das diferentes estruturas vegetais (folhas, ramos e amêndoas), além de um óleo de amêndoas de nim. Todos os tratamentos foram diluídos na concentração da CL_{50} obtida para o extrato aquoso de amêndoas de nim. Como tratamento controle foram utilizadas água deionizada e acetona a 5 %. Para o ensaio com *C. capitata*, os extratos foram diluídos e mantidos em repouso por 2 h antes da aplicação e para *A. fraterculus*, os extratos foram diluídos e mantidos em repouso por 6 h antes da aplicação. Em ambos os ensaios os extratos foram mantidos no escuro quando em repouso para evitar a degradação dos compostos inseticidas. O tempo de repouso foi feito com objetivo de permitir a evaporação da acetona, solvente utilizado para diluir os extratos orgânicos.

A metodologia de avaliação adotada foi idêntica à empregada no experimento para determinação da CL_{50} (item 2.2.1.7). Após a emergência e morte dos adultos, a areia foi peneirada e foi avaliada a viabilidade da fase imatura; os insetos que apresentavam forma de larva foram considerados mortos ainda nessa fase. Foi também realizada a sexagem dos adultos emergidos e a quantificação dos adultos defeituosos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 tratamentos e 10 repetições, sendo 200 larvas para cada tratamento e um total de 150 parcelas para *C. capitata* e 15 tratamentos com oito repetições, totalizando 120 parcelas para *A. fraterculus*.

2.2.1.9 Análise estatística

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à regressão probítica pelo programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2003) para estimativa da concentração letal 50 (CL_{50}), sendo também obtida a CL_{90} (dose necessária para provocar mortalidade em 90 % da população),

o coeficiente angular e o valor do qui-quadrado (χ^2). O valor do qui-quadrado (χ^2) calculado pelo programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2003) foi comparado ao valor do χ^2 pré-estabelecido em tabela. Quando o valor do χ^2 calculado foi igual ou menor do que o χ^2 tabelado, os dados do bioensaio foram considerados adequados ao modelo de probit.

Os resultados obtidos de longevidade de *C. capitata* na padronização do atrativo alimentar; de mortalidade de adultos de moscas-das-frutas com 3 h; dois; seis e 10 dias e de mortalidade por inanição no bioensaio com isca; os resultados de mortalidade de imaturos (larva, pupa e total) expostos ao tratamento com derivados do nim; de razão sexual e de adultos normais emergidos desses imaturos expostos ao tratamento foram analisados conforme a análise de variância pelo teste F e quando detectada diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias. Os resultados de mortalidade de adultos no 10º dia também foram submetidos à análise de variância pelo teste F utilizando esquema fatorial 2 x 15, sendo os fatores constituídos pelo sexo e pelos tratamentos.

Os testes de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) foram aplicados para avaliar as pressuposições de homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e a normalidade dos resíduos, respectivamente. Na ausência desses pressupostos, os dados foram transformados pelo Método Potência Ótima de Box-Cox (BOX; COX, 1964). Esse método de transformação depende diretamente de um parâmetro λ que é o coeficiente de transformação dos dados e indica o tipo de transformação necessária. Nesse estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa SAS de computação estatística (SAS INSTITUTE, 2003).

2.2.2 Resultados e discussão

2.2.2.1 Rendimento dos extratos aquosos e orgânicos de diferentes estruturas do nim

Os rendimentos obtidos para os extratos aquosos liofilizados de *A. indica* variaram de 33,57 a 51,97 %, sendo o maior rendimento registrado com as amêndoas, o menor com os ramos e o valor intermediário (43,12 %) com as folhas (Tabela 2.1).

Comparando-se esses resultados com os obtidos com outras meliáceas, constata-se superioridade dos extratos de nim. Assim, enquanto os extratos liofilizados de folhas de *Trichillia pallens* C.DC. e de *Trichillia pallida* Swartz renderam 12,24 e 2,84 % respectivamente (CUNHA, 2004), o extrato liofilizado de folhas de nim rendeu 43,12 %, ou seja, cerca 3 a 4 vezes a mais

que o rendimento da espécie de *Trichillia* com melhor performance. Em relação aos ramos, os rendimentos foram 4,91 e 1,43 % para *T. pallens* e *T. pallida*, respectivamente (CUNHA, 2004), enquanto nesse trabalho o valor obtido foi de 33,57 %.

Tabela 2.1 - Rendimento na obtenção de extratos aquosos de amêndoas, de folhas e de ramos de *Azadirachta indica*

Estrutura	Rendimento[1]	
	(g)	(%)
Amêndoas	51,97	51,97
Folhas	43,12	43,12
Ramos	33,57	33,57

[1] Obtido a partir de 100g de material vegetal moído

De maneira geral, foram obtidos maiores rendimentos com os extratos de amêndoas de nim com os três solventes do que de folhas e de ramos, com exceção apenas do extrato de folhas em metanol que foi superior a todos os extratos (Tabela 2.2).

Os rendimentos obtidos com extratos metanólicos de folhas e de ramos foram superiores aos dos respectivos extratos hexânicos e diclorometânicos (Tabela 2.2). Isso possivelmente ocorreu devido ao tipo de solvente utilizado (BEZERRA, 2009; ROCHA 2004), indicando maior presença de substâncias polares nessas partes da planta.

Bezerra (2009) obteve maior rendimento de extrato de folhas e de ramos em solvente diclorometano (5,35 e 1,60 %) quando comparado com os resultados obtidos nesse trabalho (folhas em diclorometano, 2,53 % e ramos em diclorometano, 0,43 %). Possivelmente, a menor rentabilidade seja devido à submissão inicial da amostra ao solvente hexano (o qual extraiu substâncias apolares), diferentemente do que foi feito pela autora que iniciou a extração com o solvente diclorometano, podendo ter extraído substâncias apolares e polares, uma vez que esse solvente tem polaridade intermediária.

As diferenças de rendimento não significam, necessariamente, que haverá maior facilidade de obtenção de substância com atividade inseticida, no entanto, é importante destacar que em caso de os extratos apresentarem uma mesma eficiência para o controle do inseto, o rendimento seria um fator adicional para seleção do extrato vegetal.

Tabela 2.2 - Rendimento na obtenção de extratos em solvente hexano, em diclorometano e em metanol de amêndoas, de folhas e de ramos de *Azadirachta indica*

Estrutura	Extrato	Rendimento	
		(g)	(%)
Amêndoas[1]	Hexano	48,07	12,02
	Diclorometano	14,00	3,50
	Metanol	32,61	8,15
Folhas[2]	Hexano	10,88	3,06
	Diclorometano	9,00	2,53
	Metanol	58,32	16,43
Ramos[3]	Hexano	3,94	1,31
	Diclorometano	0,65	0,43
	Metanol	19,74	6,58

[1] Obtido a partir de 400g de material vegetal moído (média de três extrações)
[2] Obtido a partir de 355g de material vegetal moído (média de três extrações)
[3] Obtido a partir de 300g de material vegetal moído (média de três extrações)

2.2.2.2 Determinação da azadiractina nos derivados do nim

De maneira geral, os extratos constituídos de amêndoas de nim apresentaram um conteúdo de azadiractina bastante superior ao de outras estruturas, independentemente do solvente utilizado (Tabela 2.3). O extrato de amêndoas em metanol foi o que apresentou a maior quantidade (6.060 mg de azadiractina/kg de extrato), seguindo-se o extrato em diclorometano (3.595,50 mg de azadiractina/kg de extrato), o extrato aquoso (2.445,90 mg de azadiractina/kg de extrato) e o extrato em hexano (342,20 mg de azadiractina/kg de extrato) dessa mesma estrutura vegetal. Por outro lado, o conteúdo de azadiractina no óleo de amêndoas (467 mg/Kg) foi muito inferior aos encontrados nos extratos de amêndoas com solventes de maior polaridade (água, metanol e diclorometano), sendo comparáveis com os valores obtidos com solvente apolar, o hexano (342,20 mg/Kg) (Tabela 2.3).

Os valores de azadiractina obtidos nos ramos e nas folhas foram bastante reduzidos, variando de 0,40 a 0,80 mg/kg e de 0,30 a 0,60 mg/kg, respectivamente (Tabela 2.3).

Sundaram (1996) encontrou 0,03 % de azadiractina nas sementes, resultado inferior ao obtido nesse trabalho no qual os valores registrados para os extratos de amêndoas foram 0,25 % em extrato aquoso; 0,61 % em extrato metanólico; 0,36 % em extrato diclorometânico, 0,034 % em extrato hexânico e 0,047 % em óleo de amêndoas (Tabela 2.3). A quantidade de azadiractina presente em sementes de nim pode variar consideravelmente devido a fatores ambientais e, possivelmente, também devido a fatores genéticos (SCHUMUTTERER, 1990). A extração da azadiractina é extremamente variável; segundo Butterworth e Morgan (1968, 1971), no primeiro isolamento o teor de azadiractina foi de 0,075 % do peso das sementes. Uebel, Warthen e Jacobson (1979) obtiveram um rendimento de 0,018 %; Yamasaki et al. (1986) de 0,056% e Schroeder e Nakanishi (1987) de 0,15 %. De acordo com Mordue (Luntz), Morgan e Nisbet (2005), o teor de azadiractina varia entre 0,1 e 1,0 % do peso das amêndoas da semente, com média de 0,6 %.

Tabela 2.3 - Teor de azadiractina em extratos orgânicos, aquosos e óleo de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*

Estruturas	Extrato (mg/kg)				Óleo
	Água	Metanol	Diclorometano	Hexano	(mg/kg)
Amêndoas	2.445,90	6.060,00	3.595,50	342,20	467,00
Folhas	0,40	0,60	-[1]	0,80	-
Ramos	0,30	0,60	-[1]	0,50	-

[1]Não detectado

Martinez (2002) relata que a azadiractina se concentra principalmente nos frutos, porém, quantidades menores também podem ser encontradas nas demais partes da planta. Nas folhas, Sundaram (1996) registrou 0,9 x 10^{-3} % de azadiractina, resultado superior ao encontrado no presente trabalho, que foi de 4 x 10^{-5} % em extrato aquoso, 6 x 10^{-5} % em extrato metanólico, 8 x 10^{-5} % em extrato hexânico (Tabela 2.3). Forim 2006 identificou azadiractina em diferentes estruturas da planta de nim, exceto em folhas. O autor infere que a azadiractina realmente não está presente nessa parte da planta ou, se presente, em quantidades ínfimas, conforme ocorreu no presente trabalho. Assim, a eficácia de extratos de folhas em ensaios biológicos, indica que, não

somente a azadiractina, mas também outros limonóides presentes nessa parte da planta apresentam bioatividade sobre insetos.

Para os ramos, Sundaram (1996) registrou 0,2 x 10^{-3} % de azadiractina, resultado superior aos registrados nesse trabalho (3 x 10^{-5} % em extrato aquoso, 6 x 10^{-5} % em extrato metanólico, 5 x 10^{-5} % em extrato hexânico de ramos).

2.2.2.3 Padronização de um atrativo alimentar para os bioensaios com adultos de moscas-das-frutas

Nas plantas de limão 'Cravo' pulverizadas apenas com água (controle), os adultos de *C. capitata* sobreviveram cerca de dois dias, enquanto que utilizando o Biofruit®, a 5 %, concentração recomendada para controle de moscas-das-frutas no campo quando associado a um inseticida, a longevidade foi de 2,39 dias, não diferindo do controle (Tabela 2.4). Aumentando-se a concentração do Biofruit® (até 20 %), o maior período de sobrevivência foi cerca de quatro dias, justamente na maior concentração, o que tornou inviável a utilização exclusiva desse atrativo (Biofruit®) nos ensaios com extratos vegetais, pois sua aplicação resultaria em baixa sobrevivência das moscas no tratamento controle conforme metodologia adotada (itens 2.2.1.5 e 2.2.1.6).

A combinação mel e Biofruit® propiciou uma longevidade de cerca de sete dias nas maiores concentrações (7,5 % de mel e 7,5 % de Biofruit®; 10 % de mel e 10 % de Biofruit®), diferindo do controle mesmo na menor concentração (2,5 % de mel e 2,5 % de Biofruit®). O atrativo e estimulante alimentar que propiciou maior longevidade aos insetos foi o mel, a qual variou de 6,37 a 9,84 dias nas concentrações de 5 a 20 %. Na maior concentração de mel (20 %), a longevidade constatada foi significativamente maior que os valores obtidos em todos os demais tratamentos e no controle, com exceção do mel a 15 % (Tabela 2.4), o que permitiu selecionar esse atrativo como o mais indicado para os estudos subseqüentes, considerando, no entanto, que o período de avaliação dos extratos vegetais pulverizados em associação com esse atrativo não pode exceder o período de 10 dias, conforme longevidade registrada nesse experimento.

Tabela 2.4 - Longevidade de adultos de *Ceratitis capitata* tratados com mel e Biofruit® em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Atrativo	Concentração (%)	Longevidade média (dias) (± EP)[1,2]
Mel	20	9,84 ± 0,53 a
	15	8,90 ± 0,50 ab
	10	7,10 ± 0,27 bc
	5	6,37 ± 0,47 cd
Biofruit®	20	3,92 ± 0,28 e
	15	3,70 ± 0,31 ef
	10	2,77 ± 0,17 fg
	5	2,39 ± 0,09 gh
Mel + Biofruit®	(10:10)	6,86 ± 0,45 bc
	(7,5:7,5)	7,15 ± 0,49 bc
	(5:5)	4,88 ± 0,34 de
	(2,5:2,5)	4,24 ± 0,14 e
Controle (água deionizada)	-	1,95 ± 0,08 h
Coeficiente de variação - CV (%)		8,67

[1]Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)
[2] Dados originais na tabela; para análise estatística os dados foram transformados pelo Método da Potência Ótima de Box-Cox com $\lambda = \log_{10}(X + 0,5)$

2.2.2.4 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

As duas espécies em estudo foram afetadas pelo extrato aquoso de amêndoas de nim pulverizado sobre plantas de citros associado a um atraente e estimulante alimentar (mel a 20 %). Assim, observando-se os valores de mortalidade dos adultos, após 10 dias de avaliações (Figura 2.2), verifica-se que para as duas espécies a mortalidade foi incrementada em função do aumento da concentração do extrato. Para a mosca-sul-americana, *A. fraterculus*, a mortalidade variou de 52 % (320 ppm – 0,032 % de extrato) a 80 % na maior concentração (32.000 ppm – 3,2 % de extrato). Já para a moscamed, *C. capitata*, a mortalidade variou de 56 % (320 ppm) a 88 % (32.000 ppm).

Paralelamente, também no controle, registrou-se mortalidade relativamente alta para ambas as espécies, *A. fraterculus* (38 %) e *C. capitata* (30 %). A mortalidade natural relativamente alta no controle pode ter sido provocada pela manipulação dos insetos no momento da instalação do experimento, ou pelo fato de o atrativo (solução de mel a 20 %) não propiciar a longevidade esperada (10 dias) ou mesmo em conseqüência da padronização do atrativo alimentar ter sido realizada somente para a moscamed e não para a mosca sul-americana.

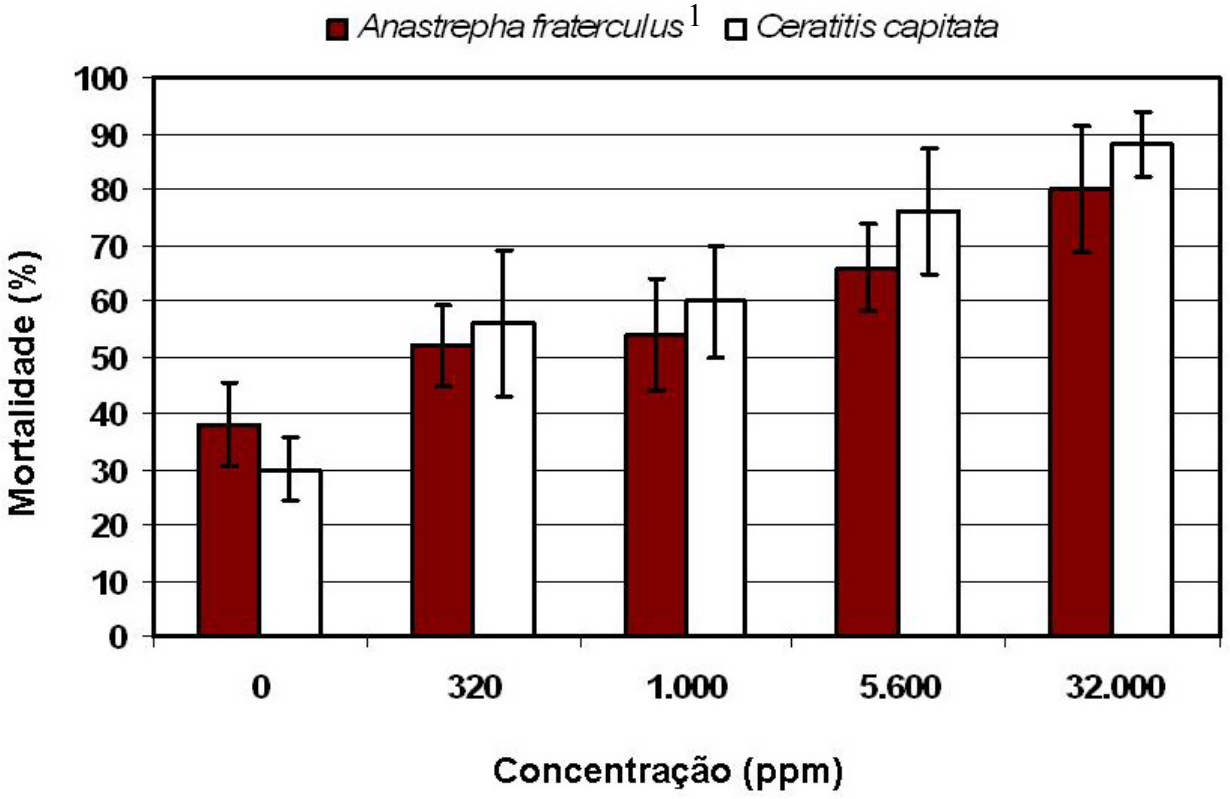


Figura 2.2 - Mortalidade (%) de adultos de moscas-das-frutas expostos ao extrato aquoso de amêndoas de nim + mel em diferentes concentrações em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h). Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 320 ppm do extrato (0,78 ppm de aza); 1.000 ppm do extrato (2,45 ppm de aza); 5.600 ppm do extrato (13,70 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (78,27 ppm de aza). [1] Resultado médios de dois experimentos

Em ambas as espécies, a ação tóxica do extrato aquoso de amêndoas de nim foi bastante lenta, sendo que no oitavo dia de avaliação apenas as duas concentrações superiores (5.600 e 32.000 ppm) tinham causado mortalidade de cerca de 50 % dos insetos avaliados, aumentando bastante a mortalidade nos dois últimos dias do período avaliado.

Os valores de qui-quadrado (χ^2) calculado na estimativa da toxicidade para *A. fraterculus* (0,89) e *C. capitata* (0,88) estiveram dentro dos limites pré-estabelecidos, ou seja, foram inferiores ao valor de χ^2 tabelado (9,488) para ambas espécies (Tabela 2.5). Sendo assim, os dados analisados adequaram-se ao modelo de probit (ROBERTSON; PREISLER, 1992). A CL_{50} estimada para adultos de *A. fraterculus* tratados com isca (mel + extrato de amêndoas de nim) em mudas de citros em um período de 10 dias foi de 7.522 ppm (0,75 %). Já para *C. capitata*, a CL_{50} foi bem menor (1.368 ppm), o que representa cerca de 0,14 % de extrato na solução pulverizada (Tabela 2.5). De forma geral, as CL_{50} obtidas indicam que é necessário pouco volume de extrato para causar mortalidade nas duas espécies. Entretanto, numa análise mais detalhada, percebe-se que os dados não apresentam o mesmo padrão, exigindo grande quantidade de extrato para causar alta mortalidade da praga. Observando-se a Tabela 2.5, registra-se uma CL_{90} de 643.674 ppm (64,37 % de extrato na isca) para *A. fraterculus* e 112.465 ppm (11,25 %) para *C. capitata*.

Tabela 2.5 - Estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim em relação a adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

Espécie	[1]n	[2]χ^2	[3]g.l.	[4]CA ± EP	[5]CL (95% IC) ppm		Azadiractina (ppm)
Anastrepha fraterculus	250	0,89	4	0,66 ± 0,25	CL_{50}	7.522 (439,83 – 45.148)	18,40
					CL_{90}	643.674 (81.470 – 75.067.801)	1574,39
Ceratitis capitata	250	0,88	4	0,67 ± 0,18	CL_{50}	1.368 (173,22 – 4.133)	3,35
					CL_{90}	112.465 (26.391 - 6.217.178)	275,08

[1]n: número de insetos testados; [2]χ^2: Valor do qui-quadrado calculado; [3]g.l.: graus de liberdade; [4]CA: Coeficiente angular; [5]CL: Concentração letal e seu intervalo de confiança (IC)

Embora nos dois casos os valores registrados sejam relativamente altos, há mais perspectivas de aplicação no caso da moscamed. Em ambos os casos, os valores de CL_{90} obtidos são bastante elevados e quando se avalia o intervalo de confiança as perspectivas são desanimadoras. Essa alta concentração de extrato de amêndoas de nim exigida para causar

mortalidade em cerca de 90 % dos insetos inviabiliza sua aplicação em isca, pois possivelmente o extrato causaria efeito fagodeterrente e não tóxico como é o objetivo.

A suscepetibilidade aos subprodutos do nim, com ênfase para o princípio ativo azadiractina, varia entre as ordens de insetos (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000) e também pode variar entre espécies de uma mesma família (ISMAN, 1993). No presente trabalho, com base nas CL_{50} registradas para as duas espécies, pode-se inferir que a isca à base de nim foi cerca de cinco vezes mais tóxica à moscamed do que à mosca-sul-americana. Poucos estudos abordam o efeito tóxico do nim sobre insetos adultos; muitas vezes o efeito tóxico é baseado na regulação do crescimento ou na fagodeterrência, ambos, culminando com a morte do inseto. Nesse sentido, Senthil Nathan et al. (2007) avaliaram o efeito tóxico de extratos de nim e da azadiractina pura em relação à cigarrinha *Nilaparvata lugens* (Stal) no quarto ínstar em condições de laboratório. Os autores estimaram valores de CL_{50} variando de 40.000 a 50.000 ppm para os extratos aquoso, etanólico e hexânico, todos oriundos de amêndoas de nim. Para azadiractina pura o valor estimado foi de 0,5 ppm. Os valores de CL_{50} estimados com o extrato aquoso de amêndoas para as moscas-das-frutas (Tabela 2.5) são inferiores ao demonstrado por Senthil Nathan et al. (2007), tanto utilizando extrato aquoso como orgânico. Entretanto, quando se analisa a CL_{90}, os dados apresentados no presente trabalho são superiores aos demonstrados por Senthil Nathan et al. (2007). A CL_{90} estimada por esses autores variou de 70.000 a 80.000 ppm para os extratos, enquanto para a azadiractina pura a CL_{90} foi de apenas 1 ppm. Posteriormente, Senthil Nathan et al. (2009) avaliaram o efeito tóxico de dois óleos de nim (NEEMA® e PARKER OIL™) sobre a cigarrinha *N. lugens* em condições de campo. Os autores estimaram uma CL_{50} de 5.600 ppm (14 ppm de azadiractina) e 4.400 ppm (8,8 ppm de azadiractina) para adultos quando plantas de arroz foram pulverizadas com NEEMA® e PARKER OIL™, respectivamente. Os dados de estimativa de CL_{50} para adultos estão relativamente próximos dos estimados para os tefritideos, onde a CL_{50} foi de 7.522 ppm de extrato (18,40 ppm de azadiractina) para a *A. fraterculus* e 1.368 ppm de extrato (3,35 ppm de azadiractina) para *C. capitata*. Entretanto, quando comparadas as CL_{90}, os resultados estimados para tefritideos são muito elevados, conforme demonstrado na Tabela 2.5.

2.2.2.5 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a adultos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

A mortalidade dos adultos de *A. fraterculus* expostos à isca, composta de diferentes extratos e de óleo de nim, não diferiu entre os tratamentos após 3 h (Tabela 2.6). Os derivados do nim não causam efeito de choque sobre essa espécie, assim como já foi demonstrado para outras pragas. Isso também foi constatado, após 48 h, embora possa ser verificada uma tendência de maior mortalidade com o uso do extrato de amêndoas em metanol e do óleo obtido de amêndoas que causaram mortalidades de 16 e 12 %, respectivamente. Também após seis dias, embora os valores de mortalidade tenham variado entre 4 e 20 %, não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos avaliados. A ausência do efeito dos subprodutos do nim, após seis dias, pode ser caracterizada quando se compara o maior valor numérico de mortalidade (20 % no tratamento com óleo de amêndoas) com o controle (16 %) (Tabela 2.6). Somente no décimo dia de avaliação ocorreu diferença significativa entre os tratamentos (F = 2,86; p = 0,0018), verificando-se que as maiores mortalidades foram causadas pelo extrato aquoso de amêndoas (68 %) e pelo óleo obtido da prensagem de amêndoas (64 %) que superaram a mortalidade causada pelo extrato hexânico de ramos (16 %); o primeiro (68 % de mortalidade), também diferiu dos controles (somente mel e mel + corante + acetona), no entanto, não diferiu do controle (mel + corante). Os outros derivados do nim não diferiram dos controles, nos quais as mortalidades variaram entre 20 e 28 %.

De modo análogo, ao que foi observado para a mosca-sul-americana, também para a moscamed não foi registrado efeito tóxico dos extratos e do óleo de nim nas avaliações feitas com 3 h, dois e seis dias, uma vez que não houve diferença significativa entre as médias em nenhum desses períodos (Tabela 2.7). Após 10 dias, no entanto, os valores de mortalidade provocada pelos diversos tratamentos e pelo controle diferiram entre si (F = 5,11; p < 0,0001) (Tabela 2.7). Assim, nos tratamentos com extrato metanólico de folhas, extrato aquoso de amêndoas e extrato diclorometânico de ramos a mortalidade ocasionada foi igual ou superior a 60 % dos insetos (62; 60 e 60 %, respectivamente). Os três extratos apresentaram diferença significativa em relação ao controle (mel + corante + acetona), onde ocorreu 14 % de mortalidade, mas não diferiu dos outros dois controles (somente mel e mel + corante), nos quais a mortalidade foi 28 %.

Tabela 2.6 - Mortalidade (± EP) de adultos de *Anastrepha fraterculus* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		Azadiractina (ppm)	Nº de insetos	Mortalidade (%)				
				3 horas	2º dia	6º dia	10º dia[1]	
Controle (mel)		-	50	0,00 ± 0,00	6,00 ± 4,00	16,00 ± 5,10	22,00 ± 6,63	bc
Controle (mel + corante)		-	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	12,00 ± 3,74	28,00 ± 3,74	abc
Controle (mel + corante + acetona)		-	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 4,00	6,00 ± 4,00	20,00 ± 11,40	bc
Amêndoas	Água	18,3981	50	0,00 ± 0,00	8,00 ± 2,00	14,00 ± 5,10	68,00 ± 15,94	a
	Metanol	45,5833	50	4,00 ± 4,00	16,00 ± 5,10	18,00 ± 5,83	28,00 ± 6,63	abc
	Diclorometano	27,0454	50	0,00 ± 0,00	6,00 ± 4,00	12,00 ± 3,74	34,00 ± 14,00	abc
	Hexano	2,5740	50	2,00 ± 2,00	4,00 ± 2,45	4,00 ± 2,45	22,00 ± 12,81	bc
Ramos	Água	0,0023	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,45	16,00 ± 2,45	30,00 ± 8,94	abc
	Metanol	0,0045	50	2,00 ± 2,00	6,00 ± 2,45	6,00 ± 2,45	26,00 ± 13,64	abc
	Diclorometano	-	50	4,00 ± 2,45	8,00 ± 3,74	16,00 ± 6,78	38,00 ± 12,41	abc
	Hexano	0,0038	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 4,00	6,00 ± 4,00	16,00 ± 9,27	c
Folhas	Água	0,0030	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,45	14,00 ± 2,45	26,00 ± 7,48	abc
	Metanol	0,0045	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,45	12,00 ± 3,74	28,00 ± 10,68	abc
	Diclorometano	-	50	0,00 ± 0,00	6,00 ± 4,00	12,00 ± 3,74	34,00 ± 14,00	abc
	Hexano	0,0060	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	12,00 ± 4,90	30,00 ± 15,81	abc
Óleo de amêndoas		3,5128	50	2,00 ± 2,00	12,00 ± 4,90	20,00 ± 8,37	64,00 ± 13,64	ab
F (tratamentos)				$1,00^{NS}$	$1,23^{NS}$	$1,03^{NS}$	2,86**	
Coeficiente de variação - CV (%)				29,97	46,72	32,01	34,49	

^{NS} Não significativo. ** Significativo

[1] Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Tabela 2.7 - Mortalidade (± EP) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		Azadiractina (ppm)	Nº de insetos	Mortalidade (%)				
				3 horas[1]	2º dia	6º dia	10º dia[2]	
Controle (mel)		-	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 4,00	8,00 ± 5,80	28,00 ± 10,70	abc
Controle (mel + corante)		-	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,40	16,00 ± 2,40	28,00 ± 5,80	abc
Controle (mel + corante + acetona)		-	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	6,00 ± 4,00	14,00 ± 5,10	c
Amêndoas	Água	3,3460	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,40	4,20 ± 2,40	60,00 ± 14,80	a
	Metanol	8,2901	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	10,00 ± 5,50	42,00 ± 17,10	abc
	Diclorometano	4,9186	50	0,00 ± 0,00	10,00 ± 6,30	14,00 ± 5,10	22,00 ± 5,80	bc
	Hexano	0,4681	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	10,00 ± 4,50	18,00 ± 3,70	bc
Ramos	Água	0,0004	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	6,00 ± 6,00	42,00 ± 15,30	abc
	Metanol	0,0008	50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,00 ± 4,00	18,00 ± 4,90	bc
	Diclorometano	-	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	10,00 ± 4,50	60,00 ± 14,10	a
	Hexano	0,0007	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,40	10,00 ± 6,30	48,00 ± 8,60	ab
Folhas	Água	0,0005	50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,40	32,00 ± 8,60	abc
	Metanol	0,0008	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	4,00 ± 2,40	62,00 ± 18,30	a
	Diclorometano	-	50	0,00 ± 0,00	4,00 ± 2,40	14,00 ± 6,80	42,00 ± 9,70	abc
	Hexano	0,0011	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	6,00 ± 4,00	46,00 ± 7,50	ab
Óleo de amêndoas		0,6389	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00	14,00 ± 7,50	36,00 ± 7,50	abc
F (tratamentos)				-	0,76 ^{NS}	0,68^{NS}	5,11**	
Coeficiente de variação - CV (%)				-	21,22	4,89	22,31	

[1] Não foi analisado estatisticamente (não houve mortalidade); ^{NS} Não significativo; ** Significativo

[2] Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Em relação a *A. fraterculus*, o óleo de amêndoas na isca provocou 64 % de mortalidade; diferentemente, para *C. capitata* esse tratamento causou apenas 36 % de mortalidade, não diferindo dos controles.

Para nenhuma das espécies foi possível estabelecer uma correlação entre o teor de azadiractina e o efeito tóxico do derivado de nim. Entre os derivados com maior quantidade de azadiractina, ou seja, os originários de amêndoas, o extrato aquoso, com 3,3460 ppm de azadiractina em 1.368 ppm de extrato pulverizado em plantas de citros para controle de *C. capitata* e 18,3981 ppm de azadiractina em 7.522 ppm de extrato pulverizado para controle de *A. fraterculus*, causou mortalidade entre 60 e 70 % para ambas espécies (Tabelas 2.6 e 2.7). Os demais, como o extrato metanólico de amêndoas, o qual entre os derivados possui maior quantidade desse princípio ativo, causou baixa mortalidade (Tabelas 2.6 e 2.7). A mortalidade de cerca de 60 % causada pelo extrato metanólico de folhas e pelo extrato diclorometânico de ramos em *C. capitata*, induz ao raciocínio de que azadiractina não é o principal agente tóxico, mas provavelmente, uma multiplicidade de compostos presentes nessas duas estruturas da planta.

Quando os indivíduos foram agrupados por sexo, na avaliação feita ao décimo dia (Tabela 2.8), verificou-se que para *A. fraterculus* não houve efeito da interação (tratamento x sexo) (F = 0,43; p = 0,9677), não houve efeito em relação ao sexo isoladamente (F = 0,21; p = 0,6469), sendo constatado efeito somente para os tratamentos isoladamente (F = 2,12; p = 0,0127), conforme já havia sido demonstrado (Tabela 2.6).

Da mesma forma, para *C. capitata*, não houve efeito da interação (tratamento x sexo) (F = 1,07; p = 0,3914), e também em relação ao sexo (F = 0,09; p = 0,7686), sendo constatado efeito somente quando foi avaliado o tratamento isoladamente (F = 2,98; p = 0,0004) (Tabela 2.8).

De forma geral, a toxicidade dos extratos e do óleo de nim via ingestão das moscas foi bastante lenta (Tabelas 2.6 e 2.7) e independente do sexo (Tabela 2.8). Houve constatação de diferenças na mortalidade somente após 10 dias de avaliação, quando também a mortalidade natural foi elevada (Tabelas 2.6 e 2.7). Os resultados obtidos com a avaliação dos derivados de *A. indica* em relação às moscas-das-frutas (*A. fraterculus* e *C. capitata*) corroboram o discurso de Isman (2004), que afirma que o entusiasmo em relação ao nim vem diminuindo gradativamente, parte disso devido a sua ação relativamente lenta em insetos-praga.

Tabela 2.8 - Mortalidade (± EP) em função do sexo de adultos de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		Nº de insetos	Mortalidade (%) ± EP			
			Anastrepha fraterculus		*Ceratitis capitata*	
			♂	♀	♂	♀
Controle (mel)		50	16,00 ± 5,10	6,00 ± 2,45	14,00 ± 9,27	14,00 ± 5,10
Controle (mel + corante)		50	10,00 ± 0,00	18,00 ± 3,74	10,00 ± 3,16	18,00 ± 3,74
Controle (mel + corante + acetona)		50	6,00 ± 4,00	14,00 ± 7,48	8,00 ± 3,74	6,00 ± 6,00
Amêndoas	Água	50	30,00 ± 8,37	38,00 ± 8,00	34,00 ± 9,27	26,00 ± 6,00
	Metanol	50	14,00 ± 6,78	14,00 ± 5,10	22,00 ± 11,58	20,00 ± 7,07
	Diclorometano	50	14,00 ± 5,10	20,00 ± 10,49	8,00 ± 3,74	14,00 ± 5,10
	Hexano	50	12,00 ± 7,35	10,00 ± 5,48	8,00 ± 2,00	10,00 ± 3,16
Ramos	Água	50	18,00 ± 4,90	12,00 ± 4,90	24,00 ± 8,72	18,00 ± 8,00
	Metanol	50	16,00 ± 6,78	10,00 ± 7,75	6,00 ± 2,45	12,00 ± 3,74
	Diclorometano	50	20,00 ± 8,94	18,00± 4,90	34,00 ± 10,30	26,00 ± 5,10
	Hexano	50	12,00 ± 7,35	4,00 ± 2,45	28,00 ± 5,83	20,00 ± 7,07
Folhas	Água	50	14,00 ± 4,00	12,00 ± 4,90	16,00 ± 6,00	16,00 ± 4,00
	Metanol	50	14,00 ± 6,78	14,00 ± 5,10	34,00 ± 9,27	28,00 ± 10,20
	Diclorometano	50	26,00 ± 7,48	26,00 ± 8,12	30,00 ± 7,07	36,00 ± 5,10
	Hexano	50	14,00 ± 7,48	16,00 ± 8,72	38,00 ± 7,35	8,00 ± 3,74
Óleo de amêndoas		50	34,00 ± 6,78	30,00 ± 8,37	12,00 ± 7,35	24,00 ± 5,10
F(tratamento)			2,12**		2,98 **	
F (sexo)			$0,21^{NS}$		$0,09^{NS}$	
F (tratamento x sexo)			$0,43^{NS}$		$1,07^{NS}$	
Coeficiente de variação - CV (%)			27,81		33,83	

^{NS} Não significativo; ** Significativo

A ação lenta dos compostos presentes no nim em relação às moscas-das-frutas poderia ser em função da fagodeterrência provocada pelos limonóides, entre os quais se incluem a azadiractina e compostos a ela relacionados.

Nesse estudo, a tomada de alimento não foi impedida, logo, os extratos e o óleo de nim não causaram deterrência alimentar e, consequentemente, morte por inanição (Tabela 2.9). A segurança nessa observação é baseada na utilização do corante (azul anis), que possibilitou avaliar se as moscas morreram devido ao efeito tóxico da isca ou por inanição (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Parcela experimental (A); Moscas-das-frutas com abdome azul após alimentação da isca com corante azul anis (B)

Nos tratamentos controles em que foi utilizado o corante não houve mortalidade por inanição, porém, nos tratamentos com derivados do nim registraram-se moscas mortas sem se alimentarem da isca (Tabela 2.9). Contudo, para ambas as espécies em estudo, não foi verificado efeito significativo dos tratamentos, *A. fraterculus* (F = 2,28; p = 0,0117) e *C. capitata* (F = 0,53; p = 0,9120).

Tabela 2.9 - Mortalidade (± EP) por inanição de adultos de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostos à isca (mel + derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*) em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		Nº de insetos	Mortalidade por inanição (%)	
			Anastrepha fraterculus	*Ceratitis*
Controle (mel)		50	-	-
Controle (mel + corante)		50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Controle (mel + corante + acetona)		50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Amêndoas	Água	50	6,00 ± 2,45	2,00 ± 2,00
	Metanol	50	10,00 ± 4,47	0,00 ± 0,00
	Diclorometano	50	2,00 ± 2,00	2,00 ± 2,00
	Hexano	50	4,00 ± 2,45	2,00 ± 2,00
Ramos	Água	50	0,00 ± 0,00	2,00 ± 2,00
	Metanol	50	6,00 ± 2,45	0,00 ± 0,00
	Diclorometano	50	4,00 ± 2,45	0,00 ± 0,00
	Hexano	50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Folhas	Água	50	0,00 ± 0,000	2,00 ± 2,00
	Metanol	50	4,00 ± 2,45	2,00 ± 2,00
	Diclorometano	50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Hexano	50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Óleo de amêndoas		50	6,00 ± 4,00	2,00 ± 2,00
F (tratamentos)			2,28 ^{NS}	0,53 ^{NS}
Coeficiente de variação - CV (%)			37,04	28,74

^{NS} Não significativo

Notou-se maior incidência de inanição nos derivados à base de amêndoas de nim (extrato e óleo) para *A. fraterculus*. O tratamento que provocou efeito mais pronunciado foi o extrato metanólico de amêndoas (Tabela 2.9), no qual, 10 % dos adultos de *Anastrepha* (cinco espécimes) morreram por inanição. O total de mortalidade, incluindo os que morreram por

inanição, foi de 28 % (14 insetos) nesse tratamento (Tabela 2.6) e os insetos que morreram sem se alimentar da isca representaram 35,71 % (cinco insetos) do total de insetos mortos (14). Conforme comentado anteriormente, no entanto, apesar da incidência de mortalidade por inanição, a diferença entre as médias não foi significativa, do que se pode inferir que o efeito deterrente alimentar foi desprezível.

Diversas hipóteses podem explicar as diferenças entre os tratamentos e o baixo efeito tóxico provocado pelos subprodutos de *A. indica* em relação às moscas-das-frutas. Numa primeira análise o baixo efeito tóxico por ingestão seria causado por diferenças na quantidade de substrato ingerido pelas moscas. Assim, embora o nim não tenha provocado deterrência de alimentação (conforme visto na Tabela 2.9), ele pode ter provocado inibição desta.

Os fagodeterrentes podem ser divididos em dois grupos: deterrentes de alimentação e inibidores de alimentação (SMITH, 2005). Em princípio, os deterrentes incluiriam substâncias que impedem a tomada de alimento, enquanto os inibidores compreenderiam substâncias que reduzem a alimentação sem, contudo, impedi-la (VENDRAMIM; GUZZO, 2009). O corante (azul anis) permite qualificar as moscas que se alimentaram da isca (Figura 2.3), porém não permite identificar a quantidade consumida. A inibição primária provocada pela azadiractina talvez justifique a baixa mortalidade ocasionada nas duas espécies quando expostas à isca com extrato metanólico, cuja concentração de azadiractina era superior entre todos os derivados, levando os insetos a se alimentarem menos da isca, reduzindo, consequentemente, a possibilidade de efeito tóxico. A azadiractina pode induzir mudanças no intestino do inseto, inclusive no agrupamento das microvilosidades, desorganização das camadas de membrana extracelular e alterações na porção basal das células epiteliais, as quais podem induzir a redução da alimentação.

Em *Myzus persicae* Sulzer, a alimentação em plantas de tabaco tratadas com 500 ppm de azadiractina se iniciou normalmente, e posteriormente o intervalo entre as tomadas de alimento aumentou significativamente (NISBET et al., 1993). Da mesma forma, isso pode ter ocorrido nesse trabalho; em primeira instância as moscas poderiam ter se alimentado dos derivados do nim e posteriormente teriam reduzido a frequência de alimentação, ao mesmo tempo em que os compostos químicos com atividade inseticida foram se degradando, já que o experimento foi mantido por 10 dias.

O comportamento alimentar das moscas também pode influenciar a suscetibilidade aos extratos e ao óleo de amêndoas de nim. Durante a alimentação, as moscas-das-frutas possuem um comportamento denominado *grazing* ("pastagem") (HENDRICHS; COOLEY; PROKOPY, 1992), que permite ao inseto selecionar o alimento para ingestão. Nesse experimento, os insetos podem ter ingerido alimento com menor concentração dos derivados do nim, e assim, em conseqüência do comportamento de "pastagem" as moscas podem ter experimentado porções da isca sobre a superfície explorada, e selecionado o alimento para a sua sobrevivência.

Além disso, sempre que ocorreu ingestão houve contato com os extratos aquosos, orgânicos ou óleo de amêndoas de nim. O grau de contato pode ter influenciado a toxicidade, assim como a região do corpo que entrou em contato. Em trabalho realizado com inseticidas, Roessler (1989) demonstrou que a espécie de moscas-das-frutas, o inseticida e o local do corpo onde foi aplicado influenciam na determinação da CL_{50}. Por exemplo, o tórax foi a região mais sensível do corpo de *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet) e *Bactrocera dorsalis* (Hendel), enquanto que, em *C. capitata*, a região mais sensível foi a abdominal médio-ventral.

A atividade diária dos adultos também pode influenciar no contato com os extratos ou óleo de amêndoas. As moscas das duas espécies foram vistas descansando na parte inferior da folha de limão 'Cravo'. Além disso, em ambas as espécies, houve formação de *leks* (agregados) seguido de cópula. Os *leks* foram formados com machos em comportamento de chamada localizados na face inferior das folhas de limão 'Cravo' ou nas paredes da gaiola. Os insetos foram vistos copulando na planta e também em diferentes partes da gaiola. Outra observação interessante foi a presença dos adultos de moscas-das-frutas na planta pulverizada descansado durante a noite. As moscas-das-frutas possuem o hábito de se limparem e o contato seguido de limpeza pode levar à ingestão da isca. Diferenças determinadas pela maior ou menor exposição de certas regiões corporais provavelmente poderiam estar influenciando na toxicidade, mas provavelmente não seriam o principal fator ou o único fator que contribuiria para explicar as diferenças observadas entre os extratos no décimo dia e ou efeito lento dos derivados do nim.

Os limonóides, principalmente a azadiractina, podem atuar por ingestão ou por contato, porém sua ação por ingestão é significativamente superior (MARTINEZ, 2002). Para exemplificar, Viana et al. (2000), pulverizando extrato de folhas de nim diretamente sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), verificaram 32,2 % de mortalidade após 10 dias, ao passo que quando as lagartas se alimentaram de folhas de milho pulverizadas com o extrato, a

mortalidade atingiu 87,3 %. Nesse contexto, provavelmente, no presente trabalho, as moscas tenham sido mais afetadas pela ingestão dos subprodutos do nim do que pelo contato com os mesmos.

Como discutido, o efeito tóxico do nim sobre moscas-das-frutas é reduzido e também lento, contudo, isso não inviabiliza a utilização dessa planta inseticida, pois os efeitos subletais (como por exemplo, a esterilização) podem também propiciar a proteção do pomar, sendo que investigações nesse sentido devem ser realizadas.

2.2.2.6 Estimativa da CL_{50} de extrato aquoso de amêndoas de nim para imaturos de *Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata*

Considerando a fase de larva-pupa das moscas-das-frutas, constatou-se, de forma semelhante ao verificado aos adultos expostos à isca, uma relação dose dependente (extrato aquoso de amêndoas *versus* mortalidade do inseto) quando o substrato de pupação (areia esterilizada) foi tratado com o extrato em diferentes concentrações. Para a mosca-sul-americana foi registrada mortalidade de 15,34 % quando se utilizou o extrato na concentração de 3.200 ppm (7,83 ppm de azadiractina); já com o aumento da concentração do extrato em 10 vezes (32.000 ppm – 78,27 ppm de azadiractina) a mortalidade foi seis vezes superior (96,99 %) (Figura 2.4).

De forma semelhante, os extratos causaram mortalidade em *C. capitata*, com aumento gradativo de mortalidade de 23 % na menor concentração em estudo (1.000 ppm – 2,45 ppm de azadiractina) para 88 % na maior (18.000 ppm – 44,03 ppm de azadiractina) (Figura 2.4). Nesse experimento os valores de mortalidade natural ocorridos nos controles (19,61 % para a moscamed e 15,00 % para a mosca-sul-americana) foram menores que os constatados nos respectivos controles no experimento com os adultos dessas moscas (38 % e 30 % para *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente), o que sugere que os dados registrados em relação aos imaturos são mais consistentes.

Os valores de qui-quadrado (χ^2) calculado na estimativa da toxicidade para *A. fraterculus* (0,44) e *C. capitata* (0,14) estiveram dentro dos limites pré-estabelecidos, ou seja, foram inferiores ao valor de χ^2 tabelado (11,07) para ambas as espécies (Tabela 2.10). Sendo assim, os dados analisados adequaram-se ao modelo de probit (ROBERTSON; PREISLER, 1992).

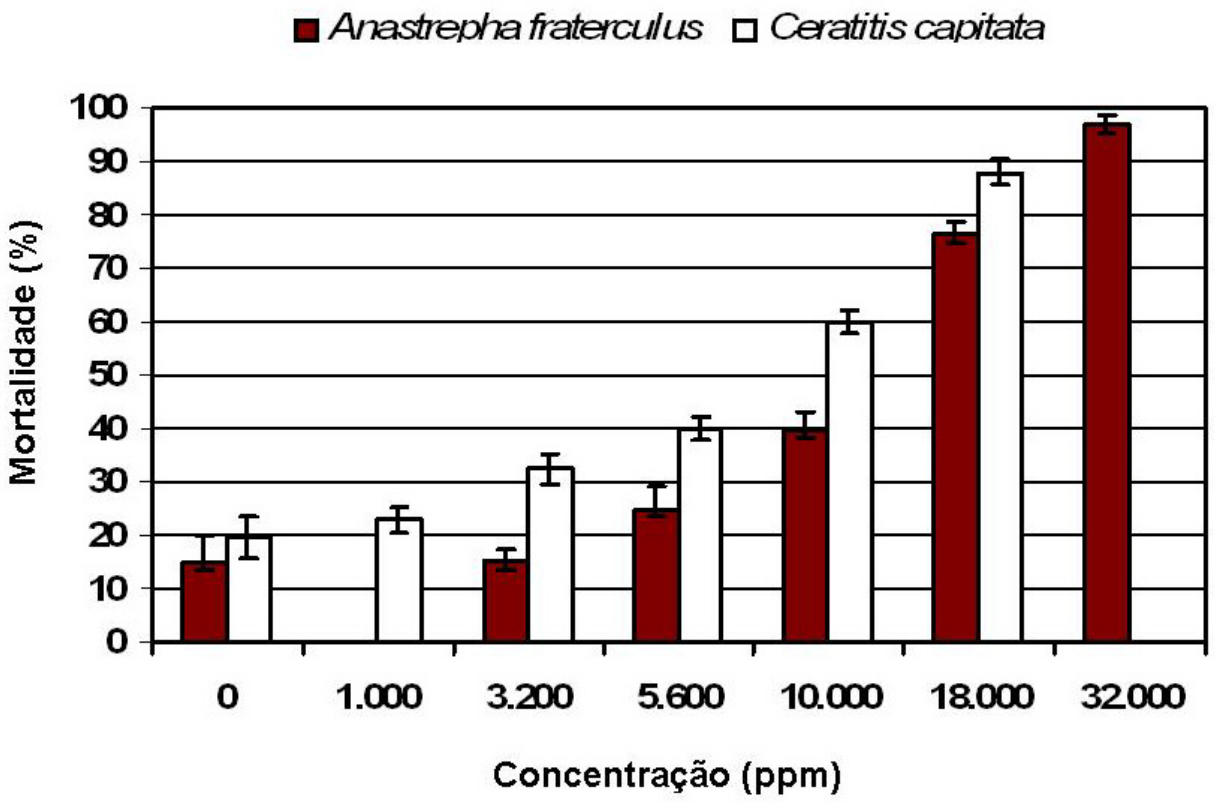


Figura 2.4 - Mortalidade de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* após a exposição da fase de larva-pupa a diferentes concentrações do extrato aquoso de amêndoas de *Azadirachta indica* em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h). Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 1.000 ppm do extrato (2,45 ppm de aza); 3.200 ppm do extrato (7,83 ppm de aza); 5.600 ppm do extrato (13,70 ppm de aza); 10.000 ppm do extrato (24,46 ppm de aza); 18.000 ppm do extrato (44,03 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (78,27 ppm de aza)

Aparentemente, assim como ocorreu com os insetos na fase adulta, a moscamed apresentou maior susceptibilidade ao extrato aquoso de amêndoas nas condições em foi conduzido esse experimento (Figura 2.4). Os valores das CL_{50} estimadas confirmam essa hipótese, uma vez que, enquanto para a mosca-sul-americana a concentração estimada foi de 13.028 ppm (1,30 %), para *C. capitata* a concentração estimada foi de 9.390 ppm (0,94 %) (Tabela 2.10).

A forma de avaliar o efeito tóxico dos extratos aquosos de amêndoas de nim sobre os imaturos e adultos das duas espécies foram diferentes, não permitindo uma comparação dos resultados obtidos com uma posterior conclusão, mas é passível de discussão. Numa análise simplista dos erros padrões obtidos nas diferentes concentrações, independentemente da espécie

em estudo e comparando a variabilidade destes em relação aos adultos e à fase imatura (Figuras 2.2 e 2.4), é notório que nessa última ocorreu menor variabilidade dos dados, o que, consequentemente, permite inferir que as diferentes concentrações de extrato aquoso de amêndoas de nim causaram um efeito mais estável sobre os imaturos.

Tabela 2.10 - Estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim em relação a fase de larva-pupa de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

Espécie	[1]n	[2]χ^2	[3]g.l.	[4]CA ± EP	[5]CL (95 % IC) ppm		Azadiractina (ppm)
Anastrepha fraterculus	972	0,44	5	4,35 ± 0,47	CL_{50}	13.028 (11.501 – 14.372)	31,87
					CL_{90}	25.687 (23.050 – 29.695)	62,83
Ceratitis capitata	1.200	0,14	5	3,19 ± 0,41	CL_{50}	9.390 (8.080 – 10.565)	22,97
					CL_{90}	23.692 (19.941 – 30.889)	57,95

[1]n: número de insetos testados; [2]χ^2: Valor do qui-quadrado calculado; [3]g.l.: graus de liberdade; [4]CA: Coeficiente angular; [5]CL: Concentração letal e seu intervalo de confiança (IC)

Observando somente as CL_{50} (Tabelas 2.5 e 2.10), nota-se que os imaturos das moscas-das-frutas apresentaram menor suscetibilidade que os adultos. Por outro lado, constata-se que os intervalos de confiança das CL_{50} registradas para a fase imatura apresentam menor variabilidade (Tabelas 2.5 e 2.10). Em outra perspectiva, considerando os valores de CL_{90} estimados para ambas as fases, é possível diagnosticar que a fase imatura, em comparação com adulta de moscas-das-frutas, apresentam maior suscetibilidade ao extrato aquoso de amêndoas de *A. indica* (Tabelas 2.5 e 2.10). Finalmente, é importante mencionar que, na estimativa das concentrações letais para adultos o coeficiente angular (CA) foi de 0,66 para *A. fraterculus* e 0,67 para *C. capitata* (Tabela 2.5), enquanto para a fase imatura os valores de CA foram 4,35 e 3,19, respectivamente (Tabela 2.10). Quando o valor do CA é maior significa que a população responde mais rapidamente ao aumento de determinado estímulo (ROBERTSON; PREISLER, 1992), no caso, ao aumento da concentração de extrato, justificando a inversão da suscetibilidade

quando consideradas as CL_{50} e CL_{90} das fases adulta e imatura de ambas as espécies. Em estudos com resistência a inseticidas, valores de CA altos (>2,0) refletem a homogeneidade dessas populações em relação à resposta das mesmas ao inseticida enquanto CA < 2,0 indica heterogeneidade de resposta (AHMAD et al., 2002). Nesse trabalho, as espécies em estudo possuem a mesma origem, independentemente do estágio de desenvolvimento e, aparentemente, constata-se maior homogeneidade de resposta para a fase imatura (CA = 4,35 e 3,19 para *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente) do que para a adulta (CA = 0,66 e 0,67 para *A. fraterculus* e *C. capitata* respectivamente). Diversas hipóteses podem ser levantadas para justificar as diferenças nas respostas, tais como: maior suscetibilidade dos imaturos, maior efeito dos extratos por contato do que por ingestão, metodologia de exposição dos insetos ao extrato muito diferente, entre outras.

2.2.2.7 Avaliação da atividade inseticida de derivados do nim em relação a imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

O efeito inseticida foi constatado quando larvas em trânsito de moscas-das-frutas foram acondicionadas em recipientes com areia pulverizada com extratos vegetais ou óleo de amêndoas (Tabelas 2.11 e 2.12). O contato com os compostos do nim causou efeito altamente significativo, tanto para *A. fraterculus* ($F = 52,86$; $p < 0,0001$) como para *C. capitata* ($F = 112,49$; $p < 0,0001$).

As larvas em contato com a torta de nim estavam no final do terceiro ínstar, fase que, na natureza, é caracterizada pela ausência de alimentação e saída da larva do fruto. A mortalidade da fase de larva de *A. fraterculus* em contato com o substrato pupal tratado foi insignificante ($F = 1,14$; $p < 0,3306$); a imobilização e empupação não foram afetadas, pois as larvas mantiveram o mesmo padrão de desenvolvimento, já que praticamente todos os insetos avaliados conseguiram realizar a ecdise para a fase de pupa (Tabela 2.11).

Na fase de pupa a visualização do efeito imediato é mascarado, devido a pupa se encontrar oculta num invólucro protetor denominado pupário. Consequentemente, o efeito é analisado de acordo com a emergência de adultos (mortalidade pupal), tendo sido verificado que não ocorreu qualquer alteração morfológica no pupário, como por exemplo, mudança de coloração ou deformações. Com base nos dados obtidos, verifica-se efeito altamente significativo de alguns dos tratamentos sobre a mosca sul-americana ($F = 50,57$; $p < 0,0001$), sendo que os extratos em

diclorometano de ramos e de amêndoas causaram 96,88 e 84,14 % de mortalidade, respectivamente. Considerando a mortalidade da fase de larva mais pupa (mortalidade total), os extratos de ramos e de amêndoas, ambos em solvente diclorometano, causaram 98,13 e 86,01 % de mortalidade total, diferindo dos demais tratamentos (Tabela 2.11).

Em menor escala, diferindo dos extratos com maior efeito e também do restante dos tratamentos, com exceção do extrato de folhas em diclorometano, o extrato de amêndoas em metanol provocou 51,25 % de mortalidade na fase de pupa; quando somadas as duas fases (larva e pupa) a mortalidade ocasionada foi de 51,88 % (Tabela 2.11). Os demais derivados causaram mortalidade semelhante aos controles (água e acetona a 5 %).

A razão sexual dos adultos de *A. fraterculus* diferiu entre os tratamentos com os derivados de *A. indica* (F = 3,58; p < 0,0001) (Tabela 2.11). O extrato de amêndoas em diclorometano causou redução no número de fêmeas emergidas (razão sexual = 0,25), diferindo dos controles, água deionizada (razão sexual = 0,50) e acetona a 5 % (razão sexual = 0,51). O menor índice de razão sexual quando se aplicou o extrato da amêndoa em diclorometano, possivelmente foi influenciado pela alta mortalidade ocasionada pelo próprio (86,01 %). O número de insetos emergidos foi 23, dos quais 15 machos e oito fêmeas. Em algumas repetições não houve emergência, em outras emergiram apenas machos. O maior efeito constatado sobre as fêmeas é interessante para o manejo da praga em campo, uma vez que a fêmea possui maior responsabilidade em relação aos danos causados por essa espécie.

A imobilização e empupação da fase de larva de *C. capitata* em contato com o substrato pupal tratado não foi afetada, atingindo a fase de pupa normalmente (Tabela 2.12). A fase larval de moscamed e também da mosca sul-americana ficou exposta ao derivado de nim por no máximo 48 h antes da transformação para a fase de pupa propriamente dita. Provavelvemente, o tempo de exposição não tenha sido suficiente para provocar efeito nessa fase, pois, algum efeito era esperado, já que em Diptera, os processos de imobilização e pupação são induzidos pelo hormônio da muda (ecdisona) associado a distintos fatores neurormonais de natureza peptídica (GILBERT, 1989) e a interferência da azadiractina no sistema neuroendócrino dos insetos é o seu principal sítio de ação (SCHUMUTTERER, 1990; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; MORDUE (LUNTZ); MORGAN; NISBET, 2005). O tratamento com azadiractina altera os teores de ecdisona e de outros hormônios ecdisteróides na hemolinfa, possivelmente por interferir na síntese e liberação do hormônio protoracicotrópico (PTTH) do corpo alado, o que resulta na

redução de sua síntese pelas células neurossecretoras do cérebro, por efeito de *feedback* (veja MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; REMBOLD, 1995).

Nos extratos com maior efeito deletério sobre os imaturos de moscamed, todas as 200 larvas inoculadas na areia tratada atingiram a fase de pupa. Apenas três insetos emergiram no tratamento com o extrato de amêndoas em diclorometano (98,50 % de mortalidade) e nenhuma mosca sobreviveu ao tratamento com o extrato de amêndoas em metanol (100 % de mortalidade). Os dois tratamentos diferiram significativamente dos controles e dos demais tratamentos (Tabela 2.12).

O extrato de ramos em diclorometano causou 0,50 % de mortalidade sobre larvas e 43,00 % de mortalidade sobre pupas, perfazendo um total de 43,50 % de mortalidade sobre *C. capitata*, diferindo dos extratos que ocasionaram maior mortalidade e também dos demais tratamentos. O óleo de nim e os extratos aquosos das diferentes estruturas, assim como os outros seis extratos orgânicos (amêndoa em solvente hexano; ramos em metanol e hexano; e folhas em metanol, diclorometano e hexano) não causaram efeito significativo sobre a fase de larva em trânsito, a apólise larval-pupal e a posterior emergência dos adultos da moscamed (Tabela 2.12).

Os adultos da moscamed emergidos, oriundos de larvas em trânsito e ou pupas em contato com compostos do nim, apresentaram razão sexual semelhante, variando de 0,44 (óleo de amêndoas) a 0,53 (controles: água deionizada e acetona a 5 %) (Tabela 2.12).

O efeito regulador do crescimento é caracterizado por atraso no desenvolvimento, malformações e mortalidade (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993). Os insetos que sobrevivem ao tratamento com azadiractina apresentam anomalias, que em geral se manifestam como deformidades nos apêndices (MARTINEZ, 2002).

Adultos de moscas-das-frutas emergidos de larva-pupa expostas à areia tratada com derivados do nim apresentaram mortalidade acentuada em alguns tratamentos (Tabelas 2.11 e 2.12). Além disso, em alguns casos houve alta incidência de adultos defeituosos, onde os insetos emergidos não apresentavam os apêndices (asas) desenvolvidos (Tabela 2.13). Em ensaio com a mosca sul-americana registrou-se a emergência de adultos defeituosos, cuja principal característica foi o não desenvolvimento das asas, sendo que, em alguns casos, o inseto conseguiu estender apenas um apêndice enquanto o outro estava atrofiado.

Tabela 2.11 - Mortalidade e razão sexual (± EP) de imaturos de *Anastrepha fraterculus* expostos a derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25,00 ± 2,00ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		Azadiractina (ppm)	Nº insetos	Mortalidade (%)						Razão sexual[1]	
				Larval	Pupal[1]		Total[1]				
Controle (água deionizada)		-	200	0,00 ± 0,00	24,54 ± 2,00	cd	24,54 ± 2,00	cd	0,50 ± 0,05	a
Controle (acetona a 5 %)		-	200	0,00 ± 0,00	30,63 ± 2,40	cd	30,63 ± 2,40	cd	0,51 ± 0,04	a
Amêndoas	Água	31,8652	200	0,00 ± 0,00	20,63 ± 3,71	d	20,63 ± 3,71	d	0,46 ± 0,05	ab
	Metanol	78,9497	200	0,63 ± 0,63	51,25 ± 4,30	b	51,88 ± 4,62	b	0,45 ± 0,06	ab
	Diclorometano	46,8422	200	1,88 ± 0,91	84,14 ± 4,74	a	86,01 ± 4,86	a	0,25 ± 0,06	b
	Hexano	4,4582	200	0,63 ± 0,63	17,00 ± 3,29	d	17,63 ± 3,01	d	0,54 ± 0,04	a
Ramos	Água	0,0039	200	1,88 ± 0,91	26,88 ± 2,82	cd	28,75 ± 2,95	cd	0,48 ± 0,05	ab
	Metanol	0,0078	200	0,00 ± 0,00	23,13 ± 2,49	d	23,13 ± 2,49	d	0,61 ± 0,04	a
	Diclorometano	-	200	1,25 ± 0,82	96,88 ± 1,32	a	98,13 ± 1,32	a	-	
	Hexano	0,0065	200	0,00 ± 0,00	27,31 ± 2,69	cd	27,31 ± 2,69	cd	0,49 ± 0,04	a
Folhas	Água	0,0052	200	0,63 ± 0,63	25,00 ± 2,83	cd	25,63 ± 2,58	cd	0,52 ± 0,06	a
	Metanol	0,0078	200	1,25 ± 1,25	18,63 ± 2,83	d	19,88 ± 2,88	d	0,65 ± 0,04	a
	Diclorometano	-	200	0,63 ± 0,63	40,00 ± 1,64	bc	40,63 ± 1,48	bc	0,60 ± 0,04	a
	Hexano	0,0104	200	0,63 ± 0,63	25,16 ± 6,75	cd	25,79 ± 6,58	cd	0,50 ± 0,06	a
Óleo de amêndoas		6,0841	200	0,00 ± 0,00	21,13 ± 3,25	d	21,13 ± 3,25	d	0,50 ± 0,04	a
F (tratamentos)				1,14[NS]	50,57**		52,54**		3,58**	
Coeficiente de variação - CV (%)				16,64	26,98		26,40		26,98	

[NS] Não significativo; ** Significativo

[1] Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05)

Tabela 2.12 - Mortalidade e razão sexual (± EP) de imaturos de *Ceratitis capitata* expostos a derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25,00 ± 2,00ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		Azadiractina (ppm)	Nº insetos	Mortalidade (%)						Razão sexual[2]
				Larval	Pupal[1]		Total[1]			
Controle (água deionizada)		-	200	1,50 ± 0,76	11,50 ± 2,48	de	13,00 ± 2,91	d		0,53 ± 0,04
Controle (acetona a 5 %)		-	200	2,50 ± 1,54	17,50 ± 4,61	cde	20,00 ± 5,00	cd		0,53 ± 0,06
Amêndoa	Água	22,9670	200	0,00 ± 0,00	14,50 ± 1,74	cde	14,50 ± 1,74	cd		0,53 ± 0,02
	Metanol	56,9034	200	0,00 ± 0,00	98,50 ± 1,50	a	98,50 ± 1,50	a		-
	Diclorometano	33,7617	200	0,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	a	100,00 ± 0,00	a		-
	Hexano	3,2133	200	1,50 ± 0,76	12,00 ± 2,26	de	13,50 ± 2,11	cd		0,46 ± 0,03
Ramo	Água	0,0028	200	0,00 ± 0,00	10,00 ± 2,47	e	10,00 ± 2,47	d		0,52 ± 0,02
	Metanol	0,0056	200	0,00 ± 0,00	12,50 ± 2,50	de	12,50 ± 2,50	d		0,50 ± 0,03
	Diclorometano	-	200	0,50 ± 0,50	43,00 ± 2,81	b	43,50 ± 2,89	b		0,51 ± 0,05
	Hexano	0,0047	200	1,50 ± 1,07	11,00 ± 2,33	de	12,50 ± 2,81	d		0,49 ± 0,03
Folha	Água	0,0038	200	0,00 ± 0,00	15,00 ± 1,49	cde	15,00 ± 1,49	cd		0,49 ± 0,04
	Metanol	0,0056	200	0,50 ± 0,50	10,00 ± 2,36	e	10,50 ± 2,17	d		0,48 ± 0,04
	Diclorometano	-	200	1,00 ± 0,67	26,00 ± 3,71	c	27,00 ± 3,89	c		0,47 ± 0,05
	Hexano	0,0075	200	1,00 ± 0,67	14,00 ± 2,96	cde	15,00 ± 2,79	cd		0,49 ± 0,06
Óleo de amêndoas		4,3851	200	0,00 ± 0,00	23,50 ± 4,22	cd	23,50 ± 4,22	cd		0,44 ± 0,04
F (tratamentos)				1,56 NS	122,55**		112,49**			0,56NS
Coeficiente de variação - CV (%)				18,84	22,74		26,56			37,44

NSNão significativo; **Significativo

[1]Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

[2]Dados originais na tabela; para análise estatística os dados foram transformados por log $X^{1,5}$

Na tabela 2.13, estão expostas as porcentagens de adultos normais em relação ao total de adultos emergidos. No caso de *A. fraterculus*, o extrato de ramos em diclorometano não foi considerado, pois apenas três insetos emergiram, dos quais dois eram defeituosos. Os extratos de folhas em diclorometano, de amêndoas em metanol e de amêndoas em diclometano foram os que provocaram menor emergência de adultos normais, não diferindo entre si, sendo que destes, somente o extrato de amêndoas em diclometano diferiu dos dois controles (água deionizada e acetona a 5 %). Nesse tratamento, das 20 larvas iniciais, apenas 2,88 adultos, em média, emergiram, dos quais 47,83 % eram normais (Tabela 2.13). Em meio natural os insetos defeituosos (52,17 %) dificilmente conseguiriam se alimentar, sobreviver e se dispersar, e provavelmente seriam predados poucas horas após a emergência. Outro aspecto importante é que a probalidade de esses insetos copularem é bastante reduzida, já que os insetos dessa espécie possuem a capacidade de selecionar seus parceiros.

Já para *C. capitata* não foi constato efeito significativo, ou seja, nos tratamentos com derivados do nim houve pouca emergência de insetos defeituosos. Nessa espécie, a porcentagem de adultos normais em relação ao total de adultos emergidos variou de 95,53 a 100 % (Tabela 2.13). O tratamento com o extrato de amêndoas em metanol resultou em apenas três insetos emergidos, dos quais duas moscas não apresentaram apêndices desenvolvidos; os dados referentes a esse tratamento foram desconsiderados por que apenas em duas repetições houve emergência. Em trabalho desenvolvido por Silva et al. (2007) também não houve registro significativo de insetos defeituosos quando a fase de larva-pupa dessa espécie foi submetida ao contato com a torta de nim. Posteriormente, Silva et al. (2008) demonstraram que a exposição de larva-pupa à areia tratada com óleo de nim (em concentrações até 43,2 ppm de azadiractina e 36,9 ppm de 3-tigloylazadirachtol) não afetaram a capacidade de vôo dos adultos de *C. capitata* emergidos do substrato tratado. No entanto, Stefeens e Schumutter (1983) registraram uma redução na habilidade de vôo da moscamed quando larvas foram alimentadas com dieta contendo extrato metanólico de amêndoas de nim.

O extrato de amêndoas em diclorometano, extrato de amêndoas em metanol e o extrato de ramos em diclorometano foram os que provocaram maior efeito como regulador de crescimento de moscas-das-frutas (Tabela 2.11 e 2.12). Entre as duas espécies a suscetibilidade aos três extratos variou, sendo que para mosca sul-americana os extratos em diclorometano (ramos e amêndoas) foram os mais eficientes, seguido do extrato de amêndoas em metanol. Já para a

moscamed, o efeito foi mais pronunciado quando se utilizaram as amêndoas de *A. indica*, nos solventes diclorometano e metanol, enquanto o extrato de ramos em diclorometano foi o que causou a menor mortalidade nessa espécie.

Tabela 2.13 - Adultos normais emergidos (± EP) de imaturos de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* expostos a derivados de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Extratos		*Anastrepha fraterculus* (adultos)			*Ceratitis capitata* (adultos)	
		Emergidos	Normais (%)[1,2]		Emergidos	Normais (%)
Controle (água deionizada)		15,00 ± 0,42	94,17 ± 2,50	a	17,40 ± 0,58	100,00 ± 0,00
Controle (acetona a 5 %)		13,88 ± 0,48	88,29 ± 3,44	abc	16,00 ± 0,88	99,33 ± 0,67
Amêndoas	Água	15,88 ± 0,74	96,85 ± 1,20	a	17,10 ± 0,35	100,00 ± 0,00
	Metanol	9,63 ± 0,92	64,94 ± 7,41	cd	0,30 ± 0,30	-
	Diclorometano	2,88 ± 0,97	47,83 ± 16,91	d	0,00 ± 0,00	-
	Hexano	16,38 ± 0,63	94,66 ± 2,26	a	17,30 ± 0,42	97,60 ± 1,32
Ramos	Água	14,25 ± 0,59	91,23 ± 1,69	abc	18,00 ± 0,49	100,00 ± 0,00
	Metanol	15,38 ± 0,50	95,93 ± 2,21	a	17,50 ± 0,50	100,00 ± 0,00
	Diclorometano	0,38 ± 0,26	-		11,30 ± 0,58	97,27 ± 1,94
	Hexano	14,63 ± 0,56	96,58 ± 1,79	a	17,50 ± 0,56	98,62 ± 0,92
Folhas	Água	14,88 ± 0,52	90,76 ± 5,42	abc	17,00 ± 0,30	99,41 ± 0,59
	Metanol	16,25 ± 0,70	93,08 ± 2,89	ab	17,90 ± 0,43	97,67 ± 1,34
	Diclorometano	11,88 ± 0,30	73,68 ± 3,72	bcd	14,60 ± 0,78	95,53 ± 1,86
	Hexano	14,75 ± 1,32	84,75 ± 4,60	abc	17,00 ± 0,56	100,00 ± 0,00
Óleo de amêndoas		15,88 ± 0,67	92,91 ± 2,30	ab	15,30 ± 0,84	97,01 ± 1,27
F (tratamentos)			7,48**			$2,06^{NS}$
Coeficiente de variação - CV (%)			25,42			3,33

^{NS}Não significativo; **Significativo
[1]Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)
[2]Dados originais na tabela; para análise estatística os dados foram transformados por $(x + 0,5)^2$

As amêndoas são ricas em azadiractina, principal composto do nim com atividade inseticida como regulador de crescimento de insetos (SCHUMUTTERER, 1990; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993; MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000; MORGAN, 2009). O efeito provocado pelo extrato de amêndoas em metanol, principalmente em relação a *C. capitata* (98,5 % de mortalidade), possivelmente foi condicionado pela quantidade de azadiractina nesse extrato. Entre os subprodutos do nim em avaliação, esse extrato possuía o maior conteúdo de azadiractina

(Tabela 2.3) e no ensaio com a moscamed a concentração de azadiractina nesse tratamento foi de 56,90 ppm, valor bem superior à encontrada nos demais tratamentos (Tabela 2.12).

O extrato de amêndoas em diclorometano foi o único que causou mortalidade drástica nas duas espécies de tefritídeos (Tabela 2.11 e 2.12), o que provavelmente de deveu à união entre a estrutura e o solvente adequado para extração dos compostos com atividade inseticida. A diferença de polaridade entre os dois solventes, diclorometano e metanol, poderia explicar uma maior predominância do primeiro quando analisado o efeito sobre as duas espécies.

O solvente metanol é altamente polar, o que propicia a extração de compostos relacionados, como, por exemplo, a azadiractina, substância extraída com maior eficiência por esse solvente no presente trabalho (Tabela 2.3). Contudo, em função da sua polaridade, esse solvente pode ter extraído muitas substâncias polares inativas para o inseto, como açúcares, taninos e outras, levando à diluição das substâncias ativas no extrato. Por outro lado, como o diclorometano é um solvente de menor polaridade (polaridade intermediária), impediria a extração de substâncias inativas. Além disso, provavelmente as características polares do diclorometano propiciam a extração de um maior número de limonóides com atividade inseticida sobre insetos.

O efeito inseticida do extrato depende da polaridade do solvente para extração dos compostos e da estrutura da planta. Nesse trabalho, o extrato de ramos em diclorometano, o qual não foi detetectado a presença de azadiractina, causou mortalidade sobre *A. fraterculus* superior aos demais tratamentos, apenas não diferindo do extrato de amêndoas em diclorometano (Tabela 2.11). Contudo, para os ramos, foram registradas quantidades ínfimas de azadiractina nos outros solventes (água, metanol e hexano) (Tabela 2.3). Assim, o efeito inseticida demonstrado possivelmente tenha sido devido à ação de outros limonóides presentes nos ramos dessa planta. Diferenças de efeito devido ao solvente e à estrutura da planta também foram demonstrados por Roel (1998), que estudou o efeito de diferentes concentrações dos extratos orgânicos (acetônico e metanólico) de ramos e folhas de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) na mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e constatou que, no que se refere aos ramos, os dois extratos foram igualmente ativos, enquanto que, em relação às folhas, o extrato acetônico apresentou maior atividade que o metanólico.

Recentemente, pesquisas envolvendo meliáceas (Rutales: Meliaceae) têm demonstrado maior eficiência de extratos em diclorometano e em clorofórmio (solventes compatíveis em

termos de polaridade) sobre diferentes espécies de insetos. Rocha (2004), testando o extrato em hexano, em diclorometano e em metanol dos frutos de *T. pallida* em ensaio por ingestão com lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* na concentração de 1000 ppm, também constatou que o extrato em diclorometano provocou mortalidade de 84 % e foi então submetido a sucessivos fracionamentos cromatográficos resultando no isolamento e identificação de três limonóides. Cunha et al. (2005), mesmo não encontrando diferença entre extratos hexânicos, diclorometânicos e metanólicos de folhas de *T. pallida* em relação à mortalidade de lagartas de *Tuta absoluta* (Meyrick), aos 3 e 6 dias após infestação, constataram uma tendência de maior mortalidade com o extrato em diclorometano que ocasionou mortalidade de 17,1 % no sexto dia. No entanto, mesmo não tendo ocorrido diferença significativa entre os extratos em relação à mortalidade, observou-se que o peso de lagartas alimentadas em folíolos tratados com o extrato em diclorometano foi significativamente menor que o peso de lagartas expostas ao extrato em hexano e aos controles água e acetona. De maneira similar ao observado com *T. pallida*, o extrato em diclorometano de folhas de *T. pallens* apresentou-se mais promissor como fonte de substâncias com atividade sobre *T. absoluta* que os extratos em hexano e em metanol (CUNHA et al., 2006).

2.3 Conclusões

- ✓ As CL_{50} do extrato aquoso de amêndoas de nim estimadas para adultos de *A. fraterculus* e de *C. capitata* são 7.522 e 1.368 ppm, respectivamente;
- ✓ Extratos aquosos e orgânicos de amêndoas, de ramos e de folhas de nim e o óleo de amêndoas dessa planta, aplicados em forma de isca em plantas de citros, não causam efeito tóxico sobre *A. fraterculus* e sobre *C. capitata*, em concentrações de até 7.522 e 1.368 ppm, respectivamente;
- ✓ As CL_{50} do extrato aquoso de amêndoas estimadas para imaturos de *A. fraterculus* e de *C. capitata* são 13.028 e 9.390 ppm, respectivamente;
- ✓ Extratos em diclorometano de amêndoas e de ramos, em concentração a partir de 13.028 ppm, afetam a sobrevivência da fase imatura de *A. fraterculus*, o mesmo ocorrendo com a fase imatura de *C. capitata* quando sujeita aos extratos de amêndoas em metanol e em diclorometano em concentração a partir de 9.390 ppm.

- ✓ A água propicia maior rendimento de extração de substâncias químicas do nim do que os solventes orgânicos.
- ✓ A azadiractina é encontrada em maior quantidade nas amêndoas do que nas folhas e nos ramos de *A. indica*.
- ✓ O solvente metanol apresentou maior capacidade de extração de azadiractina**.**

Referências

AHMAD, M.; ARIF, M.I.; AHMAD, Z.; DENHOLM, I. Cotton whitefly (*Bemisia tabaci*) resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides in Pakistan. **Pest Management Science**, Sussex, v. 58, p. 203-208, 2002.

ALUJA, M. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 565-594, 1999.

ALUJA, M.; MANGAN, R.L. Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: Critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 53, p. 473–502, 2008.

ALVARENGA, C.D.; GIUSTOLIN, T.A.; QUERINO, R.B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Coord.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. cap. 11, p.227-252.

ALVARENGA, C.D.; BRITO, E.S.; LOPES, E.N.; SILVA, M.A.; ALVES, D.A.; MATRANGOLO, C.A.R.; ZUCCHI, R.A. Introdução e recuperação do parasitóide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em pomares comerciais de goiaba no norte de Minas Gerais. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 133-136, 2005.

BARANOWSKI, R.; GLENN. H.; SIVINSKI, J. Biological biocontrol of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologisty**, Gainesville, v. 76, p. 245-250, 1993.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London Series A***,* London, v**.** 160, p. 268–282, 1937.

BEZERRA, G.C.D. **Efeito de extratos brutos e frações de meliáceas (Rutales: Meliaceae) na sobrevivência e no comportamento de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro.** 2009. 136 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BIRKE, A.; ALUJA, M.; GREANY, P.; BIGURRA, E.; PÉREZ-STAPLES, D.; MCDONALD, R. Long aculeus and behavior of *Anastrepha ludens* renders gibberellic acid ineffective as an agent to reduce 'Ruby Red' grapefruit susceptibility to the attack of this pestiferous fruit fly in commercial citrus orchards. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 1184–1193, 2006.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. **Chemical Communications**, London, n. 1, p. 23-24, 1968.

_____. Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, *Azadirachta indica*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 969-977, 1971.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 165-179.

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; TOWERS, G. H.N. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 377-394, 1992.

CISNEROS, J.; GOULSON, D.; DERWENT, L.C.; PENAGOS, D.I.; HERNÁNDEZ, O.; WILLIAMS, T. Toxic effects of spinosad on predatory insects. **Biological Control**, Orlando, v. 23, n. 2, p. 156-163, 2002.

CLARKE, A.R.; ARMSTRONG, K.F.; CARMICHAEL, A.E.; MILNE, J.R.; RAGHU, S.; RODERICK, G.K.; YEATES, D.K. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. **Annual Review of Entomology,** Stanford, v. 50, p. 293-319, 2005.

CUNHA, U.S. da. **Busca de substâncias de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens* (Meliaceae) com atividade sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae).** 2004. 126 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CUNHA, U.S. da; 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**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 667-673, 2005.

_____. Frações de *Trichilia pallens* com atividade inseticida sobre *Tuta absoluta*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileeira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1579-1585, 2006.

DA SILVA, M.F.G.F.; GOTTLI, O.R.; DREYER, D.L. Evolution of limonoids in the Meliaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 299-310, 1984.

FORIM, M.R. **Estudo fitoquímico do enxerto de *Azadirachta indica* sobre *Melia azedarach*: Quantificação de substâncias inseticidas**. 2006. 320 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

GAZIT, Y.; ROSSLER, Y.; GLAZER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 10, n. 2, p. 157-164, 2000.

GILBERT, L.I. The endocrine control of molting: the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, as a model system. In: KOOLMAN, J. (Ed.). **Ecdysone**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1989. p. 265-274.

HENDRICHS, J.; COOLEY, S.S.; PROKOPY, R.J. Post-feeding bubbling behavior in fluid-feeding Diptera: concentration of crop contents by oral evaporation of excess water. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 17, p. 153-161, 1992.

HOELMER, L.A.; DAHLSTEN, D.L. Effects of malathion bait spray on *Aleyrodes spiraeoides* and its parasitoids in northern California. **Environmental Entomology**, College Park, v. 22, p. 49-56, 1993.

ISMAN, M.B. Growth inhibitory and antifeedant effects of azadirachtin on six noctuids of regional economic importance. **Pesticide Science,** Inglaterra, v. 38, p. 57–63, 1993.

_____. Factors limiting commercial success of neem insecticides in North America and Western Europe. In: KOUL, O.; WAHAB, S. (Ed.). **Neem:** today and in the new millennium. Dordrecht: Kluwer, 2004. p. 33-41.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANIKMEDHAKUL, K.; PRAJUABSUK, T.; PANICHAJAKUL, S.; PANYAMEE, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa.* **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, n. 7, p. 1047–1050, 2005.

MAGAÑA, C.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 6, p. 1836-1843, 2007.

MAHMOUD, F.M. Combining the botanical insecticides NSK Extract, NeemAzal T 5 %, Neemix 4.5 % and the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* Cross N 33 to control the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders). **Plant Protect Science**, Praha, v. 43, p. 19-25, 2007.

MALAVASI, A. Áreas-livres ou de baixa prevalência. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000a. cap. 23, p. 175-181.

_____. Técnica de aniquilação de machos. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000b. cap. 23, p. 159-167.

MARTINEZ, S.S. **O Nim - *Azadirachta indica*:** natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MASTRANGELO, T.; PARKER, A.G.; JESSUP, A.; PEREIRA, R.; OROZCO-DÁVILA, D.; ISLAM, A.; DAMMALAGE, T.; WALDER, J.M.M. A New generation of X ray irradiators for insect sterilization. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 1, p. 85-94, 2010.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: An update. **Journal Insect Physiology**, London, v. 39, p. 903-924, 1993.

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

MORDUE (LUNTZ), A.J.; MORGAN, E.D.; NISBET, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 117-134.

MORENO, D.S.; MANGAN, R.L; CELEDONIO-HURTADO, H.; MONTOYA, G.P.; ZAVALA, J.L. Evaluation de la floxina B en el control de moscas de la fruta. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 2., 1996, Viña del Mar. **Proceedings…** Viña del Mar, 1996. p. 64.

MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v, 17, p. 4096–4105, 2009.

NISBET, A.J.; WOODFORD, J.A.T.; STRANG, R.H.C.; CONNOLLY, J.D. Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 68, p. 87-98, 1993.

PAPAJ, D.R.; ROITBERG, B.D.; OPP, S.B; ALUJA, M.; PROKOPY, R.J.; WONG, T.T.Y. Effect of marking pheromone on clutch size in the Mediterranean fruit fly. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 15, p. 463-468, 1990.

PAPAJ, D.R.; AVERILL, A.L.; PROKOPY, R.J.; WONG, T.T.Y. Host-marking pheromone and use of previously established oviposition sites by the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Behavior**. New York, v. 5, p. 583-598, 1992.

PROKOPY, R.J.; ZIEGLER, J.R.; WONG, T.T.Y. Deterrence of repeated oviposition by fruit marking pheromone in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 4, p. 55-63, 1978.

QUESADA-MORAGA, E.; RUIZ-GARCÍA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 99, n. 6, p. 1955-1966, 2006.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 127 p.

REMBOLD, H. Biological effects of neem and their modes of action: growth and metamorphosis. In: SCHMUTTERER, H. (Ed.). **The neem tree:** source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. Weinheim: VCH, 1995. p. 177-194.

ROCHA, W.C. **Busca de substâncias bioativas em plantas Amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae)**. 2004. 243 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

ROEL, A.R. **Efeito de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 1998, 115p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ROESSLER, Y. Insecticidal bait and cover sprays. In: ROBINSON, A.S.; HOOPER, G. (Ed.). **Fruit flies, their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 329-344. (World Crop Pest, 3B).

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 191-201, 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS.** Cary, 2002-2003.

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

SCHROEDER, D.R.; NAKANISHI, K.A. Simplified isolation procedure for azadirachtin. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 50, n. 2, p. 241-244, 1987.

SENTHIL NATHAN, S.; CHOI, M.Y.; PAIK, C.H.; SEO, H.Y.; KALAIVANI, K. Toxicity and physiological effects of neem pesticides applied to rice on the *Nilaparvata lugens* Stal, the brown planthopper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 72, p. 1707-1713, 2009.

SENTHIL NATHAN, S.; CHOI, M.Y.; PAIK, C.H.; SEO, H.Y.; KIM, J.D.; KANG, S.M. The toxic effects of neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) (BPH) (Homoptera: Delphacidae). **Chemosphere**, Oxford, v. 67, p. 80-88, 2007.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SILVA, M.A.; BEZERRA, G.C.D.; MASTRANGELO, T.A.; PITTA, R.M.; VENDRAMIM, J. D. Efeito da azadiractina no desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2008, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: SBE, 2008. CD-ROM.

SILVA, M.A.; CRUZ, P.L.; LOPES, G.N.; ROCHA, H.C.R.; BARBOSA, P.R.R.; ALVARENGA, C.D.; GIUSTOLIN, T.A. Ação da torta de nim (*Azadirachta indica*) sobre larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Resumos...** Brasília, 2007. 1 CD-ROM.

SMITH, C.M. **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches.** Berlin: Springer. 423 p. 2005.

STARK, J.D.; VARGAS, R. An evaluation of alternative insecticides to diazinon for control of tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) in soil. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 102, n. 1, p. 139-143, 2009.

STARK, J.D.; WONG, T.T.Y.; VARGAS, R.I.; THALMAN, R.K. Survival, longevity, and reproduction of tephritid fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) reared from fruit flies exposed to azadirachtin. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 85, p. 1125-1129, 1992.

STARK, J.E.P.; LACEY, L.A. Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, n. 2, p. 206-208, 1999.

STEFFENS, R.J.; SCHMUTTERER, H. The effects of a crude methanolic neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extract on metamorphosis and quality of adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Dip: Tephritidae). **Zeitschrift fur Angewandte Entomologie**, Hamburg, v. 94, p. 98-103, 1983.

SUNDARAM, K.M.S. Azadirachtin biopesticide: A review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health.** Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, New York, v. 31, n. 4, p. 913-948, 1996.

TOLEDO, J.; IBARRA, J. E.; LIEDO, P.; GÓMEZ, A.; RASGADO, M. A.; WILLIANS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 15, n. 6, p. 627-634, 2005.

UEBEL, E.C.; WARTHEN, J.D.; JACOBSON, M. Preparative reversed-phase liquid chromatographic isolation of azadirachtin from neem kernels **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 2, p. 875–882, 1979.

VARGAS, R.I.; PECK, S.L.; MCQUATE, G.T.; JACKSON, C.G.; STARK, J.D.; ARMSTRONG, J.W. Potential for area wide integrated management of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with a braconid parasitoid and a novel bait spray. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 4, p. 817-825, 2001.

VENDRAMIM, J.D.; GUZZO, E.C. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos:** base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 25, p. 1055-1105.

VIANA, P.A.; PRATES, H.T.; CRUZ, I; WAQUIL, J.M. The effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves on the control of *Spodoptera frugiperda* fed with corn leaves. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstracts…** Foz do Iguaçu: EMBRAPA Soja, 2000. p. 356.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. cap. 11. p. 181-188.

WATERMAN, P.G. Phytochemical diversity in the order Rutales. In: DOWNUM, K.; ROMEO, J.T.; STAFFORD, H. (Ed.). **Phytochemical potential of tropical plants**. New York: Plenum, 1993. p. 203-233.

YAMASAKI, R.B.; KLOCKE, J.A.; LEE, S.M.; STONE, G.A.; DARLINGTON, M.V. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 356, p. 220–226, 1986.

3 EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE EXTRATOS DE NIM SOBRE A REPRODUÇÃO E A LONGEVIDADE DA MOSCAMED, *CERATITIS CAPITATA* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Resumo

As concentrações subletais (CL_{15}, CL_{30} e CL_{45}) do extrato aquoso de amêndoas de *Azadirachta indica* A. Juss. foram estimadas para adultos de *Ceratitis capitata* (Wied.) por meio de aplicação de isca (extrato + mel) em plantas de limão 'Cravo'. Posteriormente, avaliou-se o efeito de diferentes extratos nessas concentrações subletais (39, 225 e 888 ppm) sobre a longevidade, a fecundidade e a fertilidade no 1º, 4º, 8º e 12º dia de oviposição. Para isso, foram utilizadas gaiolas de plástico onde foi fixado um algodão inserido em um tubo plástico contendo 12,5 ml de um dos extratos (extrato aquoso de amêndoas , extrato das folhas em metanol e extrato de ramos em diclorometano). Como controles foram utilizadas água deionizada e acetona a 5 %. Em cada gaiola foram liberados dois casais e fornecida dieta artificial (proteína hidrolisada + açúcar). As concentrações subletais foram estimadas através de regressão probítica pelo programa SAS 9.1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sob condições controladas de temperatura (25 ± 2ºC), umidade (60 ± 10 %) e fotofase (14 h). Nessas concentrações subletais, nenhum dos tratamentos afetou a longevidade de machos e fêmeas e o período de pré-oviposição. Houve redução da fecundidade total e da fertilidade no 8º dia quando os insetos foram alimentados com extrato de ramos em diclorometano a 888 ppm.

Palvras-chave: *Azadirachta indica*; Azadiractina; Concentrações subletais; Moscas-das-frutas; Efeito fisiológico; Reprodução

Abstract

The sublethal concentrations (LC_{15}, LC_{30} and LC_{45}) of aqueous extract from seed kernels of *Azadirachta indica* A. Juss for *Ceratitis capitata* (Wied.) adults were estimated applying bait (extract + honey) on 'Cravo' lemon seedlings. Subsequentely, the effect of different extracts in these sublethal concentrations (39, 225 e 888 ppm, respectively) about the longevity, fecundity and the fertility on the 1st, 4th, 8th and the 12th days of oviposition was evaluated. For that, it was used plastic cages where it was fixed a cotton wick which was in contact with a plastic vial with 12.5 ml of the extracts (seed kernel aqueous extract, leaf extract in methanol and branch extract in dichloromethane). Water or 5 % acetone were used as controls. Two couples were released in each cage and an artificial diet (hydrolyzed yeast + sugar) was offered *ad libitum.* The sublethal concentrations were estimated by probit regression analyses using the SAS 9.1 software. The experiment was completely randomized with four replicates per treatment and was conducted under environmental controlled conditions (25 ± 2ºC, 60 ± 10 % RH and 14 h photophase). At these sublethal concentrations, the longevity of males and females and the pre-oviposition period were not significantly affected. The total fecundity was reduced significantly and the fertility

decreased on the 8th day when the insects were fed with branch extract in dichloromethane at 888 ppm.

Keywords: *Azadirachta indica*; Azadirachtin, Sublethal concentrations; Fruit fly; Physiologic effects; Reproduction

3.1 Introdução

A avidez das moscas-das-frutas por alimento, logo após a emergência, tem permitido o emprego de iscas tóxicas para o seu manejo nos pomares brasileiros há pelo menos meio século, com base, principalmente, no trabalho de Puzzi e Orlando (1957). Essa técnica consiste em utilizar um atrativo e estimulante alimentar associado a um inseticida, geralmente um organofosforado, que propicia alta mortalidade em curto espaço de tempo.

Recentemente foram relatados alguns efeitos negativos do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre moscas-das-frutas (DI ILIO et al., 1999; SINGH, 2003). Isso levou a se cogitar da utilização de subprodutos do nim no controle desse grupo de pragas, substituindo os inseticidas sintéticos na composição da isca tóxica (NAKANO; ROMANO, 2002; ALVARENGA; GIUSTOLIN; QUERINO, 2006). A árvore de nim tem sido muito investigada quanto às suas propriedades e quanto ao seu potencial como inseticida, visto que seus derivados têm se revelado tão potentes quanto os inseticidas comerciais (SCHMUTTERER, 1990; MARTINEZ, 2002). Sua eficácia está diretamente relacionada ao conteúdo de azadiractina, principal composto responsável pela ação inseticida (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000; SENTHIL NATHAN et al., 2005).

Em termos gerais, a seleção de plantas com atividade inseticida é baseada quase que exclusivamente nos efeitos letais. Todavia, deve-se considerar que nem sempre a mortalidade do inseto deve ser o objetivo principal, pois exige maior dose e, consequentemente, maior quantidade de matéria-prima vegetal. Por outro lado, o objetivo principal deve ser reduzir e ou impedir o crescimento populacional da praga, seja por efeitos fisiológicos (como por exemplo, a esterilização), alterações no comportamento sexual, ou outros fatores correlacionados.

O tratamento com azadiractina afeta os insetos de diferentes modos, resultando, em muitos casos, em sobreviventes com baixo vigor e com distúrbios comportamentais, como reduzida habilidade de se alimentar, de se locomover e de copular (SCHMUTTERER, 1990; MARTINEZ, 2002). De forma generalizada, os efeitos fisiológicos da azadiractina sobre insetos são bastante

consistentes (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000) e estão associados à regulação do crescimento (MORDUE (LUNTZ) et al., 1998), à interferência na reprodução (reduzindo a quantidade de proteína dos ovários e a síntese de vitelogênese, causando a inibição da oogênese e a síntese de ecdisteróides no ovário) (REMBOLD; SIEBER, 1981ab; SIEBER; REMBOLD, 1983; SCHULZ; SCHLUTER, 1984; DORN; RADEMACHER; SEHN, 1987; FEDER et al., 1988; TANZUBIL; McCAFFERY, 1990; GARCIA; GONZALES; AZAMBUJA, 1991; RAO et al., 1996), à toxicidade sobre células epiteliais do intestino (NOGUEIRA et al., 1997), sobre glândulas produtoras de hormônios (SAYAH, 2002) e sobre tecidos reprodutivos (SAYAH et al., 1996). Além disso, o efeito sobre o metabolismo de proteínas (HUANG et al., 2004, HUANG et al., 2007) e sobre a síntese de enzimas (LOWERY; SMIRLE, 2000; SENTHIL NATHAN et al., 2006) também já foi constatado.

As moscas-das-frutas apresentam atividade de síntese protéica associada à reprodução (vitelogênese) intensa na fase adulta, culminando com alterações significativas nos níveis protéicos da hemolinfa, já que as proteínas do vitelo são produzidas, total ou parcialmente, durante a fase adulta, seguida de maturação ovariana e do desenvolvimento dos oócitos (DA CRUZ et al., 2000; CRESONI-PEREIRA; ZUCOLOTO, 2009). Essa estratégia reprodutiva do inseto permite hipotetizar que concentrações subletais de derivados do nim podem causar efeitos fisiológicos drásticos sobre adultos de tefritídeos.

Com base no exposto, objetivou-se estimar a toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim na forma de isca sobre adultos da mosca-do-mediterrâneo (moscamed), *Ceratitis capitata* (Wied.), bem como avaliar o efeito das concentrações subletais sobre a reprodução e a longevidade da praga.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Insetos

Os insetos estudados foram mantidos conforme metodologia adaptada de Carvalho e Nascimento (2002) e Walder (2002) e descrita anteriormente (Capítulo 2, Item 2.2.1.1).

3.2.1.2 Extratos

Os extratos utilizados foram obtidos conforme descrito no Capítulo 2, item 2.2.1.2. O conteúdo de azadiractina dos extratos em estudo foi de 2.445,90 mg de azadiractina / kg de extrato aquoso de amêndoas, 0,60 mg de azadiractina / kg de extrato de folhas em metanol; para o extrato de ramos em solvente diclorometano não foi detectado a presença de azadiractina.

A utilização de diferentes estruturas visou à extração de compostos diferentes na planta, resultando em efeito diferente entre os extratos (aquoso de amêndoas, metanólico de folhas e diclorometânico de ramos). Outra variável estudada foi a utilização de solventes com diferentes graus de polaridade (água e metanol, polares e diclorometano, com polaridade intermediária).

3.2.1.3 Estimativa da CL_{15}, CL_{30} e CL_{45} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Ceratitis capitata*

A estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas (CL_{15}, CL_{30} e CL_{45}) para *C. capitata* foi realizada de acordo com o descrito no Capítulo 2, item 2.2.1.5.

3.2.1.4 Efeitos de concentrações subletais de extrato aquoso de amêndoas de nim sobre adultos de *Ceratitis capitata*

Para avaliar o efeito das três concentrações subletais estimadas sobre a reprodução e a longevidade da praga, foram observados o período de pré-oviposição (da emergência da fêmea até a primeira postura), a fecundidade diária e total, a fertilidade e a longevidade. Para isso, foram utilizadas gaiolas confeccionadas com copos plásticos, as quais tiveram suas tampas perfuradas num diâmetro de 5,5 cm e cobertas com tecido *voil* para permitir a oviposição (Figura 1). Na lateral da gaiola, foi feito um corte para fixação de um rolo de algodão, o qual foi inserido dentro de um copo plástico contendo 12,5 ml de um dos extratos ou de um dos controles (água deionizada ou acetona a 5 %), os quais foram levados, por capilaridade, até o interior das gaiolas, onde puderam ser ingeridos pelos insetos. Esse copo plástico foi colocado dentro de um copo de vidro maior envolto por um arame que fixou a gaiola. O copo plástico era retirado a cada sete dias, higienizado e novamente acoplado à gaiola com seu respectivo tratamento. Na região abaixo

da tampa, foi colocada uma placa de Petri contendo água deionizada para a coleta dos ovos. Dentro das gaiolas foi colocado um recipiente plástico contendo dieta (proteína hidrolisada e açúcar na proporção de 1:3) *ad libitum*, a qual era substituída a cada 14 dias. Na região centro-posterior da gaiola foi feito um furo para a liberação dos insetos, sendo posteriormente fechado com algodão (Figura 1). Em cada gaiola, foram liberados dois casais, sendo a sobrevivência e o número de ovos avaliados diariamente. A fertilidade foi avaliada em ovos coletados no 1º, 4º, 8º e 12º dia de oviposição. Os ovos coletados nesses dias foram isolados em placas de Petri sobre um tecido preto para facilitar a sua visualização, sendo que abaixo desse tecido preto foi colocado um outro tecido umedecido (pano multiuso Alklin®). As placas foram mantidas em BOD a 25 ± 1ºC, umidade relativa do ar de 60 ± 5 % e fotofase de 14 h.

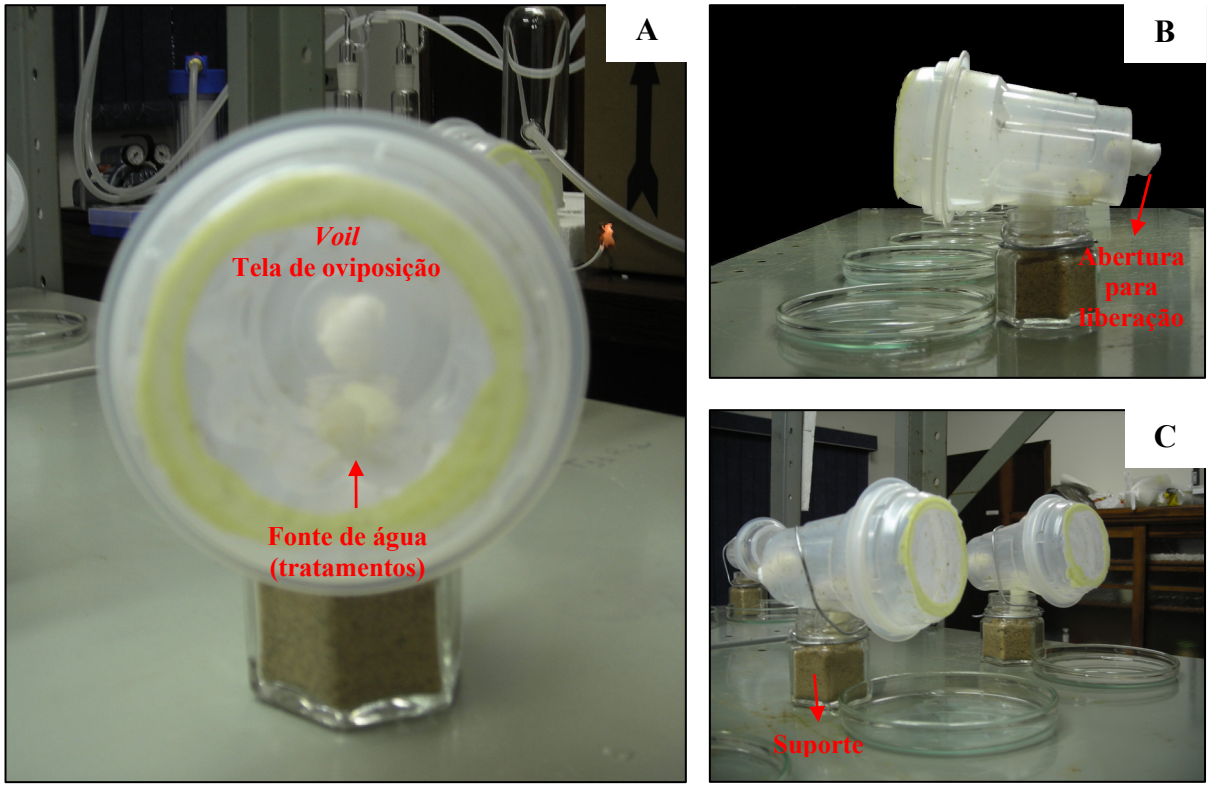


Figura 3.1 - Gaiola para exposição das moscas aos tratamentos. A) Detalhe da região anterior, evidenciando a tela de oviposição e a fonte de água (tratamentos); B) Vista lateral, monstrando a abertura para liberação dos insetos e a placa de Petri para coleta de ovos; C) Vista lateral, com o detalhe do suporte para fixação da gaiola

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos, extrato aquoso de amêndoas, extrato de folhas em metanol e extrato de ramos em diclorometano nas três concentrações estimadas no item 3.2.1.3 (CL_{15}, CL_{30} e CL_{45} do extrato aquoso de amêndoas), controle (água deionizada) e controle (acetona a 5 %, solvente para diluição de extratos orgânicos) e quatro repetições.

3.2.1.1 Análise estatística

As $CL_{15,}$ CL_{30} e CL_{45} foram estimadas através de regressão probítica pelo programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2003), sendo também obtidos o coeficiente angular e o valor do qui-quadrado (χ^2). O valor do qui-quadrado (χ^2) calculado pelo programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2003) foi comparado ao valor do χ^2 pré-estabelecido em tabela. Quando o valor do χ^2 calculado foi igual ou menor do que o χ^2 tabelado, os dados do bioensaio foram considerados adequados ao modelo de probit.

Os resultados de longevidade, foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sob esquema fatorial 2 x 11, sendo os fatores constituídos pelo sexo e pelos tratamentos. O período de pré-oviposição, fecundidade (diária e total) e fertilidade foram analisados conforme a análise de variância pelo teste F e quando detectada diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias.

Os testes de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) foram aplicados para avaliar as pressuposições de homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e a normalidade dos resíduos, respectivamente. Na ausência desses pressupostos, os dados foram transformados pelo Método Potência Ótima de Box-Cox (BOX; COX, 1964). Esse método de transformação depende diretamente de um parâmetro λ que é o coeficiente de transformação dos dados e indica o tipo de transformação necessária. Nesse estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa SAS de computação estatística (SAS INSTITUTE, 2003).

3.2.2 Resultados e discussão

3.2.2.1 Estimativa da CL_{15}, CL_{30} e CL_{45} de extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de *Ceratitis capitata*

O valor de qui-quadrado (χ^2) calculado (0,88) na estimativa da toxicidade do extrato aquoso de amêndoas de nim para adultos de moscamed esteve dentro dos limites pré-estabelecidos, ou seja, foi inferior ao valor de χ^2 tabelado (9,488) (Tabela 3.1), o que permite inferir que os dados analisados adequaram-se ao modelo de probit (ROBERTSON; PREISLER, 1992).

As concentrações estimadas para matar 15, 30 e 45 % da população de *C. capitata*, constituindo as CL_{15}, CL_{30} e CL_{45}, foram, respectivamente, 38,68 ppm (0,0039 % de extrato vegetal na isca), 225,19 ppm (0,0225 %) e 887,86 ppm (0,0888 %) (Tabela 3.1). A quantidade de azadiractina do extrato aquoso de amêndoas nessas concentrações (39, 225 e 888 ppm) correspondem a 0,10; 0,55 e 2,17 ppm de azadiractina (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Estimativa da toxicidade de extrato aquoso de amêndoas de nim em relação a adultos de *Ceratitis capitata*

[1]n	[2]χ^2	[3]g.l.	[4]CA ± EP	[5]CL (95 % IC) ppm		Azadiractina (ppm)
				CL 15	38,68 (0,13 – 256,63)	0,10
250	0,88	4	0,67 ± 0,18	CL 30	225,19 (5,03 - 912,38)	0,55
				CL 45	887,86 (77,19 - 2765)	2,17

[1]n: número de insetos testados; [2]χ^2: Valor do qui-quadrado calculado; [3]g.l.: graus de liberdade; [4]CA: Coeficiente angular; [5]CL: Concentração letal e seu intervalo de confiança (IC)

3.2.2.2 Efeitos de concentrações subletais de extratos de nim sobre adultos de *Ceratitis capitata*

Apesar da variabilidade entre os extratos (diferentes estruturas e diferentes solventes), não houve efeito dos tratamentos em relação à longevidade dos adultos de *C. capitata* (F = 2,13; p = 0,0340), independentemente do sexo (F = 0,23; p = 0,6301) e tampouco foi significativa a interação entre os fatores extrato e sexo (F = 0,76; p = 0,6616). Considerando as médias dos

diversos tratamentos, verifica-se que a longevidade dos machos variou de 14 a 30,38 dias, enquanto nos controles os valores médios foram 25,38 dias em água deionizada e 29,50 dias em acetona a 5 %. Já para longevidade das fêmeas as médias variaram de 15,33 a 28,50 dias nos tratamentos, sendo de 21,75 e 18,75 dias nos respectivos controles (água deionizada e acetona a 5 %) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Longevidade média (± EP) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à água tratada com extratos de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*, em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Tratamentos		Azadiractina (ppm)[1]	Longevidade (dias)	
			♂ (mín. – máx.)[2]	♀ (mín. – máx.)[2]
Controle (água deionizada)			25,38 ± 5,48 (8 – 65)	21,75 ± 2,84 (8 – 30)
Controle (acetona a 5 %)			29,50 ± 4,63 (16 – 55)	18,75 ± 3,30 (2 – 34)
Extrato aquoso de amêndoas	39 ppm	0,09539	25,50 ± 7,27 (9 – 72)	28,50 ± 3,54 (15 – 36)
	225 ppm	0,55034	25,13 ± 5,38 (9 – 67)	25,50 ± 5,02 (14 – 43)
	888 ppm	2,17199	26,00 ± 7,84 (2 – 59)	22,50 ± 2,07 (17 – 33)
Extrato de folhas em metanol	39 ppm	0,00002	14,00 ± 5,26 (5 – 40)	18,13 ± 3,32 (3 – 30)
	225 ppm	0,00013	18,38 ± 2,96 (2 – 28)	16,13 ± 1,14 (6 – 21)
	888 ppm	0,00053	30,38 ± 8,76 (14 – 61)	19,13 ± 2,66 (2 – 37)
Extrato de ramos em diclorometano	39 ppm	-	26,00 ± 6,45 (12 – 58)	23,63 ± 4,81 (1 – 46)
	225 ppm	-	15,13 ± 1,11 (1 – 25)	18,25 ± 3,22 (1 – 25)
	888 ppm	-	16,83 ± 0,51 (15 – 19)	15,33 ± 1,25 (7 – 19)
F (tratamentos)		.	$2,13^{NS}$	
F (sexo)			$0,23^{NS}$	
F (tratamentos x sexo)			$0,76^{NS}$	
Coeficiente de variação - CV (%)			13,16	

[NS] Não significativo; [1]Para o extrato de ramos em diclorometano não foi detectada a presença de azadiractina; [2]Médias de dados originais; para análise estatística os dados foram transformados pelo Método da Potência Ótima de Box-Cox com $\lambda = \log_{10}(x)$ antes da análise fatorial

Di Ílio et al. (1999) registraram redução da longevidade de *C. capitata* de forma dose-dependente quando um extrato de amêndoas de nim foi adicionado à dieta dos adultos. De outra forma, a longevidade da progênie de moscamed oriunda de larvas e pupas submetidas ao contato com areia tratada com extrato etanólico de sementes de nim não foi afetada (STARK; VARGAS; THALMAN, 1990). Outros trabalhos têm demonstrado efeito significativo de derivados do nim sobre a longevidade de outras espécies de moscas-das-frutas, como *Rhagoletis indifferens* Curran (VanRANDEN; ROITBERG, 1998), *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet) e *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (KHAN; HOSSAIN; ISLAM, 2007).

O período de pré-oviposição das fêmeas de *C. capitata* não foi afetado pelos extratos nas suas diferentes concentrações, com valores variando entre 3,0 (72 h) e 3,5 dias (84 h), enquanto nos tratamentos controle (água deionizada e acetona a 5 %) os períodos médios foram 3,25 dias (Tabela 3.3). Considerando os tratamentos com maior variabilidade (maior erro padrão), o extrato em metanol das folhas (39 ppm) e o extrato em diclorometano de ramos (39 e 888 ppm), observou-se que o período médio de pré-oviposição por fêmea foi de 3,50 dias (84 h), com o máximo não excedendo a 96 h (4 dias) .

O efeito mais pronunciado dos extratos foi evidenciado quando foi avaliada a fecundidade das fêmeas, sendo que o tratamento com extrato em diclorometano de ramos na maior concentração (888 ppm) afetou significativamente o número de ovos colocados pela praga (154,67 ovos/fêmea), reduzindo em quase 80 % esse número quando comparado com os registrados nos controles, água deionizada e acetona a 5 % (661,13 e 678,63, respectivamente (Tabela 3.3).

De forma inesperada, nos tratamentos com extrato aquoso de amêndoas (39 e 225 ppm) e com extrato de ramos em diclorometano (39 ppm), o número de ovos colocados por fêmea foi superior a 600 (Tabela 3.3). Justifica-se tamanha quantidade de ovos em conseqüência de uma tendência de maior longevidade das fêmeas tratadas com os respectivos extratos, apesar de não ter sido constatada diferença significativa. As moscas tratadas com o extrato aquoso de amêndoas de nim (39 ppm) sobreviveram em média 28,50 dias e na concentração imediatamente superior (225 ppm) as moscas sobreviveram 25,50 dias; já quando utilizou-se o extrato de ramos em diclorometano (39 ppm) as moscas sobreviveram, em média, 23,63 dias (Tabela 3.3). Os três tratamentos tenderam a proporcionar uma longevidade média das fêmeas superior em comparação a todos os outros tratamentos, inclusive os controles, água deionizada (21,75 dias) e

acetona a 5 % (18,75 dias). Considerando que apenas duas fêmeas foram utilizadas por repetição, observa-se que nesses tratamentos (extrato aquoso de amêndoas de nim (39 e 225 ppm) e extrato de ramos em diclorometano (39 ppm) pelo menos uma fêmea sobreviveu por 36; 43 e 46 dias, respectivamente (Tabela 3.2), resultados numericamente superiores aos registrados nos demais tratamentos incluindo os controles. As fêmeas nesses tratamentos ao longo do experimento sempre estiveram acompanhadas no mínimo por um macho (Tabela 3.2), aumentando a possibilidade de realizar várias cópulas durante o ensaio.

Observando-se o ritmo de postura das fêmeas nos diferentes tratamentos, nota-se, que nos controles, água deionizada e acetona a 5 %, foram colocados em média 30,69 e 31,92 ovos/fêmea/dia respectivamente, ao passo que no tratamento com extrato de ramos em diclorometano (888 ppm) o valor foi de 12,67 ovos/fêmea/dia (Tabela 3.3), indicando que, nesse último tratamento, a fecundidade das moscas-das-frutas realmente foi afetada, reduzindo em cerca de 60 % o número de ovos colocados diariamente quando comparados aos controles.

Freqüentemente existem erros de interpretação na literatura com relação aos parâmetros longevidade versus fecundidade. Assim, DI ILIO et al. (1999) discutem que induziram a quase completa esterilização de *C. capitata* com o uso da concentração de 10.000 ppm (10µl/ml) de extrato aquoso de nim na dieta das moscas. No entanto, tal interpretação foi equivocada, pois as fêmeas apresentaram longevidade de apenas quatro dias (inicio do período de oviposição) e, desse modo, o que realmente aconteceu foi um efeito tóxico nessa concentração e na imediatamente inferior (5.000 ppm - 5µl/ml), na qual a longevidade foi de 9,4 dias. Para evitar problemas desse tipo, é recomendável a utilização de concentrações subletais para avaliar o efeito de derivados do nim sobre os parâmetros reprodutivos.

Considerando-se, por outro lado, os valores extremos de fecundidade total, verifica-se que nos tratamentos controles, água deionizada e acetona a 5 %, os valores máximos foram 789,50 e 1.316,00 ovos e os valores mínimos foram 515,50 e 377,00, respectivamente, enquanto no tratamento com extrato de ramos em diclorometano na maior concentração registrou-se fecundidade total máxima de 212,50 ovos e mínima de 118,00 ovos. Considerando apenas a fecundidade total mínima de 377,00 (controle acetona a 5 %) e fecundidade total máxima de uma fêmea obtida nesse tratamento com extrato de ramos, houve redução de 43,63 % na oviposição da fêmea.

Tabela 3.3 - Médias (± EP) do período de pré-oviposição e fecundidade (ovos/fêmea) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à água tratada com extratos de diferentes estruturas de *Azadirachta indica* em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Tratamentos		Azadiractina (ppm)[1]	Período de pré-oviposição (dias)	Fecundidade[2] (mínimo – máximo)	Fecundidade diária[2,3] (mínimo – máximo)
Controle (água deionizada)		-	3,25 ± 0,25	661,13 ± 56,39 a (515,50 – 789,50)	30,60 ± 1,89 a (25,27 - 34,33)
Controle (acetona a 5 %)		-	3,25 ± 0,25	678,63 ± 215,58 a (377,00 - 1316,00)	31,92 ± 3,70 a (25,13 – 42,45)
Extrato aquoso de amêndoas	39 ppm	0,09539	3,25 ± 0,25	953,75 ± 145,87 a (524,50 - 1177,00)	34,57 ± 3,47 a (30,85 – 37,97)
	225 ppm	0,55034	3,00 ± 0,00	807,13 ± 243,37 a (312,50 - 1293,50)	28,72 ± 5,78 a (20,83 – 40,42)
	888 ppm	2,17199	3,25 ± 0,25	557,00 ± 186,54 ab (245,00 - 1005,50)	23,26 ± 3,03 ab (14,11 – 34,67)
Extrato de folhas em metanol	39 ppm	0,00002	3,50 ± 0,29	412,38 ± 137,69 ab (257,00 – 825,00)	33,20 ± 4,71 a (17,69 – 64,25)
	225 ppm	0,00013	3,25 ± 0,25	405,75 ± 32,09 ab (321,50 – 471,00)	25,09 ± 0,96 ab (17,86 – 31,11)
	888 ppm	0,00053	3,00 ± 0,00	509,50 ± 130,80 ab (287,00 – 806,00)	21,50 ± 4,50 ab (17,94 -36,64)
Extrato de ramos em diclorometano	39 ppm	-	3,50 ± 0,29	641,13 ± 157,25 a (196,50 – 927,00)	27,50 ± 5,78 ab (14,04 – 26,88)
	225 ppm	-	3,25 ± 0,25	408,38 ± 56,65 ab (274,50 – 545,00)	18,00 ± 1,29 ab (18,30 – 25,95)
	888 ppm	-	3,50 ± 0,29	154,67 ± 20,69 b (118,00 – 212,50)	12,67 ± 0,85 b (7,87 -17,71)
F (tratamentos)			$0,54^{NS}$	3,53**	3,32**
Coeficiente de variação - CV (%)			14,57	8,10	9,87

[NS]Não significativo; **Significativo

[1]Para o extrato de ramos em diclorometano não foi detectada a presença de azadiractina

[2]Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

[3]Médias de dados originais; para análise estatística os dados foram transformados pelo Método da Potência Ótima de Box-Cox com $\lambda = \log_{10}(x)$

Avaliando-se a fecundidade diária, nota-se uma redução do número de ovos colocados de forma dose-dependente, embora, não necessariamente tenha ocorrido diferença estatística entre médias. Assim, no tratamento com o extrato aquoso de amêndoas (39 ppm), a oviposição diária foi de 34,57 ovos/fêmea, a qual foi reduzida em 32,72 % com aumento da concentração para 888 ppm. Da mesma forma, com o extrato em metanol das folhas houve redução de 35,24 % (de 33,20 para 21,50 ovos/fêmea/dia) da menor (39 ppm) para a maior concentração (888 ppm). De forma mais drástica, com a utilização do extrato em diclorometano de ramos, houve redução de 53,93 % dos ovos colocados com o aumento da concentração (de 39 para 888 ppm).

O efeito na fisiologia da fêmea tratada com extrato de ramos em diclorometano (888 ppm) foi estável ao longo do tempo, ou seja, não ocorreram variações bruscas de fecundidade. O efeito fisiológico parece ser quase irreversível nessa espécie e os dados obtidos por DI ILIO et al. (1999) reforçam essa hipótese, quando os autores ofereceram a fêmeas de moscamed dieta tratada com extrato aquoso de nim por 24 h e, após esse período, colocaram as moscas em dieta não tratada e, ainda assim, houve redução superior a 90 % no número de ovos. Efeito semelhante foi demonstrado em fêmeas de *Rhagoletis indifferens* Curran (VanRANDEN e ROITBERG, 1998). A exposição das fêmeas a um inseticida à base de nim na dieta, por um período de 18, nove ou cinco dias (iniciando logo após a emergência) induziu a 100 % de esterilização nas maiores concentrações (1 e 10 % do produto na dieta), mantendo o efeito quando as moscas foram expostas apenas por dois dias nessas concentrações (1 e 10 %), com redução na fecundidade em 75,4 e 64,4 %, respectivamente. Por outro lado, os autores demonstraram que a idade da mosca exposta ao tratamento influencia na sua suscetibilidade, já que quando as moscas com sete e nove dias de idade foram expostas ao produto, por um período de dois e nove dias, respectivamente, não houve efeito do produto na fecundidade dessa espécie. Os resultados demonstrados por VanRanden e Roitberg (1998) suportam a hipótese que a aplicação, após passadas as fases iniciais do ciclo gonadotrópico, provavelmente é ineficaz (REMBOLD; SIEBER, 1981a, b)

Além do efeito provocado na fecundidade do inseto, o extrato de ramos em diclorometano também provocou redução na viabilidade dos ovos, embora na primeira avaliação, feita com ovos do primeiro dia de oviposição, o efeito não tenha sido significativo (Tabela 3.4). No quarto dia de oviposição, por outro lado, o extrato de ramos em diclorometano (888 ppm) reduziu em 35,60 pontos percentuais (44,95 %) a fertilidade quando comparado com o controle acetona a 5 %, ainda que a média desses dois tratamentos não tenham diferido significativamente, verificando-se

que a média daquele tratamento diferiu apenas da registrada com o uso do extrato aquoso de amêndoas (888 ppm) (91,89 % de viabilidade) e do próprio extrato em diclorometano de ramos em menor concentração (39 ppm) (92,40 % de viabilidade). Em hipótese, a alta viabilidade constatada quando as moscas foram tratadas com o extrato aquoso de amêndoas (888 ppm de extrato – 2,17 ppm de azadiractina) pode ser explicada pela ocorrência de fagodeterrência. Dessa forma, os adultos não ingeriram água no algodão embebido e obtiveram substâncias líquidas da própria dieta (proteína hidrolisada e açúcar na proporção de 1:3), já que embora essa dieta seja sólida, com o decorrer do tempo ela acaba se liquefazendo. Em relação ao extrato em diclorometano de ramos, a diferença significativa entre a menor e a maior concentração certamente foi devida à diferença na concentração de compostos ativos.

No oitavo dia de oviposição o efeito sobre a fertilidade foi significativo, sendo que o tratamento que causou a maior redução de fertilidade foi o extrato de ramos em diclorometano (888 ppm), no qual a fertilidade média (55,16 %) foi significativamente inferior às obtidas nos demais tratamentos, com exceção do mesmo extrato nas menores concentrações (39 e 225 ppm, com valores de 84,39 e 64,35 %, respectivamente) e do extrato aquoso de amêndoas na concentração de 888 ppm (73,24 %). Nos tratamentos que propiciaram maior fertilidade (incluindo-se os controles), os valores variaram entre 86,49 e 96,89 %. Assim como no primeiro dia de oviposição, também no 12º dia também não houve efeito significativo dos tratamentos.

Os resultados corroboram os relatos de Di Ilio et al. (1999) para *C. capitata*, cujas fêmeas expostas à dieta com extrato aquoso de sementes de nim, tiveram redução da fecundidade. Salles e Rech (1999), estudando o efeito de torta de nim dissolvida em água e ingerida pelo adulto de *Anastrepha fraterculus* (Wied.), notaram uma redução significativa no número de ovos por fêmea e na eclosão de larvas. Nakano e Romano (2002), em experimento onde o óleo de nim foi exposto a fêmeas de moscamed na forma de isca tóxica, associado ao mel, constataram que a azadiractina a 30 ppm esterilizam as moscas dessa espécie, ou seja, as moscas não colocaram ovos no período avaliado.

A fecundidade e a fertilidade de *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) e *Bactrocera dorsalis* (Hendel) também foram afetadas quando extratos aquosos de amêndoas de nim e azadiractina pura foram ministrados via ingestão, como fonte de água (SINGH, 2003). O autor demonstrou que ocorreu redução significativa no número de ovos colocados quando foi utilizado extrato aquoso de amêndoas de nim na concentração de 300 ppm (1,20 ppm de azadiractina) chegando

até uma completa esterilização na concentração de 2.500 ppm (10 ppm de azadiractina), para moscas de ambas as espécies com 10 dias de idade. Nas avaliações posteriores, onde as moscas estavam com 15 e 20 dias de idade, houve redução no número de ovos colocados, porém em menor intensidade. Utilizando azadiractina pura o autor constatou uma completa esterilização na concentração de 2 ppm nas três datas avaliadas, quando as moscas atingiram 10, 15 e 20 dias de idade. No presente trabalho, o extrato aquoso de amêndoas na maior concentração 888 ppm (2,17 ppm de azadiractina) não causou efeito significativo na fecundidade das moscas. Contudo, o esforço amostral nesse ensaio foi maior e os dados abrangem todo o período reprodutivo do inseto, sendo que em alguns tratamentos a fecundidade foi avaliada por 42 dias consecutivos.

Diferentemente, Stark, Vargas e Thalman (1990) não registraram efeito significativo em relação à fecundidade e à fertilidade de *C. capitata* e *B. dorsalis*, quando as larvas de 3º ínstar e as pupas foram colocadas em areia tratada com azadiractina e os referidos parâmetros foram avaliados nos adultos emergidos, embora para *B. cucurbitae* tenha ocorrido redução da fecundidade nas maiores concentrações de azadiractina.

Os resultados descritos anteriormente sugerem que os adultos de moscas-das-frutas são mais suscetíveis ao tratamento com derivados do nim (principalmente a azadiractina) quando comparados com as larvas em trânsito (3º ínstar) e com as pupas, quando se analisam os parâmetros fecundidade e fertilidade, o que provavelmente, seja devido à estratégia reprodutiva utilizada pelas moscas-das-frutas.

Em moscas-das-frutas, a única inferência justificando a redução da fecundidade e da fertilidade baseia-se na redução do tamanho dos ovários das fêmeas. Observações histológicas registram redução do tamanho dos ovários de *C. capitata*, *B. cucurbitae* e *B. dorsalis*, após a moscamed se alimentar de dieta com extratos aquosos de amêndoas (DI ILIO et al., 1999) e as espécies de *Bactrocera* se alimentarem de solução de açúcar com pó de folhas de nim (KHAN; HOSSAIN; ISLAM, 2007). Os autores sugerem que as fêmeas tratadas com derivados do nim apresentam ovário imaturo quando comparado com o respectivo controle. Diferentemente, nas três espécies de moscas-das-frutas, as glândulas acessórias estavam com o tamanho semelhante ao controle, indicando maturidade destas (DI ILIO et al., 1999; KHAN; HOSSAIN; ISLAM, 2007).

Tabela 3.4 - Fertilidade média (± EP) de adultos de *Ceratitis capitata* expostos à água tratada com extratos de diferentes estruturas de *Azadirachta indica*, em laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Tratamentos		Azadiractina (ppm)[1]	Fertilidade (%)			
			1º dia	4º dia[2]	8º dia[2]	12º dia
Controle (água deionizada)		-	98,92 ± 0,76	80,56 ± 5,73 ab	87,30 ± 4,59 ab	74,13 ± 8,96
Controle (acetona)		-	88,08 ± 3,63	79,14 ± 9,37 ab	88,65 ± 7,47 ab	73,45 ± 12,36
Extrato aquoso de amêndoas	39 ppm	0,09539	83,46 ± 2,48	70,91 ± 17,03 ab	89,36 ± 3,26 ab	76,38 ± 9,74
	225 ppm	0,55034	93,08 ± 5,42	87,23 ± 3,49 ab	93,14 ± 4,52 ab	86,25 ± 1,29
	888 ppm	2,17199	96,94 ± 1,04	91,89 ± 5,03 a	73,24 ± 9,32 abc	67,23 ± 15,50
Extrato de folhas em metanol	39 ppm	0,00002	65,00 ± 22,17	86,77 ± 5,48 ab	91,17 ± 2,26 ab	83,88 ± 7,28
	225 ppm	0,00013	82,47 ± 8,88	82,50 ± 8,77 ab	86,49 ± 6,76 ab	83,47 ± 6,22
	888 ppm	0,00053	93,90 ± 3,35	86,09 ± 4,60 ab	96,89 ± 1,15 a	84,20 ± 4,89
Extrato de ramos em diclorometano	39 ppm	-	86,78 ± 4,91	92,40 ± 1,87 a	84,39 ± 5,67 abc	57,29 ± 5,97
	225 ppm	-	84,82 ± 8,49	71,57 ± 13,91 ab	64,35 ± 11,46 bc	39,51 ± 11,09
	888 ppm	-	92,89 ± 2,50	43,57 ± 14,56 b	55,16 ± 2,38 c	67,45 ± 11,45
F (tratamentos)			1,31[NS]	2,11**	4,45**	1,60[NS]
Coeficiente de variação - CV (%)			18,39	34,08	14,69	44,41

[NS]Não significativo; **Significativo

[1]Para o extrato de ramos em diclorometano não foi detectada a presença de azadiractina

[2]Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

As evidências sugerem que os compostos de nim possuem atividade específica nos ovários, sem afetar os demais órgãos do sistema reprodutivo das fêmeas.

Nesse experimento, os insetos, machos e fêmeas, foram vistos copulando cerca de 48 a 72 h após a emergência. Os relatos na literatura em relação ao efeito de compostos de nim sobre machos de insetos, com ênfase na reprodução dos mesmos, são extremamente raros. Existem relatos que a azadiractina pode causar efeitos fisiológicos sobre machos, podendo provocar degeneração de espermatócitos de *Mamestra brassicae* L. (SHIMIZU, 1988) e bloqueio da divisão celular no desenvolvimento dos espermatócitos em *Locusta migratoria* L. (LINTON; NISBET; MORDUE (LUNTZ), 1997). Efeitos de limonóides sobre machos de moscas-das-frutas ainda não foram registrados e, nesse ensaio aparentemente os machos não foram afetados; investigações aprimoradas nesse sentido, entretanto, são necessárias.

3.3 Conclusões

- ✓ As concentrações estimadas para matar 15, 30 e 45 % da população de moscamed são equivalentes a 38,68, 225,19 e 887,86 ppm de extrato aquoso de amêndoas de nim na isca, respectivamente;
- ✓ A longevidade de adultos e o período de pré-oviposição de fêmeas de *C. capitata* não são afetados pelo extrato aquoso de amêndoas, extrato de ramos em diclorometano e extrato de folhas em metanol, expostos como fonte de água nas concentrações de até 888 ppm;
- ✓ Há redução na fecundidade total e na fertilidade no 8º dia quando as fêmeas de moscamed se utilizam, como fonte de água, do extrato em diclorometano de ramos, a partir da concentração de 888 ppm.

Referências

ALVARENGA, C.D.; GIUSTOLIN, T.A.; QUERINO, R.B. Alternativas no controle de moscas-das-frutas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. (Coord.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG, 2006. cap. 11, p. 227-252.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London Series A**, London, v**.** 160, p. 268–282, 1937.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 165-179.

CRESONI-PEREIRA, C.; ZUCOLOTO, F.S. Moscas-das-frutas (Diptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos:** base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. cap. 18, p. 733-766.

DA CRUZ, I.B.M.; NASCIMENTO, J.C.; TAUFER, M.; OLIVEIRA, A.K. Morfologia do aparelho reprodutor e biologia do desenvolvimento. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 6, p. 55-66.

DI ILIO, V.; CRISTOFARO, M.; MARCHINI, D.; NOBILI, P.; DALLAI, R. Effects of a neem compound on the fecundity and longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 76-82, 1999.

DORN, A.; RADEMACHER, J.M.; SEHN, E. Effects of azadirachtin on reproductive organs and fertility in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. In: INTERNATIONAL NEEM CONFERENCE, 3., 1987, Nairobi. **Proceedings…** p. 273-288.

FEDER, D.; VALLE, D.; REMBOLD, H.; GARCIA, F.S. Azadirachtin-induced sterilization in mature females of *Rhodnius prolixus*. **Z Naturforsch**, v. 43c, p. 908-913, 1988.

GARCIA, E.S.; GONZALES, M.S.; AZAMBUJA, P. Effects of azadirachtin in *Rhodinius prolixus*: data and hypotheses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 107-111, 1991.

HUANG, Z.; SHI, P.; DAI, J.; DU, J. Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. **Pesticide Biochemistry Physiology**, Amsterdam, v. 80, p. 85–93, 2004.

HUANG, Z.; SHI, P.; CHEN, G.; DU, J. Effects of azadirachtin on hemolymph protein expression in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 100, p. 245-250, 2007.

KHAN, M.; HOSSAIN, A.M.; ISLAM, S.M. Effects of neem leaf dust and a commercial formulation of a neem compound on the longevity, fecundity and ovarian development of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera:Tephritidae). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 10, p. 3656-3661, 2007.

LINTON, Y.M.; NISBET, A.J.; MORDUE (LUNTZ), A.J. The effects of azadirachtin on the tests of the desert locust, *Schistocerca gragaria*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 43, p. 1077-1084, 1997.

LOWERY, D.T.; SMIRLE, M.J. Toxicity of insecticides to obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*, larvae and adults exposed previously to neem seed oil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 95, p. 201-207, 2000.

MARTINEZ, S. **O nim *Azadirachta indica*:** natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MORDUE, A.J.; SIMMONDS, M.S.J.; LEY, S.V.; BLANEY, W.M.; MORDUE, W.; NASIRUNDDIN, M.; NISBET, A. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science**, Oxford, v. 54, p. 277-284, 1998.

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

NAKANO, O.; ROMANO, F.C.B. Uso de reguladores de crescimento na esterilização da mosca-do-mediterrâneo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 115-125, 2002.

NOGUEIRA, N.F.; GONZÁLES, M.; GARCIA, E.M.; SOUZA, W. Effects of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 58–63, 1997.

PUZZI, D.; ORLANDO, A. Ensaios de combate às "moscas-das-frutas" *Ceratitis capitata* (Wied.) e *Anastrepha spp*. por meio de pulverizações de iscas envenenadas. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 21-25, 1957.

RAO, P.J.; GUPTASHASHI; MOHAN RAJ, D.; KRANTHI, K.R. Neem effects on *Spodoptera litura* (Fab.): a holistic study. In: WORLD NEEM CONFERENCE BY INDIA, 1., 1996, New Delhi. **Neem and environment:** proceedings... Oxford: IBH Publ., 1996. p. 357-374.

REMBOLD, H.; SIEBER, K.P. Effect of azadirachtin on oocyte development in *Locusta migratoria migratoriodes*. In: SCHMUTTERER, H.; ASCHER, K.R.S.; REMBOLD, H. (Ed.). **Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss)**. Eschborn: GTZ, 1981a. p. 75-80.

_____. Inhibition of oogenesis and ovarian ecdysteroid synthesis by azadirachtin in *Locusta migratoria migratoriodes*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, **C. Biosciences**, Tubingen, v. 36c, p. 466-469, 1981b.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 127 p.

SALLES, L.A.; RECH, N.L. Efeito de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 225-227, 1999.

SAS INSTITUTE. **SAS.** Cary, 2002-2003.

SAYAH, F. Ultrastructural changes in the corpus allatum after azadirachtin and 20-hydroxyecdisone treatment in adults females of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue and Cell**, Essex, v. 34, p. 53-62, 2002.

SAYAH, F.; FAYET, C.; IDAOMAR, M.; KARLINSKY, A. Effects of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Dermaptera). **Tissue and Cell**, Essex, v. 28, p. 741-749, 1996.

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

SCHULZ, W.D.; SCHLUTER, U. Structural damages caused by neem in *Epilachna varivestis*. A summary of histological and ultrastructural data. II. Ii. Tissues affected in adults. In: NEEM CONFERENCE, 2., 1984, Rauischolzhausen. **Proceedings…** Rauischolzhausen: GTZ, 1984. p. 237-252.

SENTHIL NATHAN, S.; KANDASWAMY, K.; CHUNG, P.G.; MURUGAN, K. Effects of neem limonoids on lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée (Lepidoptera: Pyralidae). **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 1388-1393, 2006.

SENTHIL NATHAN, S.; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K.; CHUNG, P.G. Efficacy of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Gueneé) (Lepidoptera: Pyralidae) the rice leaffolder. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 760-763, 2005.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SHIMIZU, T. Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, *in vitro*. **Entomologia Experimentalis et Applicta**, Dordrecht, v. 46, p. 197-199, 1988.

SIEBER, K.P.; REMBOLD, H. The effects of azadirachtin on the endocrine control of molting in *Locusta migratoria*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 29, p. 523-527, 1983.

SINGH, S. Effects of aqueous extract of neem seed kernel and azadirachtin on the fecundity, fertility and post-embryonic development of the melonfly, *Bactrocera cucurbitae* and the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, p. 540-547, 2003.

STARK, J.D.; VARGAS, R.I.; THALMAN, R.K. Azadirachtin: Effects on metamorphosis, longevity, and reproduction of three tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, London, v. 83, n. 6, p. 2168-2174, 1990.

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

Van RANDEN, E.J.; ROITBERG, B.D. Effect of a neem (*Azadirachta indica*)-based insecticide on oviposition deterrence, survival, behavior and reproduction of adult western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, London, v. 91, n. 1, p. 123-131, 1998.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. cap. 11. p. 181-190.

4 EFEITO DO NIM SOBRE O COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO DE *CERATITIS CAPITATA*: SUBSÍDIOS PARA O EMPREGO DA ESTRATÉGIA DE *PUSH-PULL* NO VALE DO SÃO FRANCISCO, BRASIL

Resumo

Avaliou-se o efeito deterrente de oviposição do extrato metanólico de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) em diferentes concentrações (0; 10.000; 18.000; 32.000 e 56.000 ppm) para *Ceratitis capitata* (Wied.) visando ao seu controle em parreirais de uva. Para tanto, bagas de uva foram mergulhadas por 5 segundos em água deionizada (controle) ou em um dos tratamentos à base de nim e expostas durante 24 h a três casais de moscas com cinco dias de idade, sem e com experiência prévia, em teste com chance e sem chance de escolha. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 15 repetições. Os dados foram avaliados conforme o Índice de Deterrência (ID) = 2G / (G+P) onde G = % de ovos no tratamento e P = % de ovos no controle. Com base no ID e no desvio padrão, determinou-se o Intervalo de Classificação (IC) para as médias. O número de ovos por punctura e a % de puncturas, no teste com chance de escolha, foram analisadas através do teste t de Student. Os números de ovos, de puncturas por baga e de ovos por punctura obtidos no ensaio sem chance de escolha foram submetidos ao teste F e quando detectada diferença, ao teste de Tukey. O extrato de folhas em metanol provocou deterrência de oviposição para *C. capitata* quando pulverizados em bagas nas concentrações ≥ 18.000 ppm em experimento com chance de escolha. Em condições de confinamento, entretanto esse extrato, mesmo na concentração de 56.000 ppm, não afetou o comportamento de *C. capitata*. A experiência recente de *C. capitata* não alterou a sua resposta em relação a bagas de uva tratadas com extrato de folhas em metanol em condição de livre escolha. O papel da repelência e ou deterrência de oviposição e do aprendizado para *C. capitata* são discutidos.

Palvras-chave: *Azadirachta indica*; *Ceratitis capitata*; Repelência; Deterrência de oviposição; Aprendizado por insetos; *Vitis vinifera*

Abstract

The deterrent oviposition effect of the methanol extract from neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss) in different concentrations (0; 10,000; 18,000; 32,000 and 56,000 ppm) was evaluated in relation to adults of *Ceratitis capitata* (Wied.), aiming its control on grape cropping. For that, grapes were immersed for 5 seconds in deionized water (control) or in one of the treatments with neem and exposed for 24 h to three five days old couples, with or without learning, in free-choice or no-choice test. The experiment was completely randomized with 15 replicates for each treatment. The data were evaluated according to the Deterrence Index (ID) = 2G / (G+P), where G = percentage of eggs laid in the treatment and P = percentage of eggs laid in control. The classification interval (CI) for the means was estimated based on the ID index and the standard deviation. The number of eggs per puncture and the percentage of punctures from the choice test were analyzed by the Student's t-Test. The number of eggs, punctures per fruit and eggs per puncture from the no-choice test were submitted to the F-test and when significant differences were detected, the Tukey test was used to compare the means. The leaf extract in methanol provoked oviposition deterrence for *C. capitata* when applied on grapes at

concentrations ≥ 18,000 ppm in free-choice condition. In no-choice condition, however, this extract even at concentration of 56.000 ppm did not affect the *C. capitata* behavior. When *C. capitata* with previous experience was used at the free-choice test, its response to treated grapes was not affected. The role of the oviposition repellent and /or deterrence effect and the *C. capitata* learning are discussed.

Keywords: Neem; Fruit fly; Repellent; Oviposition deterrent; Insect learning; Grapes

4.1 Introdução

O Submédio do rio São Francisco está localizado nos estados de Pernambuco e da Bahia, onde se destaca o pólo de Petrolina e Juazeiro, com mais de 46 mil hectares implantados com fruticultura irrigada, com empreendimentos de grande porte e iniciativas envolvendo pequenos produtores. A região é atualmente a maior produtora nacional de uvas finas de mesa, *Vitis vinifera* (L.), contribuindo com 95 % das exportações brasileiras dessa fruta. Responde ainda por 92 % dos embarques de manga para os mercados europeu e norte-americano (REETZ et al., 2009). A uva é a fruta que proporciona a maior receita na pauta das exportações brasileiras. Em 2008, suas vendas externas somaram US$ 171,4 milhões, correspondendo a 23,6 % do total de exportações de frutas frescas. Com isso, o Vale do São Francisco (nos estados da Bahia e de Pernambuco) consolida-se como o maior pólo exportador de frutas do Brasil (REETZ et al., 2009).

Há pelo menos três décadas, Malavasi, Morgante e Zucchi (1980) relataram que a mosca-do-mediterrâneo (moscamed), *Ceratitis capitata* (Wied.), ocorria em baixa freqüência no Nordeste brasileiro, região onde até então os hospedeiros estavam dispersos, sem a formação de pomares. Uma década mais tarde, Haji et al. (1991) registraram que a moscamed limitava-se às áreas urbanas de Petrolina e Juazeiro no Submédio São Francisco. No entanto, corroborando com o prognóstico de Malavasi, Morgante e Zucchi (1980), que afirmou esperar aumento da freqüência de *C. capitata* com o surgimento de plantações extensas de hospedeiros nessa região, Haji et al. (2005) demonstraram, recentemente, um aumento expressivo da população de moscamed em áreas de produção, sendo que dos 627.272 espécimes de tefritídeos coletados por meio de armadilhas durante 1989 a 2005, no Submédio São Francisco (pólo Petrolina e Juazeiro), 95 % eram de moscamed. Até 1997, nas áreas rurais desta região a população de *Anastrepha* spp. se sobrepunha à de *C.* capitata, mas, a partir de então, a população de moscamed passou a ser

dominante nas áreas rurais (HAJI et al., 2005). Em 2007, do total de espécimes registrados na área rural dessa região 99 % eram de *C. capitata* (VIANA et al., 2008).

Nessa região, *C. capitata* utiliza hospedeiros primários, tais como acerola (*Malphigia glabra* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.), cultivados no perímetro de irrigação próximo de áreas com uva. Após amadurecerem sexualmente, os adultos se dispersam para os pomares e as fêmeas ovipositam nas frutas de uva, o que explica a concentração do dano e das capturas em armadilhas nas bordaduras dos pomares. Apesar de já existirem evidências que a moscamed está iniciando um processo de colonização de cultivares de uva no pólo Petrolina/Juazeiro (HABIBE et al., 2006; GÓMEZ et al., 2008), ainda se acredita que nos parreirais de uva não existem populações de moscas residentes, devido à baixa adequação destas como hospedeiras.

O controle da moscamed em áreas cultivadas com uvas finas de mesa atualmente é uma incógnita nessa região. A utilização de inseticidas sintéticos em iscas tóxicas não é possível devido os atrativos registrados no país mancharem as bagas de uva. A aplicação de inseticidas em cobertura total representa um risco para os trabalhadores (na região há cerca de cinco trabalhadores por hectare de uva, segundo REETZ et al., 2009). Além disso, os inseticidas podem causar a proliferação de pragas secundárias como a mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Genn.), a eliminação de inimigos naturais e a presença de resíduos no fruto, com possível perda de mercado internacional.

Recentemente, a estratégia de *push-pull* foi proposta como ferramenta no manejo integrado de pragas. Essa técnica é um método de manipulação comportamental utilizando repelentes ou deterrentes (*push*) e atrativos ou estimulantes (*pull*), sendo que o primeiro estimula o movimento da praga enquanto, simultaneamente, o segundo atrai a população dos insetos para o mesmo local, facilitando o seu manejo (COOK; KHAM; PICKETT, 2007). Diversos aspectos relacionados ao comportamento biológico e ecológico da moscamed em parreirais de uva no pólo Petrolina/Juazeiro têm permitido hipotetizar o emprego da estratégia de *push-pull* utilizando derivados do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) como agentes repelentes ou deterrentes de oviposição e atrativos ou estimulantes, como armadilhas Mcphail, hospedeiros primários como planta armadilha e ou aplicação de isca tóxica na madeira que estrutura o parreiral.

O sistema *push-pull* não é indicado para espécies com alta taxa de crescimento populacional; outra desvantagem é o risco de aprendizagem dos insetos (COOK; KHAM;

PICKETT, 2007). No caso específico, as moscas não são residentes nos pomares, o que implica em baixa população a ser controlada e também em redução do risco de ocorrência de aprendizagem.

A aprendizagem (experiência) tem sido observada alterando o comportamento de oviposição de insetos (CUNNINGHAM et al., 1998; ROJAS; WYATT, 1999). A compreensão do seu papel é essencial para a adequada avaliação de repelentes e ou deterrentes, constituindo-se em um dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento efetivo de métodos de manipulação comportamental por meio do uso desses grupos de substâncias em campo (LIU; LIU, 2006). O comportamento de aprendizagem de insetos fitófagos inclui a habituação, a sensibilização, a aprendizagem associativa e a indução da preferência (PAPAJ; PROKOPY, 1989; PROKOPY; LEWIS, 1993).

Investigações realizadas com plantas não hospedeiras ou seus extratos têm demonstrado que a experiência (aprendizado) recente do inseto pode induzir à oviposição em plantas não-hospedeiras ou a preferência por plantas hospedeiras tratadas por extratos de plantas não-hospedeiras (LIU et al., 2005; LIU; LIU, 2006; ZHANG et al., 2007; WANG et al., 2008).

Diante do contexto, avaliou-se o efeito do extrato de folhas de nim sobre o comportamento de oviposição de fêmeas de *C. capitata*, com e sem experiência recente, em bagas de uva cultivar Itália.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Insetos

Os insetos estudados foram mantidos conforme metodologia adaptada de Carvalho e Nascimento (2002) e Walder (2002) e descrita anteriormente (Capítulo 2, item 2.2.1.1).

4.2.1.2 Extratos

O extrato de folhas em solvente metanol foi obtido conforme descrito no Capítulo 2, item 2.2.1.2. O conteúdo de azadiractina do extrato em estudo foi de 0,60 mg de azadiractina / kg de extrato metanólico de folhas.

4.2.1.3 Efeito sobre o comportamento de oviposição

4.2.1.3.1 Com chance de escolha

Para avaliar a possível deterrência de oviposição causada pelo extrato de folhas em metanol em diferentes concentrações (0, 10.000, 18.000, 32.000 e 56.000 ppm), foi realizado um ensaio com chance de escolha pela praga. Para tanto, foram utilizadas gaiolas de plástico transparente de 16 cm de altura e 13 cm de diâmetro, com tampa e fundo plástico.

Na tampa, um orifício de 6 cm de diâmetro, coberto com tela anti-afídeo, permitia a aeração da gaiola. Um orifício lateral da gaiola permitia a liberação dos insetos infestantes. As moscas-das-frutas foram introduzidas na gaiola logo após a emergência, onde foram disponibilizadas água deionizada e dieta artificial (proteína hidrolisada e açúcar (proporção de 1:3) *ad libitum*. Após a alimentação, a maturação sexual e a cópula, as moscas, com cinco dias de idade, foram expostas a bagas de uva cultivar Itália durante 24 h.

As bagas de uva foram mergulhadas por 5 segundos em água deionizada (tratamento controle) ou em um dos tratamentos à base de nim. Após serem tratadas, as uvas foram dispostas por cerca de 10 min sobre papel toalha para retirada do excesso de umidade. Posteriormente, foram amarradas em pedaços de barbantes, os quais foram presos na parte superior das gaiolas, mantendo as duas bagas suspensas de forma eqüidistante (Figura 4.1). Passadas 24 h, as uvas foram retiradas e foi registrado o número de ovos, o número de puncturas e o número de ovos por punctura em cada baga.

Um segundo ensaio foi conduzido para avaliar a aprendizagem recente das fêmeas (isto é, a habituação ao tratamento após experiência recente). Após a retirada das bagas, novamente foram colocados outras bagas de uva (tratado e controle) para as mesmas fêmeas de moscamed, então com seis dias de idade. Estas permaneceram por mais 24 h e após esse período foram avaliados os mesmos parâmetros citados anteriormente. Em ambos, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 15 repetições.

4.2.1.3.2 Sem chance de escolha

Para o teste sem chance de escolha utilizaram-se os mesmos tratamentos citados no item 4.2.1.3.1, sendo utilizada uma uva (no interior da gaiola) tratada com uma das concentrações do extrato de nim ou não tratada (controle), a qual foi exposta às fêmeas de cinco dias de idade. Novamente foi avaliado o número de ovos, o número de puncturas e o número de ovos por punctura em cada baga após 24 h de exposição.

Da mesma forma, subseqüentemente após a retirada das uvas, outras bagas foram penduradas para avaliação do efeito da experiência recente em teste sem chance de escolha, para moscas com seis dias de idade. Em ambos, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 15 repetições.

Figura 4.1 - Experimento de deterrência de oviposição. A) Moscamed ovipositando em baga de uva; B) Ensaio com chance de escolha; C) Ensaio sem chance de escolha

4.2.1.4 Análise estatística

Para a análise da deterrência de oviposição, foi utilizado o Índice de Deterrência (ID) (adaptado de LIN; KOGAN; FISCHER, 1990), calculado pela fórmula: ID = 2G / (G+P) onde G = % de ovos na baga de uva tratada e P = % de ovos no controle, nos experimentos para avaliação da deterrência. Com base no ID e no desvio padrão obtidos, determinou-se o Intervalo de Classificação (IC) para as médias dos tratamentos, pela fórmula: IC $=1 \pm t_{(n-1;\propto=0.05)} \times \frac{DP}{\sqrt{n}}$; onde t = valor de "t" tabelado a 5 % de probabilidade; DP = desvio padrão; n = número de repetições. Os extratos foram considerados neutros quando o valor do ID ficou compreendido dentro do IC, repelentes ou deterrentes quando o valor do ID foi inferior ao menor valor obtido para o IC e atraentes ou estimulantes quando o ID foi superior ao maior IC calculado.

Para o número de ovos por punctura e a porcentagem de puncturas de fêmeas sem e com experiência nas diferentes faixas de ovos (0 a 5; 6 a 10; 11 a 15; e acima de 15 ovos), foram utilizados o teste t de Student comparando as médias (tratamento e controle) do teste com chance de escolha.

Os dados (número de ovos e de puncturas por baga e número de ovos por punctura) obtidos do ensaio sem chance de escolha, de adultos sem e com experiência recente, foram analisados conforme a análise de variância pelo teste F e quando detectada diferença significativa o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias. Os testes de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) foram aplicados para avaliar as pressuposições de homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e a normalidade dos resíduos, respectivamente. Nesse estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa SAS de computação estatística (SAS INSTITUTE, 2003).

4.2.2 Resultados e discussão

4.2.2.1 Efeito sobre o comportamento de oviposição com chance de escolha

Comparando-se a oviposição de *C. capitata* em bagas de uva pulverizadas com extrato de metanol de folhas de nim em diferentes concentrações (10.000, 18.000, 32.000 e 56.000 ppm) e seus respectivos controles (Tabela 4.1) observou-se efeito deterrente de oviposição nas

concentrações iguais ou acima de 18.000 ppm (1,8 %) do extrato, tanto para fêmeas que já tinham tido experiência em colocar ovos em bagas de uvas tratadas com extrato (fêmeas com experiência recente) como para aquelas sem experiência recente.

No caso das fêmeas sem experiência, com o uso de concentrações maiores ou iguais a 18.000 ppm, os números de ovos colocados nas bagas tratadas foram inferiores a 25 % do total (23,10, 23,19 e 21,77 %, respectivamente, nas concentrações de 18.000, 32.000 e 56.000 ppm) contra mais de 75 % do total de ovos nos respectivos controles (Tabela 4.1). Na menor concentração, houve tendência para o efeito deterrente, já que apenas 33,16 % dos ovos foram colocados nas bagas tratadas, porém esse comportamento não foi confirmado pelo índice de deterrência adotado (ID), sendo, portanto, o referido tratamento classificado como neutro (Tabela 4.1). Contudo, numa segunda análise, dessa vez avaliando o número de puncturas por baga, registrou-se redução do número de puncturas em todas as concentrações avaliadas, sendo, consequentemente, o extrato caracterizado como deterrente de oviposição para essa espécie de mosca-das-frutas (Tabela 4.1).

Nas concentrações onde houve deterrência com base nos dois parâmetros avaliados (número de ovos e de punctura por baga), ou seja, nas concentrações maiores ou iguais a 18.000 ppm, os resultados foram muito próximos, indicando que a resposta das fêmeas não variou com o aumento da concentração do extrato e, consequentemente, da concentração da azadiractina, a qual correspondeu a 0,0060; 0,0108; 0,0192 e 0,0336 ppm para as concentrações com 10.000, 18.000, 32.000 e 56.000 ppm do extrato, respectivamente.

Foi demonstrado que as fêmeas preferem realizar maior número de puncturas, bem como, colocar um maior número de ovos no tratamento controle. Contudo, apesar de ter sido caracterizada a deterrência de oviposição, houve registro de oviposição nas bagas tratadas em qualquer uma das concentrações do extrato.

A mesma tendência foi constatada com o uso de fêmeas que já possuíam experiência recente em colocar ovos em bagas de uvas tratadas com extratos de planta não hospedeira. Também nesse caso, o uso de concentrações maiores ou iguais a 18.000 ppm provocou deterrência nas moscas, sendo que os números de ovos colocados nas bagas tratadas foram inferiores a 30 % do total (26,18, 27,33 e 25,39 %, respectivamente, nas concentrações de 18.000, 32.000 e 56.000 ppm) contra mais de 70 % do total de ovos nos respectivos controles (Tabela 4.1). Ainda de forma similar ao verificado para fêmeas sem experiência, no tratamento

com 10.000 ppm houve tendência de menor quantidade de ovos (38,09 %) na baga tratada, mas, também nesse caso, o cálculo do ID indicou a ocorrência de neutralidade.

Assim como aconteceu com as fêmeas de moscamed inexperientes, também com o uso de moscas experientes, houve deterrência de oviposição em todas as concentrações do extrato quando foi considerado o parâmetro puncturas por baga (Tabela 4.1), sendo que os percentuais de puncturas por baga nos respectivos tratamentos variaram entre 38,82 % na menor concentração do extrato a 25,22 % na maior concentração.

Também nesse caso (puncturas/baga), nas concentrações maiores ou iguais a 18.000 ppm, os resultados foram muito próximos, indicando que a resposta das fêmeas não variou com o aumento da concentração de azadiractina nas bagas de uva. Aparentemente, a azadiractina não é o principal ou o único composto responsável pelo efeito deterrente de oviposição sobre insetos. Estudos realizados por Qiu, Van Loon e Roessingh (1998) demonstraram que o óleo comercial de amêndoas de nim (Margosan-O®) causou inibição significativa da oviposição de *Plutella xylostella* (L.). A azadiractina, o triterpenóide com maior atividade inseticida encontrado em Margosan-O®, foi inativo em relação à oviposição da praga, mesmo utilizando o composto puro na mesma concentração encontrada em Margosan-O® (5 %). Observações sugerem que outros limonóides contidos em derivados do nim, tais como nimbina, 6-desacetilnombina, salanina, 6-acetilnimbandiol e nimbandiol, bem como outras substâncias químicas polares não identificadas, podem aumentar a eficiência de produtos naturais à base de azadiractina (STARK; WALTER, 1995).

A influência do aprendizado (experiência) para *C. capitata* já foi demonstrada na busca por hospedeiros, onde o conhecimento pré-imaginal dos imaturos propicia a escolha de acordo com a experiência (PROKOPY; GREEN; WONG, 1989). Outros estudos têm revelado que após as fêmeas pousarem nos frutos hospedeiros, a aceitação ou rejeição deste, é condicionada pela experiência de oviposição recente do adulto. Cooley et al. (1986) demonstraram que, após cinco oviposições da moscamed nos hospedeiros *Fortunella japonica* (Thunb.) Swingle ou *Malus sylvestris* (L.) Mill., a aceitação desses hospedeiros posteriormente, um ou outro, foi condicionada ao aprendizado recente (primeiras cinco oviposições). Da mesma forma, após três dias de oviposição em um hospedeiro, a aceitação deste posteriormente também foi condicionada (COOLEY et al., 1986; PAPAJ et al., 1987).

Tabela 4.1 - Porcentagem de ovos e de puncturas de *Ceratitis capitata* (com e sem experiência recente) em bagas de uva e índice de deterrência de oviposição (ID ± EP), obtidos 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* em experimento com chance de escolha em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h)

Experiência	Concentração[1] (ppm)	Ovos / baga				Puncturas / baga			
		Ovos (%)	ID[2] (M ± EP)	IC[3]	Classificação[4]	Puncturas (%)	ID[2] (M ± EP)	IC[3]	Classificação[4]
Sem experiência	10.000	33,16	0,66 ± 0,17	(0,64; 1,36)	Neutro	32,72	0,65 ± 0,13	(0,71; 1,29)	Deterrente
	Controle	66,84				67,28			
	18.000	23,10	0,46 ± 0,11	(0,76; 1,24)	Deterrente	29,98	0,60 ± 0,12	(0,75; 1,25)	Deterrente
	Controle	76,90				70,02			
	32.000	23,19	0,46 ± 0,10	(0,78; 1,22)	Deterrente	23,59	0,47 ± 0,10	(0,78; 1,22)	Deterrente
	Controle	76,81				76,41			
	56.000	21,77	0,44 ± 0,11	(0,76; 1,24)	Deterrente	24,06	0,48 ± 0,10	(0,78; 1,22)	Deterrente
	Controle	78,23				75,94			
Com experiência	10.000	38,09	0,76 ± 0,12	(0,75; 1,25)	Neutro	38,82	0,78 ± 0,10	(0,79; 1,21)	Deterrente
	Controle	61,91				61,18			
	18.000	26,18	0,52 ± 0,10	(0,79; 1,21)	Deterrente	27,66	0,55 ± 0,08	(0,83; 1,17)	Deterrente
	Controle	73,82				72,34			
	32.000	27,33	0,55 ± 0,12	(0,74; 1,26)	Deterrente	27,22	0,54 ± 0,12	(0,75; 1,25)	Deterrente
	Controle	72,67				72,78			
	56.000	25,39	0,51 ± 0,11	(0,77; 1,23)	Deterrente	25,22	0,50 ± 0,10	(0,79; 1,21)	Deterrente
	Controle	74,61				74,78			

[1]Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 10.000 ppm do extrato (0,0060 ppm de aza); 18.000 ppm do extrato (0,0108 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (0,0192 ppm de aza); 56.000 ppm do extrato (0,0336 ppm de aza);
[2]Índice de deterrência (ID); [3]Intervalo de classificação (IC);
[4]Classificação = Neutro: Compreendido dentro do Intervalo de classificação (IC<ID<IC); Deterrente: ID < IC; Atraente: ID > IC

O que tem em comum nesses trabalhos (COOLEY et al., 1986; PAPAJ et al., 1987) é que primeiro foi exposto um hospedeiro à fêmea (sem chance de escolha) e depois em experimento com chance de escolha, a mosca escolheu o hospedeiro conforme sua experiência recente. Talvez a exposição de fêmeas a bagas de uva tratadas em experimento sem chance de escolha com posterior exposição destas a bagas de uva em experimento com chance de escolha (tratado e controle) modifique os resultados registrados nesse trabalho em função da experiência recente exclusivamente com a baga tratada com o extrato vegetal. Investigações nesse sentido são necessárias para averiguar o papel da experiência recente na deterrência de oviposição de extratos de nim em relação à tefritídeos.

Assim como foi observado no presente trabalho, Chen et al. (1996) demonstraram que fêmeas de *Bactrocera dorsalis* (Hendel) não alteraram a resposta em relação aos frutos de goiaba tratados com extratos de *A. indica*. Os autores, expondo frutos de goiaba durante sete dias, com substituição destes a cada 24 h, verificaram que a deterrência de oviposição foi mantida.

Investigações estudando a experiência recente ou mesmo o conhecimento pré-imaginal relacionado a aleloquímicos repelentes ou deterrentes de oviposição são pouco freqüentes. Estudos demonstraram que a mariposa *Pluttella xylostella* (L.), diferentemente de *C. capitata* (presente trabalho) e de *B. dorsalis* (CHEN et al., 1996), possui a habilidade de utilizar experiências recentes a seu favor (LIU et al., 2005; LIU; LIU, 2006; ZHANG et al., 2007; WANG et al., 2008). Adultos dessa espécie emergidos de *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (repolho) são repelidos por *Chrysanthemum morifolium* L. em teste em olfatômetro. Entretanto, quando lagartas alimentadas em repolho são transferidas para o crisântemo para empupar, os adultos emergidos não são repelidos. Já quando as mariposas foram expostas ao contato prévio com o volátil (α-terpineno) do crisântemo por apenas 10 minutos, as fêmeas experientes foram atraídas pelo volátil em teste em olfatômetro, diferentemente dos inexperientes. Quando o volátil foi pulverizado sobre plantas de repolho os adultos inexperientes foram repelidos; já os adultos que foram expostos por 30 min a plantas de repolho tratadas e posteriormente testados não foram repelidos (WANG et al., 2008). O efeito do conhecimento pré-imaginal de aleloquímicos e sua relação com o subsequente comportamento de oviposição de *P. xylostella*, a princípio, tinha sido demonstrado por Akhtar e Isman (2003). No entanto, Liu S. e Liu T. (2006) demonstraram que não existe um efeito pré-imaginal quando lagartas de *P. xylostella* foram criadas em dieta artificial com Neemix® 4.5 (produto à base de nim) e o que realmente ocorre é o efeito da

experiência recente. Esses autores obtiveram os seguintes resultados: i) adultos emergidos de dieta artificial sofreram deterrência de oviposição quando o substrato de oviposição foi tratado com Neemix® 4.5; ii) adultos emergidos de dieta com Neemix® 4.5 prefiriram ovipositar em substrato tratado; iii) adultos emergidos de dieta, onde o seu casulo (invólucro pupal) foi removido um dia antes da emergência e colocado o casulo de insetos criados em dieta com Neemix® 4.5 prefiriram realizar postura em substrato tratado; iv) adultos emergidos de dieta, onde o casulo foi tratado com Neemix® 4.5 apenas um dia antes da emergência, prefiriram realizar postura em substrato tratado; v) adultos emergidos de dieta com Neemix® 4.5, onde o seu casulo foi removido totalmente e a sua pupa foi lavada com água deionizada, sofreram deterrência de oviposição quando o substrato de oviposição foi tratado com Neemix® 4.5. Em muitos casos, o contato do adulto ao emergir com as substâncias químicas presentes no interior da pupa ou na superfície do casulo tem induzido ao um condicionamento na emergência (*emergence conditioning*) (STORECK et al., 2000) ou experiência recente (*early adult learning*) (TURLINGS et al., 1993).

No presente trabalho, o número de ovos por punctura não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 4.2). A experiência recente da mosca não resultou em alteração no comportamento, mantendo-se o padrão de oviposição semelhante ao das fêmeas inexperientes. Com a concentração do extrato de folhas em metanol de 18.000 ppm, as moscas sem experiência tenderam a colocar uma quantidade superior de ovos por punctura no controle; assim, enquanto na baga de uva tratada as fêmeas colocaram 4,01 ovos/punctura, no controle o número de ovos/punctura foi o dobro, 8,32; estes números, porém, não diferiram significativamente entre si.

Os dados indicam menor número de ovos e de puncturas nas bagas tratadas, sugerindo estar ocorrendo deterrência de oviposição, conforme os valores obtidos no cálculo do índice de deterrência (ID) (Tabela 4.1). Normalmente, a deterrência de oviposição inibe ou desestimula a manutenção da oviposição. O segundo caso aparentemente não ocorreu, pois o comum seria aumento da freqüência de puncturas e redução do número de ovos por oviposição. No entanto, o numero de ovos por punctura apresentou o mesmo padrão da testemunha, independentemente da concentração do extrato ou da experiência da fêmea (Figura 4.2).

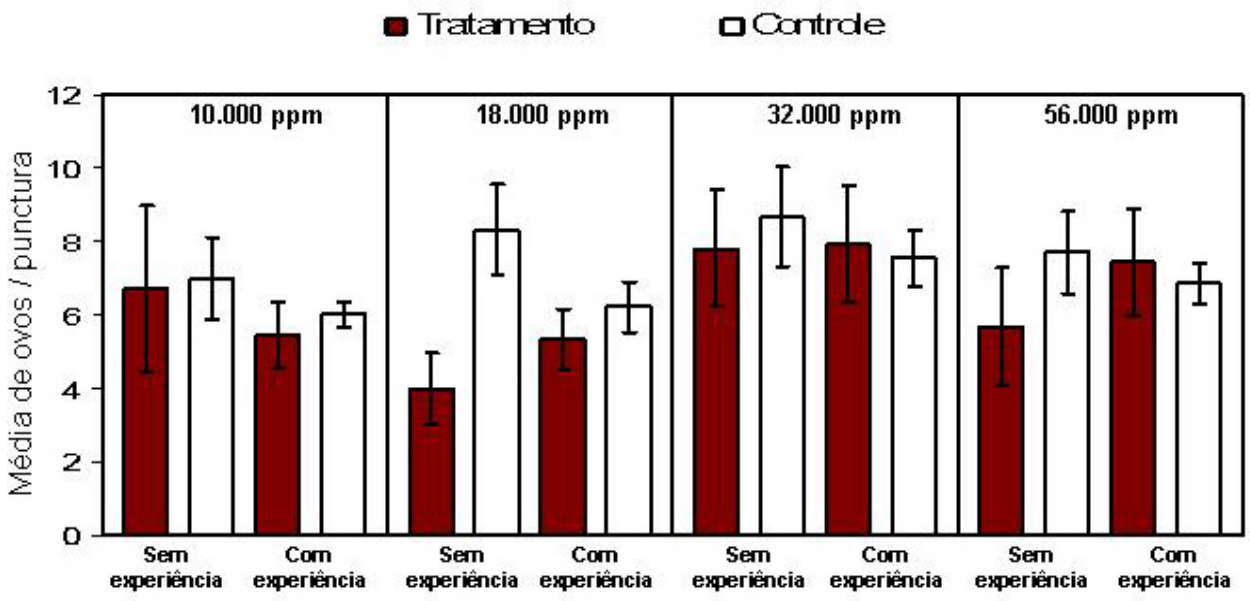


Figura 4.2 – Número médio de ovos por punctura de *Ceratitis capitata* (com e sem experiência) em bagas de uva, obtidos 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* em experimento com chance de escolha. Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h. Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 10.000 ppm do extrato (0,0060 ppm de aza); 18.000 ppm do extrato (0,0108 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (0,0192 ppm de aza); 56.000 ppm do extrato (0,0336 ppm de aza) (Teste t: não significativo na comparação entre tratamento e controle dentro de cada concentração)

Por meio da Figura 4.3, onde estão representados os dados de oviposição da moscamed em bagas de uva tratadas com extrato de folhas em metanol, com ou sem experiência recente, pode-se observar que, caso tivesse ocorrido deterrência de oviposição pautada no desestímulo à manutenção da oviposição, a maior freqüência de puncturas resultaria em menor quantidade de ovos (entre 0 e 5 ovos), enquanto no controle seria esperado que as oviposições resultassem em maior quantidade de ovos/punctura. Entretanto, os dados obtidos indicam que não houve diferença significativa na freqüência de puncturas (%) de acordo as faixas de ovos (0 a 5; 6 a 10; 11 a 15; > 15 ovos), ou seja, o comportamento de oviposição foi semelhante nas bagas tratadas e não tratadas. Para exemplificar, na Figura 4.3-A, estão expostos os dados de oviposição de fêmeas inexperientes em bagas de uva controle e tratadas com extrato na concentração de 10.000 ppm. Na baga tratada, 56,60 % das puncturas realizadas pelas fêmeas colocaram entre 0 e 5 ovos; 25,39 % das puncturas realizadas pelas fêmeas colocaram 6 a 10 ovos; 5,30 % das puncturas realizadas pelas fêmeas colocaram 11 a 15 ovos e finalmente 12,71 % das puncturas realizadas

pelas fêmeas colocaram acima de 15 ovos. Já no controle, os seguintes valores foram registrados: 44,38 % (0 a 5 ovos); 33,08 % (6 a 10 ovos); 9,49 % (11 a 15 ovos) e 13,05 % (> 15 ovos). Comparando o valor obtido na baga tratada (ex: 56,60 %) com o controle (ex: 44,38 %), por meio do teste t, não houve diferença significativa. Ocorrendo o mesmo para as freqüências de puncturas nas demais concentrações testadas, com uma única exceção no tratamento com 18.000 ppm de extrato (fêmeas inexperientes) (Figura 4.3-B), no qual as fêmeas do controle realizaram maior porcentagem de posturas com número superior a 15 ovos, quando comparado com seu respectivo controle ($F = 11,14$; $p = 0,0033$).

Dessa forma, a deterrência provocada provavelmente atuou inibindo as puncturas das fêmeas e as oviposições propriamente ditas. Num raciocínio diferente, o menor número de puncturas e de ovos pode ter ocorrido devido a um efeito repelente sobre a praga; entretanto, estudos complementares são necessários para confirmar essa hipótese.

De acordo com Singh e Srivastava (1983), o extrato etanólico de sementes de nim provocou deterrência de oviposição nas concentrações de 2,5 % para *Bactrocera cucurbitae* Coquillett e de 20 % para *B. dorsalis*, em pulverização em frutos de *Momordica charantia* L. e de *Psidium guajava* L., respectivamente. Contudo, estudo posterior avaliando o número de fêmeas de *B. dorsalis* que pousam em frutos de goiaba tratados com extrato de amêndoas em solvente éter dietil comprova que o efeito maior é o de repelência (CHEN et al., 1996). Resultados registrados por Valencia-Botín, Bautista-Martinez e Lopez-Buenfil (2004) também apontam para repelência como o principal fator responsável pelo número de ovos de *Anastrepha ludens* Loew em frutos de laranja pulverizados com extrato aquoso (5 %) e óleo de nim (Neemix 4,5 %).

Independentemente do fenômeno ocorrido, repelência ou deterrência representada por alta inibição do comportamento de oviposição do inseto, os dois fatores são desejáveis para o manejo da praga. Uma simples punctura é capaz de causar danos nos frutos; portanto, além da redução do número de ovos, a redução das puncturas torna o extrato de folhas de nim em metanol bastante promissor para o manejo do inseto. O comportamento de oviposição registrado para fêmeas experientes favorece o uso de extratos e, numa primeira análise, não foi demonstrado comportamento diferente do tratamento controle, indicando que as moscas não ficaram habituadas ao extrato nas suas diferentes concentrações.

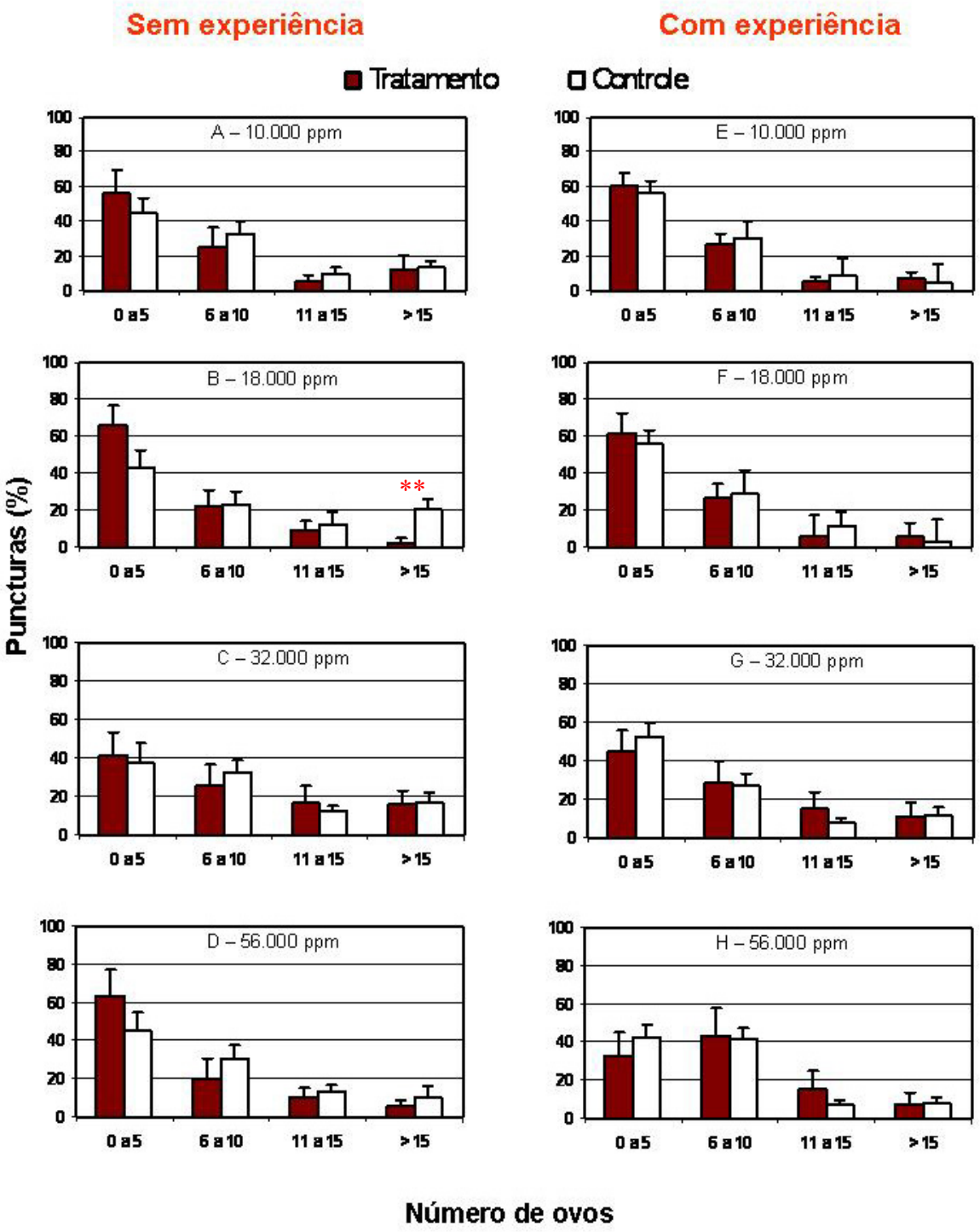


Figura 4.3 - Porcentagem de puncturas de *Ceratitis capitata*, com e sem experiência recente, em bagas de uva nas faixas de 0 a 5, 6 a 10, 11 a 15 e acima de 15 ovos, 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* em experimento com chance de escolha em condições de laboratório (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase: 14 h) (**indica diferença entre barras, Teste t, $P < 0,01$)

O interesse no manejo de pragas utilizando deterrentes ou repelentes tem aumentado gradualmente (LIANG; CHEN; LIU, 2003; SHOWLER; GREENBERG; ARNASON, 2008). Para moscas-das-frutas, a deterrência de oviposição e ou repelência de derivados do nim já havia sido demonstrada (SINGH; SRIVASTAVA, 1983; CHEN et al., 1996; SINGH, S.; SINGH, R. 1998; VALENCIA-BOTÍN; BAUTISTA-MARTINEZ; LOPEZ-BUENFIL, 2004).

4.2.2.2 Efeito sobre o comportamento de oviposição sem chance de escolha

Em teste sem chance de escolha o número de ovos colocados pelas fêmeas inexperientes não diferiu do controle (F = 1,30; p = 0,3157). No tratamento com maior concentração do extrato de folhas em metanol (56.000 ppm – 5,6 %), embora tenha ocorrido tendência de decréscimo no número de ovos colocados pelas três fêmeas (25,25 ovos) quando comparado com o controle (62,00 ovos colocados), reduzindo em aproximadamente 60 % o número de ovos colocados, não houve diferença significativa entre as médias (Tabela 4.2). Considerando o número de puncturas nas bagas de uva, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos, embora nenhum deles tenha diferido do controle (F = 4,32; p = 0,0160). Nesse experimento (sem chance de escolha) houve muita variabilidade na resposta das fêmeas, não apresentando um padrão com o aumento das concentrações. O número de ovos por punctura variou de 10,22 a 12,61 e também não diferiu em função dos tratamentos (F = 0,34; p = 0,8436) (Tabela 4.2).

Quando consideradas as fêmeas com experiência recente, o padrão comportamental de resposta aos tratamentos foi semelhante. Assim, os resultados do número de ovos por baga (F = 0,88; p = 0,4996), número de puncturas por baga (F = 0,73; p = 0,5832) e número de ovos por punctura (F = 0,63; p = 0,6484) não diferiram entre si, dentro de cada parâmetro, em função dos tratamentos. Contudo, houve sensível redução no número de ovos colocados e no número de puncturas nas bagas de uvas tratadas com 5,6 % (56.000 ppm) do extrato, com aproximadamente 60 % de redução dos ovos colocados e 55 % de redução no número de puncturas em comparação ao controle, assemelhando-se aos resultados registrados com fêmeas inexperientes expostas a bagas tratadas (Tabela 4.2).

A oviposição em bagas de uva tratadas com extratos de folhas de nim em experimento sem chance de escolha pode ter sido favorecida pelas “facilitações sociais” apresentadas pelas fêmeas da moscamed no momento da oviposição (PROKOPY; BUSH, 1973; ROBERTSON et al., 1995;

PROKOPY; DUAN, 1998) situação em que as fêmeas de moscamed preferem ovipositar em frutos ocupados por outros coespecíficos ao invés de colocar ovos em frutos não ocupados (PROKOPY et al., 2000; DUKAS; PROKOPY; DUAN, 2001; DUKAS et al., 2001; RULL; PROKOPY; VARGAS, 2003). Além disso, elas são capazes de pousarem em um fruto já ocupado e localizar o orifício da introdução do ovipositor (punctura) feito por outra fêmea e realizar a oviposição no mesmo local (PAPAJ et al., 1992; PAPAJ; MESSING, 1996). Fato semelhante também foi registrado no decorrer dos experimentos, em que foi encontrada mais de uma massa de ovos por orifício de oviposição. Como o número de puncturas foi contabilizado em função da quantidade de massa de ovos, a frequência de ocorrência desse fenômeno não foi contabilizada.

Possivelmente, o efeito do extrato tenha dificultado as oviposições iniciais e, após estas, as moscas mantiveram o comportamento de oviposição normalmente influenciada pelas "facilitações sociais", presença de coespecífcos (PROKOPY; DUAN, 1998), do feromônio de marcação do hospedeiro (PROKOPY; ZIEGLER; WONG, 1978) ou mesmo do odor emanado da baga de uva após as puncturas (PAPAJ, 1993). Algumas espécies de tefritídeos exibem uma forma de "facilitação social" quando estão envolvidos com o comportamento de oviposição, a tal ponto, que uma fêmea quando pousa no hospedeiro é estimulada a ovipositar ao encontrar uma fêmea ovipositando. Esse comportamento já foi demonstrado para *C. capitata* (PROKOPY; DUAN, 1998; RULL; PROKOPY; VARGAS, 2003) e também para outros tefritídeos (PROKOPY; REYNOLDS, 1998; PROKOPY; ROMING; DREW, 1999).

Quando se utilizou o extrato em maior concentração (56.000 ppm), aparentemente foi mais difícil para a mosca dar o primeiro passo, ou seja, fazer a primeira oviposição. Nessa concentração todas as vezes em que a mosca introduziu o ovipositor na baga houve postura, e o número de ovos colocados não foi afetado pela presença do extrato na baga de uva (Tabela 4.2). O número de posturas (introdução do acúleo seguida de oviposição) por baga variou de 1 a 3, com média de 2,25. Possivelmente, a demora na primeira postura das fêmeas reduziu significativamente o número de posturas das três fêmeas na baga de uva. Outro fator preponderante é que o odor do extrato em maior concentração possa ter dificultado a identificação do feromônio de marcação do hospedeiro ou mesmo o odor da baga emanado após as puncturas, não encorajado às fêmeas a realizarem outras oviposições. Estudos complementares avaliando essas hipóteses são necessários.

Tabela 4.2 - Número de ovos, de puncturas e de ovos por punctura (± EP) de *Ceratitis capitata* (com e sem experiência recente) em bagas de uva em experimento sem chance de escolha, obtidos 24 h após a aplicação de extrato metanólico de folhas de *Azadirachta indica* (Temp.: 25 ± 2ºC; UR: 60 ± 10 %; fotofase:14 h)

Tratamentos[1]	Sem experiência			Com experiência		
	Ovos	Puncturas[2]	Ovos/punctura	Ovos	Puncturas	Ovos/punctura
Controle	62,00 ± 37,96	6,00 ± 2,04 ab	10,33 ± 2,59	54,50 ± 27,00	5,00 ± 1,47	10,90 ± 3,13
10.000 ppm	97,00 ± 42,06	8,50 ± 1,76 a	11,41 ± 3,21	43,50 ± 23,11	4,25 ± 1,89	7,52 ± 2,20
18.000 ppm	72,50 ± 21,47	5,75 ± 1,25 ab	12,61 ± 1,31	47,00 ± 17,73	4,25 ± 1,80	13,53 ± 4,92
32.000 ppm	81,75 ± 26,34	10,25 ± 3,22 a	10,22 ± 0,98	38,75 ± 7,49	5,25 ± 0,63	7,38 ± 1,96
56.000 ppm	25,25 ± 8,69	2,25 ± 0,48 b	11,22 ± 2,60	20,50 ± 10,18	2,25 ± 1,31	7,83 ± 4,00
F (tratamentos)	1,30^{NS}	4,32**	0,34^{NS}	0,88^{NS}	0,73^{NS}	0,63^{NS}
CV (%)	28,95	33,18	33,95	38,91	7,95	44,47

[1]Concentração de azadiractina (aza) no extrato: 10.000 ppm do extrato (0,0060 ppm de aza); 18.000 ppm do extrato (0,0108 ppm de aza); 32.000 ppm do extrato (0,0192 ppm de aza); 56.000 ppm do extrato (0,0336 ppm de aza);
^{NS}Não significativo; **Significativo;
[2]Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Os dados demonstrados no presente trabalho constituem o primeiro passo com vistas à aplicação da estratégia de *push-pull* como ferramenta no manejo integrado de moscas-das-frutas em parreirais de uva no Vale do São Francisco, Brasil. Investigações pormenorizadas em condições de laboratório e principalmente de campo são necessárias para a viabilização dessa estratégia.

4.3 Conclusões

- ✓ O extrato de folhas em metanol de nim provoca deterrência de oviposição e ou repelência para *C. capitata* quando pulverizado em bagas de uva a partir da concentração de 18.000 ppm quando o inseto tem chance de escolha entre substrato tratado e não tratado;
- ✓ Esse comportamento, entretanto, não é mantido em condições de confinamento mesmo na concentração de 56.000 ppm;
- ✓ A experiência recente de *C. capitata* não altera a sua resposta em relação a bagas de uva tratadas com o extrato de folhas em metanol.

Referências

AKHTAR, Y.; ISMAN, M.B. Larval exposure to oviposition deterrents alters subsequent oviposition behaviour in generalist, *Trichoplusia ni* and specialist, *Plutella xylostella* moths. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 1853-1870, 2003.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London.** Series A, London, v**.** 160, p. 268–282, 1937.

CARVALHO, R.S.; NASCIMENTO, A.S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.) **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 165-179.

CHEN, C.; DONG, Y.; CHENG, L.; HOU, R.F. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in guava. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 462-466, 1996.

COOK, S.M.; KHAM, Z.R.; PICKETT, J.A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 375-400, 2007.

COOLEY, S.S.; PROKOPY, R.J.; McDONALD, P.T.; WONG, T.T.Y. Learning in oviposition site selection by *Ceratitis capitata* flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 40, p. 47-51, 1986.

CUNNINGHAM, J.P.; WEST, S.A.; WRIGHT, D.J. Learning in the nectar foraging behaviour of *Helicoverpa armigera.* **Ecological Entomology**, London, v. 23, p. 363-369, 1998.

DUKAS, R.; PROKOPY, R.J.; DUAN, J.J. Effects of larval competition on survival and growth in Mediterranean fruit flies. **Ecological Entomology**, London, v. 26, p. 587-593, 2001.

DUKAS, R.; PROKOPY, R.J.; PAPAJ, D.R.; DUAN, J.J. Egg laying behavior of Mediterranean fruit flies: Is social facilitation important? **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, p. 665-671, 2001.

GOMEZ, M.; PARANHOS, B.A.J.; CASTRO, R.; MALAVASI, A.; DAMASCENO, I.; NASCIMENTO, A.S.; SILVA, M.A.; ANDRADE, K.; CAMPOS, D.; VIANA, R.E. Bioecología de *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae) en uva Itália (*Vitis vinifera* L) en el Noroeste Brasileño. In: MEETING OF THE WORKING GROUP ON FRUIT FLIES OF THE WESTERN HEMISPHERE, 2008, Mazatlán Sinaloa. **Annals…** Mazatlán Sinaloa, 2008. p. 81-82.

HABIBE, T.C.; VIANA, R.E.; NASCIMENTO, A.S.; PARANHOS, B.A.J.; HAJI, F.N.P.; CARVALHO, R.S.; DAMASCENO, I.C.; MALAVASI, A. Infestation of grape *Vitis vinifera* by *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Sub-Medium Sao Francisco Valley, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 7., 2006, Salvador. **Proceedings…** Salvador, 2006. p.183-185.

HAJI, F.N.P.; NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S.; COUTINHO, C.C. Ocorrência e índice de infestação de moscas-das-frutas (Tephritidae) na região do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, n. 4, p. 205-209, 1991.

HAJI, F.N.P.; PARANHOS, B.A.J.; MIRANDA, I.G.; BARBOSA, F.R.; SOUZA, A. M. Monitoramento de moscas-das-frutas no Submédio do Vale do São Francisco. In: MENEZES, E.A.; BARBOSA, F.R. (Ed.). **Pragas da mangueira:** monitoramento, nível de ação e controle. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2005. p. 85-86.

LIANG, G.M.; CHEN, W.; LIU, T.X. Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 333-340, 2003.

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

LIU, S.S.; LI, Y.H.; LIU, Y.Q.; ZALUCKI, M.P. Experience-induced preference for oviposition repellents derived from a non-host plant by a specialist herbivore. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 722-729, 2005.

LIU, T.X.; LIU, S.S. Experience-altered oviposition responses to a neem-based product, Neemix®, by the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 38-45, 2006.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J.S.; ZUCCHI, R.A. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). I. Lista de hospedeiros e ocorrência. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 9-16, 1980.

PAPAJ, D.R. Use and avoidance of occupied hosts as a dynamic process in tephritid flies. In: BERNAYS, E.A. **Insect-plant interactions**. New York: CRC Press, 1993. p. 25-46.

PAPAJ, D.R.; MESSING, R.H. Functional shifts in the use of parasitized host by a tephritid fly: The role of host quality. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 7, p. 235-242, 1996.

PAPAJ, D.R.; PROKOPY, R.J. Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, p. 315-350, 1989.

PAPAJ, D.R.; AVERRIL, A.L.; PROKOPY, R.J.; WONG, T.T.Y. Host marking pheromone and use of previously established oviposition sites by the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 53, p. 203-209, 1992.

PAPAJ, D.R.; PROKOPY, R.J.; McDONALD, P.T.; WONG, T.T.Y. Differences in learning between wild and laboratory *Ceratitis capitata* flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 45, p. 65-72, 1987.

PROKOPY, R.J.; BUSH, G.I. Oviposition by grouped and isolated apple maggot flies. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 66, p.1197-1200, 1973.

PROKOPY, R.J.; DUAN, J.J. Socially facilitated egg-laying behavior in Mediterranean fruit flies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 42, p.117-122, 1998.

PROKOPY, R.J.; LEWIS, W.J. Application of learning to pest management. In: PAPAJ, D.R.; LEWIS, A.C. (Ed.). **Insect learning**: ecological and evolutionary perspectives. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 308-342.

PROKOPY, R.J.; REYNOLDS, A.H. Ovipositional enhancement through socially facilitated behavior in *Rhagoletis pomonella* flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 86, p. 281-286, 1998.

PROKOPY, R.J.; GREEN, T.A.; WONG, T.T.Y. Learning to find fruit in *Ceratitis capitata* flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 53, p. 65-72, 1989.

PROKOPY, R.J.; ROMING, C.R.; DREW, R.A.I. Facilitation in ovipositional behavior of *Bactrocera tryoni* flies. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 12, p. 815–832, 1999.

PROKOPY, R.J.; ZIEGLER, J.R.; WONG, T.T.Y. Deterrence of repeated oviposition by fruit marking pheromone in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 4, p. 55-63, 1978.

PROKOPY, R.J.; MILLER, N.W.; DUAN, J.J.; VARGAS, R.I. Local enhancement of arrivals of *Ceratitis capitata* females on fruit mimics. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht v. 97, p. 211–217, 2000.

QIU, Y.T.; Van LOON, J.J.A.; ROESSINGH, P. Chemoreception of oviposition deterring terpenoids in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, Dordrecht, v. 87, p.143-155, 1998.

REETZ, E.R.; SANTOS, C.; CORRÊA, S.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, C.; BELING, R.R. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2009. 128 p.

ROBERTSON, I.C.; ROITBERG, B.D.; WILLIAMSON, I.; SE SENGER. Contextual chemical ecology: an evolutionary approach to the chemical ecology of insects. **American Entomologist**, Lanham, v. 41, n. 4, p. 237-239, 1995.

ROJAS, J.C.; WYATT, T.D. The role of pre- and post-imaginal experience in the host-finding and oviposition behaviour of the cabbage moth. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 24, p. 83-89, 1999.

RULL, J.; PROKOPY, R.J.; VARGAS, R.I. Effects of conspecific presence on arrival and use of hosts in *Ceratitis capitata* flies. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 16, n. 3, p. 329-346, 2003.

SAS INSTITUTE. **SAS.** Cary, 2002-2003.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SHOWLER, A.T.; GREENBERG, S.M.; ARNASON, J.T. Deterrent effects of four neem-based formulations on gravid female boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition on cotton squares. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 2, p. 414-421, 2004.

SINGH, R.P. AND SRIVASTAVA, B.G. Alcohol extract of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil as oviposition deterrent for *Dacus cucurbitae* (Coq.). **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 45, p. 497-498, 1983.

SINGH, S.; SINGH, R.P. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, p. 191-197, 1998.

STARK, J.D.; WALTER, J.F. Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 507-512, 1995.

STORECK, A.; POPPY, G.M.; Van EMDEN, H.F.; POWELL, W. The role of plant chemical cues in determining host preference in the generalist aphid parasitoid *Aphidius colemani* . **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, p. 41-46, 2000.

TURLINGS, T.C.J.; McCALL, P.J.; ALBORN, H.T.; TUMLINSON, J.H. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 411-425, 1993.

VALENCIA-BOTÍN, A.J.; BAUTISTA-MARTINEZ, N.; LOPEZ-BUENFIL, J.A. Uso de extractos acuosos de Nim, *Azadirachta indica* A. Juss, en la oviposición de la mosca Mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) en naranja Valencia. **Fitosanidad**, Ciudad de La Habana, v. 8, n. 4, p. 57-59, 2004.

VIANA, R.E.; GONÇALVES, N.; ALVES, E.; SILVA, M.A.; DAMASCENO, I.; VIRGÍNIO, J.F.; NASCIMENTO, A.S.; MALAVASI, A. Índice populacional de moscamed no submédio vale do rio São Francisco relacionado com pomares de goiabeiras e aceroleiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: SBE, 2008. 1 CD-ROM.

WALDER, J.M.M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil:** parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. cap. 11, p. 181-190.

WANG, H.; GUO, W-F.; ZHANG, P-J.; WU, Z-Y.; LIU, S-S. Experience-induced habituation and preference towards non-host plant odors in ovipositing females of a moth. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, p. 330-338, 2008.

ZHANG, P.J.; LIU, S.S.; WANG, H.; ZALUCKI, M.P. The influence of early adult experience and larval food restriction on responses towards non-host plants in moths. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, p. 1528-1541, 2007.