**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores
de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera:
Curculionidae)**

Leandro do Prado Ribeiro

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

**Piracicaba
2010**

Leandro do Prado Ribeiro
Engenheiro Agrônomo

**Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores
de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera:
Curculionidae)**

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**

Ribeiro, Leandro do Prado

Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) / Leandro do Prado Ribeiro. - - Piracicaba, 2010.
154 p. : il.

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

1. Alelopatia 2. Bacillariophyceae 3. Gorgulhos - Controle 4. Grãos 5. Inseticidas biológicos
6. Magnoliales 7. Milho 8. Plantas produtoras de pesticida I. Título

CDD 632.768
R484b

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

A Deus pela saúde e disposição para superar
todos os obstáculos e desafios.

AGRADEÇO

À minha família,
pelo inestimável incentivo, carinho e compreensão
em todas as etapas de minha vida.

DEDICO

À minha noiva, pelo carinho, companheirismo e apoio.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração e iluminação em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pela oportunidade concedida, pelas orientações, ensinamentos e experiências compartilhadas, pela amizade e motivação e pelo exemplo de comportamento ético e profissional.

Ao colega e amigo Dr. Paulo César Bogorni, pelo incentivo, apoio, acolhida e pelas sugestões durante o desenvolvimento da dissertação.

A minha família, pela motivação em todas as etapas de minha formação profissional, pela doação e carinho dedicados nos momentos de dificuldades e pela compreensão devido à ausência e à distância.

A minha noiva Vanessa Minuzzi Bidinoto, pelo carinho, companheirismo, compreensão e auxílio prestado na condução dos experimentos laboratoriais.

Aos professores do PPG em Entomologia da ESALQ/USP, pelos conhecimentos transmitidos, e aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia, pelos auxílios prestados.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas, em especial aos professores Drs. Moacir Rossi Forim e João Batista Fernandes, ambos do Departamento de Química da UFSCar, pelo suporte técnico, sugestões e apoio prestado nas extrações e análises químicas.

Aos pós-graduandos do PPG em Química da UFSCar, do laboratório de Química de Produtos Naturais, Moacir dos Santos Andrade e Keylla Bicalho, pelo imprescindível apoio e “consultoria” na realização e interpretação das análises químicas.

Aos professores Drs. Renato Mello-Silva (Instituto de Biociências, USP), Heimo Rainer (Department of Systematics and Evolution of Higher Plants, University of Vienna), Lindolfo Capellari Júnior (Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP) e ao Dr. Gerson Oliveira Romão (Museu E.S.A., Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP), pelo auxílio na identificação das espécies vegetais.

Ao Prof. Dr. Roberto Antônio Zucchi (Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ/USP) e aos alunos da disciplina Taxonomia de Insetos de

Importância Agrícola (2009), pela confirmação taxonômica da espécie-praga alvo do estudo.

Ao Dr. Danilo Scacalossi Pedrazzoli (Bug Agentes Biológicos) e ao Eng. Agr. Marcos Roberto Conceschi, pelo gentil fornecimento de grãos de trigo e milho, respectivamente, utilizados na manutenção da criação de *Sitophilus zeamais* e nos bioensaios.

Ao Eng. Agr. Lincoln Hiroshi Miike (Vetquímica) e ao Sr. Arthur Bizarro (Canaã Representações), pelo fornecimento das formulações de terra de diatomácea.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas do laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas: Angelina Marcomini, Cristina Jensen, Eliane Grisoto, Fátima T. Rampelotti-Ferreira, Gabriel Gonçalves, Kaira Pauli, Márcio Silva, Marcos Aurélio A. Lima, Maria Auxiliadora Oriani, Mônica S. Santos, Paulo César Bogorni, Rafael Pitta e Sheila S. Carvalho, pelo convívio e troca de informações e experiências. Agradecimento especial ao colega Alexandre Moraes (Genética), pela parceria na condução da criação dos gorgulhos e dos bioensaios; e aos colegas Alexandre e Rafael Pitta pelo auxílio na construção do *Abstract*.

Ao estatístico Ricardo Olinda, doutorando do PPG em Estatística e Experimentação Agronômica, ao Biólogo Rafael Moral, e à Prof^a Marinéia Haddad, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly, pelas correções e revisões da dissertação.

Aos colegas e amigos do PPG em Entomologia, pelo convívio, companheirismo e interação durante o curso.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a concretização desta etapa, fica o meu eterno agradecimento e reconhecimento.

" [...]

O conhecimento é assim:
ri de si mesmo
e de suas certezas.

É meta de forma
metamorfose
movimento
fluir do tempo
que tanto cria como arrasa
a nos mostrar que para o vôo
é preciso tanto o casulo
como a asa."

Aulas de Vôo - Mauro Iasi

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 Aspectos gerais de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky, 1855.....	29
2.1.1 Taxonomia e descrição.....	29
2.1.2 Características bioecológicas.....	31
2.1.3 Danos.....	33
2.2 Considerações gerais sobre plantas inseticidas ou inseticidas botânicos.....	36
2.2.1 Aplicação direta de inseticidas botânicos no controle de insetos-praga.....	38
2.2.2 Aleloquímicos vegetais como moléculas-modelo para a síntese de novos agroquímicos.....	39
2.3 Inseticidas botânicos no manejo integrado de insetos-praga de grãos armazenados.....	41
2.3.1 Bioatividade de inseticidas botânicos sobre <i>S. zeamais</i>	41
2.4 Uso de pós inertes no manejo integrado de pragas de grãos armazenados.....	46
2.4.1 Efeito de pós inertes sobre <i>S. zeamais</i>	48
2.5 Associação de pós inertes e inseticidas naturais: perspectivas para o desenvolvimento de novas formulações.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 Estabelecimento e manutenção da criação de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky, 1855.....	51
3.2 Obtenção das espécies e preparação dos extratos vegetais.....	51
3.3 Análise cromatográfica dos extratos obtidos.....	54
3.4 Bioensaios.....	54
3.4.1 Testes preliminares.....	55

3.4.1.1 Determinação do volume de calda a ser aplicado e avaliação da uniformidade da distribuição.....	55
3.4.1.2 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre <i>S. zeamais</i>	56
3.4.2 Bioensaios definitivos.....	56
3.4.2.1 Avaliação da ação de extratos orgânicos de plantas com atividade inseticida a <i>S. zeamais</i>	56
3.4.2.1.1 <i>Screening</i> para identificação dos extratos promissores.....	57
3.4.2.1.1.1 Avaliação da atividade inseticida.....	57
3.4.2.1.1.2 Avaliação da progênie F1 e danos.....	57
3.4.2.1.1.3 Avaliação da atratividade de adultos.....	58
3.4.2.2 Curvas de concentração-resposta dos extratos promissores.....	59
3.4.2.3 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀) dos extratos promissores.....	60
3.4.2.4 Avaliação da atividade inseticida por ação de contato dos extratos promissores.....	60
3.4.2.4.1 Contato em superfície contaminada (papel filtro).....	60
3.4.2.4.2 Contato via aplicação tópica.....	61
3.4.2.5 Determinação do efeito residual dos extratos promissores.....	61
3.4.2.6 Avaliação da atividade inseticida de formulações à base de terra de diatomácea para adultos de <i>S. zeamais</i>	62
3.4.2.6.1 Curvas de concentração-resposta de duas formulações comerciais de terra de diatomácea.....	62
3.4.2.6.2 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀) de duas formulações comerciais de terra de diatomácea.....	63
3.4.2.7 Associação de extratos vegetais e formulações de terra de diatomácea no controle de <i>S. zeamais</i>	63
3.4.2.8 Fracionamentos biomonitorados dos extratos mais promissores.....	64
3.4.2.8.1 Partição líquido-líquido dos extratos brutos.....	64
3.4.2.8.2 Análises químicas das frações bioativas.....	66
3.4.2.8.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	66
3.4.2.8.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	66
3.4.2.8.2.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	67

3.4.2.9 Análises dos dados.....	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Avaliação do rendimento de extração.....	69
4.2 Perfil cromatográfico dos extratos obtidos (CCD).....	71
4.3 Bioensaios.....	75
4.3.1 Testes preliminares.....	75
4.3.1.1 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre <i>S. zeamais</i>	75
4.3.2 Bioensaios definitivos.....	76
4.3.2.1 <i>Screening</i> para identificação dos extratos vegetais mais promissores.....	76
4.3.2.1.1 Efeito de extratos vegetais na sobrevivência de adultos, progênie F1 e danos de <i>S. zeamais</i>	76
4.3.2.1.2 Efeito de extratos vegetais no comportamento de adultos de <i>S. zeamais</i>	84
4.3.2.2 Curvas de concentração-resposta dos extratos vegetais mais promissores.....	91
4.3.2.3 Tempo letal médio dos extratos mais promissores.....	94
4.3.2.4 Efeito inseticida por ação de contato dos extratos promissores.....	97
4.3.2.5 Efeito residual dos extratos vegetais selecionados.....	101
4.3.2.6 Avaliação da atividade inseticida de formulações à base de terra de diatomácea para adultos de <i>S. zeamais</i>	104
4.3.2.6.1 Curvas de concentração-resposta de duas formulações comerciais de terra de diatomácea.....	104
4.3.2.6.2 Estimativa do tempo letal médio (TL ₅₀) de duas formulações comerciais de terra de diatomácea.....	107
4.3.2.7 Associação de extratos vegetais e formulações de terra de diatomácea no controle de <i>S. zeamais</i>	111
4.3.3 Fracionamentos biomonitorados dos extratos mais promissores.....	114
4.3.3.1 Partição líquido-líquido dos extratos orgânicos selecionados.....	114
4.3.3.2 Análises químicas das frações bioativas.....	117
4.3.3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	117
4.3.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	119
4.3.3.2.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	121
5 CONCLUSÕES.....	131

REFERÊNCIAS.....	133
------------------	-----

RESUMO

Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)

Objetivou-se, no presente estudo, avaliar a ação de extratos orgânicos e frações de plantas com atividade inseticida, bem como, a associação de extratos orgânicos brutos com terra de diatomácea no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), em milho armazenado. Os extratos foram obtidos por meio de maceração em solventes orgânicos (hexano, diclorometano e etanol), em ordem crescente de polaridade, das seguintes estruturas e espécies vegetais: ramos, folhas e sementes de *Annona montana* e de *A. mucosa*; ramos de *Aristolochia* cf. *paulistana* e folhas e ramos de *Casearia sylvestris*. No *screening* visando à identificação dos extratos mais promissores, verificou-se que os extratos de sementes de *A. mucosa* e de *A. montana*, em hexano e diclorometano, seguido pelos extratos de folhas das mesmas espécies, em hexano, foram os tratamentos mais promissores, os quais foram, então, selecionados para os ensaios seguintes. Entre os extratos promissores, os obtidos de sementes de *A. mucosa* em hexano e em diclorometano foram os que apresentaram os menores valores de concentração letal média (CL₅₀) (110,28 e 149,79 ppm, respectivamente). Observou-se, ainda, pequena variação no tempo letal médio (TL₅₀) (4,14 a 6,10 dias) dos extratos selecionados. Os extratos de sementes de *A. mucosa*, tanto em hexano como em diclorometano, apresentaram efeito de contato sobre *S. zeamais*, via aplicação tópica, entretanto, nenhum dos extratos selecionados apresentou efeito inseticida via contato em superfície contaminada (papel filtro). Verificou-se, ainda, que os extratos em hexano e em diclorometano de sementes de *A. mucosa* apresentam pequena redução na atividade inseticida após 56 dias de armazenamento, sendo estes os extratos com maior efeito residual quando aplicados em grãos de milho visando ao controle de *S. zeamais*. Na associação de terra de diatomácea com extratos de sementes de *A. mucosa*, em hexano, e de *A. montana*, em diclorometano, constatou-se efeito antagônico entre as duas técnicas, quando avaliada a mortalidade dos gorgulhos expostos a tais tratamentos. Posteriormente, com base nos resultados dos ensaios biológicos e na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos brutos obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD), selecionaram-se os extratos em hexano de sementes de *A. mucosa* e de *A. montana* para realização de fracionamentos biomonitorados com a finalidade de se obterem os compostos responsáveis pela bioatividade observada. As frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de *A. montana* e de *A. mucosa*, obtidas por partição líquido-líquido, apresentam efeito inseticida para *S. zeamais*, sem, contudo, haver diferença entre ambas as frações de cada extrato. Todas as frações bioativas, de ambos os extratos, foram analisadas por CCD, utilizando-se diferentes eluentes e reveladores, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H), e seus resultados mostraram a presença de alcalóides e acetogeninas em todas as amostras analisadas. Assim, possivelmente, compostos de tais classes químicas estão relacionados com a bioatividade observada.

Palavras-chave: Aleloquímicos; Annonaceae; Gorgulho-do-milho; Terra de diatomácea; Bioatividade

ABSTRACT

Bioprospecting of plant extracts and their interaction with grain protectants in the control of *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)

The aim of the present study was to evaluate the effects of organic extracts and fractions of plants with insecticidal activity, as well as, the combination of crude organic extracts with diatomaceous earth in order to control *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) in stored corn. The extracts were obtained by maceration technique using organic solvents (hexane, dichloromethane and ethanol) respecting the order of increasing polarity. The species and their structures used were: branches, leaves and seeds of *Annona montana* and *A. mucosa*; branches of *Aristolochia* cf. *paulistana* and branches and leaves of *Casearia sylvestris*. In the screening assay, the most promising treatments were extracts from seeds of *A. mucosa* and *A. montana*, in hexane and dichloromethane, followed by extracts from leaves of the same species, in hexane. Thus, these extracts were selected for further tests. Among the promising extracts, the seed extract of *A. mucosa* in hexane and in dichloromethane showed the lowest Lethal Concentration (LC_{50}) (110.28 and 149.79 ppm, respectively). There was a little variation in the Lethal Time (LT_{50}) of the selected extracts ranged between 4.14 and 6.10 days. Seed extracts of *A. mucosa*, in hexane and dichloromethane, showed a contact effect to *S. zeamais* via topical application; although, none of the selected extracts showed insecticidal effects by contact in contaminated surface (filter paper). Both hexane and dichloromethane extracts from seeds of *A. mucosa* showed a slight decrease in their insecticidal activity after 56 days being these values the highest residual effect among the extracts tested when applied on maize for the control of *S. zeamais*. The association of diatomaceous earth with *A. mucosa* seed extracts in hexane, as well as, *A. montana* in dichloromethane caused an antagonistic effect between the two techniques when evaluated the mortality of weevils exposed to such treatments. Supported by the results of biological tests and the evaluation of the chromatographic profile of crude extracts obtained by thin layer chromatography (TLC), we selected the hexanic extracts of *A. mucosa* and *A. montana* seeds to fractionation and identify the responsible compounds by the observed bioactivity. The hydroalcoholic and dichloromethanic fractions of the hexane extract of *A. montana* and *A. mucosa*, obtained by liquid-liquid partition, showed insecticidal effects on *S. zeamais* having no difference among them about the provoked mortalities. All the bioactive fractions of both extracts were analyzed with TLC, using different solvents and developers, by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR), and their results showed alkaloids and acetogenins in all samples. Thus, possibly, compounds of these chemical classes may be related to the bioactivity observed.

Keywords: Allelochemicals; Annonaceae; Maize weevil; Diatomaceous earth; Bioactivity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diferenças morfológicas utilizadas para distinção entre duas espécies do gênero *Sitophilus* associadas a grãos armazenados no Brasil: edeago (machos) e esclerito em forma de Y (genitália de fêmeas) de *S. oryzae* (A e C, respectivamente) e de *S. zeamais* (B e D, respectivamente) (PEREIRA; ALMEIDA, 2001).....30
- Figura 2 - Imagens de raio X evidenciando o movimento e interação larval de *Sitophilus zeamais* durante o seu desenvolvimento, em grãos de milho infestados com um ovo (a) ou múltiplos ovos (b) por grão (L: larva; P: pupa) (GUEDES et al., 2010).....32
- Figura 3 - Eletromicrografias de *Sitophilus zeamais*: A e C corpo e antena, respectivamente, sem tratamento com terra de diatomácea; B e D corpo e antena, respectivamente, com partículas de terra de diatomácea adsorvidas (CERUTI, 2007).....47
- Figura 4 - Perfil da distribuição do corante azul brilhante (esquerda) em grãos de milho, por meio da aplicação de um volume de calda de 30 L t⁻¹, em comparação a grãos não pulverizados (direita).....56
- Figura 5 - Diagrama, em vista diagonal, da arena utilizada nos bioensaios de atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais*.....58
- Figura 6 - Funil de separação (A) e esquema da partição líquido-líquido (B) dos extratos orgânicos brutos selecionados.....65
- Figura 7 - Perfil cromatográfico dos extratos brutos estudados, obtidos por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como eluente uma solução de hexano: acetona (3:2, v/v) e revelados por meio de uma solução de vanilina sulfúrica. Solvente empregado: H: hexano; D: diclorometano; E: etanol. Espécie e estrutura vegetal empregada: 1: *Aristolochia* cf. *paulistana*; 2: *Annona montana* (folhas); 3: *A. montana* (ramos); 4: *A. montana* (sementes); 5: *A. mucosa* (folhas); 6: *A. mucosa* (ramos); 7: *A. mucosa* (sementes); 8: *Casearia sylvestris* (folhas); 9: *C. sylvestris* (ramos).....74

- Figura 8 - Porcentagens de mortalidade de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho tratadas com diferentes extratos orgânicos, após a aplicação e aos 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento. Temp: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux. EHAmuc: Extrato em hexano de *Annona mucosa*; EHAmont: Extrato em diclorometano de *Annona montana*; EDAmuc: Extrato em diclorometano de *Annona mucosa*; EDAmont: Extrato em diclorometano de *Annona montana*.....102
- Figura 9 - Mortalidade diária acumulada de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com diferentes concentrações de duas formulações comerciais de terra de diatomácea: A) Insecto[®] e B) Keepdry[®]. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....109
- Figura 10 - Percentagem de mortalidade ao 10^o dia ($\pm$ erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com diferentes frações do extrato em hexano de sementes de *Annona montana*. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).....115
- Figura 11 - Percentagem de mortalidade ao 10^o dia ($\pm$ erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com frações do extrato em hexano de sementes de *Annona mucosa*. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).....116
- Figura 12 - Perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD), das frações do extrato em hexano de *Annona montana* (4D: fração em diclorometano; 4H: fração em hidroálcool) e de *Annona mucosa* (7D: fração em diclorometano; 7H: fração em hidroálcool), em diferentes eluentes e reveladores (A: vanilina sulfúrica, B: ultravioleta 254 nm, C: solução de Dragendorff).....118

Figura 13 - Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), das frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de <i>Annona montana</i>	120
Figura 14 - Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), das frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de <i>Annona mucosa</i>	121
Figura 15 - Estrutura geral de triglicerídeos.....	122
Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de <i>Annona montana</i> (CDCl_3 , 400 MHz).....	123
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de sementes de <i>Annona mucosa</i> (CDCl_3 , 400 MHz).....	126
Figura 18 - Estrutura geral de acetogeninas.....	127
Figura 19 - Estrutura geral de alcalóides isoquinolínicos, comuns em plantas da família Annonaceae.....	128
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H da fração em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de <i>Annona montana</i> (DMSO, 400 MHz).....	129
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H da fração em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de <i>Annona mucosa</i> (DMSO, 400 MHz).....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies, famílias botânicas e estruturais vegetais utilizadas no estudo com <i>Sitophilus zeamais</i> , com os seus respectivos locais e datas de coleta.....	53
Tabela 2 – Rendimentos de extratos orgânicos obtidos pelo processo de maceração em solventes, na proporção de 1:5 (p/v), das diferentes estruturas e/ou espécies vegetais utilizadas no estudo com <i>Sitophilus zeamais</i>	70
Tabela 3 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, e número de insetos emergidos (progênie F1), após 60 dias da infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> , em amostras de milho (10 g) tratadas com diferentes solventes orgânicos puros. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....	75
Tabela 4 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, nº insetos emergidos (progênie F1) e danos, após 60 dias da infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> , em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em hexano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....	79
Tabela 5 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, nº insetos emergidos (progênie F1) e danos, após 60 dias da infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> , em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em diclorometano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....	80
Tabela 6 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, nº insetos emergidos (progênie F1) e danos, após 60 dias da infestação de <i>Sitophilus zeamais</i> , em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em etanol de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade: 172 lux.....	81
Tabela 7 - Atratividade de adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> por amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em hexano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....	87

- Tabela 8 - Atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais* por amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em diclorometano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....88
- Tabela 9 - Atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais* por amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em etanol de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....89
- Tabela 10 - Estimativa da CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀ (em ppm) e intervalo de confiança de extratos orgânicos para adultos de *Sitophilus zeamais*, após 10 dias de exposição em amostras de milho (10 g) tratadas com os respectivos extratos brutos. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....92
- Tabela 11 - Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀), em dias, e intervalo de confiança de extratos orgânicos, em suas respectivas CL₉₀, para adultos de *Sitophilus zeamais*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....95
- Tabela 12 - Mortalidade diária acumulada (%) (± erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* por meio da aplicação tópica de extratos orgânicos brutos. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....99
- Tabela 13 - Mortalidade diária acumulada (%) (± erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a superfícies contaminadas (papel filtro) com extratos orgânicos brutos. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....100
- Tabela 14 - Estimativa da CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀ (em ppm) e intervalo de confiança de duas formulações de terra de diatomácea para adultos de *Sitophilus zeamais*, após 10 dias de exposição. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....106
- Tabela 15 - Estimativa do TL₅₀ (em dias) e intervalo de confiança de duas formulações de terra de diatomácea para adultos de *Sitophilus zeamais*, a partir de

diferentes concentrações. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....110

Tabela 16 - Percentagem de mortalidade acumulada ($\pm$ erro padrão) de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos tratados com extratos orgânicos das sementes de duas espécies de Annonaceae, em suas respectivas CL_{30} e CL_{50} ; com terra de diatomácea, em sua respectiva CL_{30} e CL_{50} e com a combinação entre extratos vegetais e terra de diatomácea. Temp.: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14h; luminosidade média: 172 lux.....113

Tabela 17 - Rendimento na obtenção de frações, após partição líquido-líquido dos extratos em hexano das sementes de duas anonáceas.....114

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, como acontece no resto do mundo, há um enorme dispêndio de energia na adoção de inovações tecnológicas para o incremento da produtividade agrícola, visando ao aumento da produção de alimentos (MARTINS; FARIAS, 2002). No entanto, os aumentos de produção resultantes desses esforços podem ser anulados em virtude das significativas perdas ocorridas durante todo o processo produtivo. Entre essas perdas, se destacam as que ocorrem durante o processo de armazenagem, pois afetam os produtos finais, prontos para comercialização, pondo em risco os investimentos realizados nas etapas anteriores do processo produtivo. No que se refere à armazenagem de grãos, a causa mais frequente de perdas está associada ao ataque de insetos, fungos e roedores.

Em países tropicais e em desenvolvimento, as perdas decorrentes do ataque de insetos-praga em grãos armazenados tem sido maiores devido às condições climáticas que favorecem essa biota e às condições não satisfatórias da infraestrutura de armazenagem (LAZZARI; LAZZARI, 2009). No Brasil, essas perdas foram estimadas em aproximadamente 10% do total produzido anualmente (FAO, 2007; MAPA, 2008), o que representa cerca de mais de 14,7 milhões de toneladas de grãos/ano, levando em consideração o montante da produção da safra 2009/10, estimada em 147,09 milhões de toneladas (CONAB, 2010).

Além das perdas quantitativas decorrentes da alimentação direta dos insetos, expressivas perdas qualitativas são acarretadas, como a presença de fragmentos de insetos em subprodutos alimentares, deterioração da massa de grãos, contaminação fúngica, presença de micotoxinas e de resíduos de inseticidas, diminuição do valor nutricional dos grãos e perda da qualidade fisiológica das sementes (CANEPPELE et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008), o que determina, conseqüentemente, a redução do valor de mercado ou até mesmo a condenação de lotes de sementes e/ou grãos.

São conhecidas atualmente 250 espécies de artrópodes-praga de grãos e de produtos armazenados, que são caracterizadas pela sua grande capacidade de reprodução e enorme voracidade (COVALLINO; PELICANO; GIMÉNEZ, 2006). As larvas e/ou adultos dessas espécies são capazes de consumir várias vezes seu próprio

peso em alimento, durante as poucas semanas que dura seu ciclo (TAPONDJOU et al., 2005), o que vêm determinando expressivos prejuízos econômicos.

Por outro lado, o milho (*Zea mays* L.) é uma cultura estratégica para as condições brasileiras, pois além de abastecer a cadeia produtiva animal, é o cereal predominante nos cultivos realizados na maioria das pequenas propriedades familiares em vários estados brasileiros. Nessas propriedades, a conservação e proteção dos grãos armazenados constituem-se em uma necessidade alimentícia, social e econômica (SILVA et al., 2005), pois os grãos desse cereal servem como base da dieta alimentar de muitas famílias, fazendo-se necessária a preservação de suas qualidades durante todo o período de armazenagem. Não obstante, nas pequenas unidades de produção, as perdas decorrentes do ataque de insetos-praga em grãos armazenados são ainda maiores (SANTOS, 1986), devido à inexistência de estruturas adequadas de armazenagem e de métodos de controle compatíveis com a realidade dos pequenos agricultores (LAGUNES, 1994).

O gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) é a principal espécie-praga do milho armazenado (CERUTTI; LAZZARI, 2005), devido a uma série de características que apresenta, como grande número de hospedeiros alternativos, elevado potencial biótico, capacidade de atacar grãos tanto no campo quanto em depósitos e de sobreviver a grandes profundidades na massa de grãos (FARONI, 1992).

O controle químico por meio de inseticidas sintéticos é o método mais utilizado no controle de *S. zeamais*, devido, principalmente, à carência de métodos de controle alternativos eficientes (GUEDES et al., 1995). Entretanto, essa técnica tem sido praticamente inviabilizada em razão da restrita disponibilidade de inseticidas registrados para o controle dessa espécie e a consequente dificuldade na alternância de ingredientes ativos (LORINI, 1999) e ocorrência de populações resistentes (RIBEIRO et al., 2003), além das implicações negativas no âmbito ambiental, econômico e social decorrentes da simplificação dos sistemas de manejo.

O crescente reconhecimento social dos riscos presentes no uso indiscriminado e irracional de agrotóxicos, por outro lado, tem catalisado iniciativas no sentido de se buscarem adequações tecnológicas para a racionalização do uso desses xenobióticos

(ALVES FILHO, 2002), sendo estas incentivadas pelo surgimento de novas tecnologias e novos avanços na compreensão dos eventos ecológicos envolvidos (MAIRESSE, 2005) e pelos próprios reflexos dessa conjuntura, que tem emitido na sociedade sinais concretos da necessidade de vincular mais estreitamente tecnologia, economia e ecologia, inclusive na adoção das práticas agrícolas.

Novas substâncias são necessárias, portanto, para o efetivo controle de pragas na armazenagem agrícola, que apresentem maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e com baixo impacto ambiental (VIEGAS JÚNIOR, 2003). Compostos derivados de espécies vegetais têm mostrado grande potencial para uso no manejo de populações de insetos-praga, tanto por meio de preparações caseiras para uso direto na propriedade ou como modelo químico para o desenvolvimento de novos inseticidas sintéticos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000; ISMAN, 2006).

De acordo com Van Beek e Breteler (1993), as plantas representam um amplo “armazém” de produtos naturais úteis. Em virtude disso, atualmente, vários laboratórios mundiais vêm estudando milhares de espécies de plantas em busca de produtos farmacêuticos e de compostos para o controle de pragas na agricultura (SOUZA et al., 2008). Assim, a prospecção de substâncias biologicamente ativas em espécies da diversificada e rica flora brasileira configura-se num ponto estratégico para o desenvolvimento de produtos diferenciados e com alto valor agregado, como os inseticidas agrícolas.

Da mesma forma que os inseticidas botânicos, o uso de pós inertes, técnica utilizada pelos agricultores de subsistência antes do advento dos inseticidas sintéticos, tem ressurgido como uma importante e promissora alternativa de controle de insetos-praga em grãos armazenados (LORINI, 1998).

A terra de diatomácea (sedimento de carapaças de algas diatomáceas) é o pó inerte mais estudado, sendo utilizado para o controle de insetos de grãos armazenados em vários países do mundo como Austrália, Canadá e Estados Unidos (ATUI; LAZZARI; LAZZARI, 2003). Sua eficácia no controle de *Sitophilus* spp. foi observada em alguns trabalhos, os quais verificaram que, além de propiciar a manutenção da germinação das sementes armazenadas, não causam fitotoxicidade ou efeito prejudicial aos

consumidores e ao meio ambiente (DUPCHAK; LAZZARI; LAZZARI, 1996; PINTO JÚNIOR; PEREIRA; LAZZARI, 1996; CERUTTI; LAZZARI, 2005; MARSARO JÚNIOR et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008).

A integração de métodos de controle é uma prática essencial para se obter sucesso na supressão de insetos-praga (LORINI, 2002), configurando-se na base de qualquer programa de manejo integrado de pragas aplicável a grãos armazenados (MIP Grãos). Assim, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a ação de extratos orgânicos e frações de plantas com atividade inseticida, bem como, a interação de extratos orgânicos brutos com protetores de grãos no controle de *S. zeamais* em milho armazenado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855

2.1.1 Taxonomia e descrição

O gorgulho-do-milho, *S. zeamais*, coleóptero pertencente à família Curculionidae, foi descrito por Motschulsky em 1855. A partir da descrição dessa espécie, surgiram dúvidas em relação ao complexo de *S. oryzae*, descrito por Linneu em 1763. Diversos estudos foram realizados com o objetivo de estudar esse complexo, até que, em 1961, Kuschel descobriu características da genitália desses gorgulhos, mais especificamente na morfologia do edeago, que possibilitaram a discriminação e identificação segura das espécies (OLIVEIRA, 2005). Posteriormente, Proctor (1971) descobriu uma característica edeagal adicional entre ambas as espécies e, mais recentemente, Nardon e Nardon (2002) sugeriram algumas características morfológicas a serem utilizadas na distinção larval entre as duas espécies. Já Peng; Lin e Wang (2003) propuseram estudos de DNA para separação segura das espécies.

A figura 1 ilustra as diferenças morfológicas utilizadas para a distinção entre as duas principais espécies de *Sitophilus* associadas com grãos armazenados nas condições brasileiras (PEREIRA; ALMEIDA, 2001). Em *S. oryzae*, os machos possuem a superfície do edeago totalmente lisa e convexa (Figura 1, A), enquanto que os prolongamentos do esclerito em forma de Y (genitália) das fêmeas são arredondados (Figura 1, C). Já em *S. zeamais*, a superfície do edeago dos machos apresenta dorsalmente uma crista central entre duas depressões longitudinais (Figura 1, B), enquanto que nas fêmeas, os prolongamentos do esclerito em forma de Y são pontiagudos e o espaço entre eles é maior que a largura dos dois juntos (Figura 1, D).

Figura 1 - Diferenças morfológicas utilizadas para distinção entre duas espécies do gênero *Sitophilus* associadas a grãos armazenados no Brasil: edeago (machos) e esclerito em forma de Y (genitália de fêmeas) de *S. oryzae* (A e C, respectivamente) e de *S. zeamais* (B e D, respectivamente) (PEREIRA; ALMEIDA, 2001)

Os adultos de *S. zeamais* são pequenos besouros, castanho-escuros, com quatro manchas avermelhadas nos élitros (asas anteriores), que são densamente estriados e pernas com tarsos com cinco artículos (ROSSETTO, 1969). Medem em torno de 3 mm e possuem a cabeça projetada à frente em forma de rostro (aspecto característico da família Curculionidae), sendo nas fêmeas mais longo e afilado e nos machos, mais curto e grosso (LORINI; SCHENEIDER, 1994; LOECK, 2002). O aparelho bucal é do tipo mastigador, possuindo mandíbulas fortes o suficiente para romperem a dureza dos grãos (SANTOS, 1993; LORINI, 1998; GALLO et al., 2002). As larvas, do tipo curculioniforme, são ápodas e de coloração amarelo-clara com a cabeça mais escura, apresentando perfil dorsal semicircular, perfil ventral quase retilíneo e os três primeiros segmentos abdominais com duas pregas ou sulcos transversais no dorso (MOUND, 1989). As pupas são brancas e brilhantes, com o rostro e as tecas alares bem visíveis (MOUND, 1989; LORINI, 1998; GALLO et al., 2002).

2.1.2 Características bioecológicas

S. zeamais é um inseto-praga primário de cereais armazenados de ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas regiões tropicais e temperadas quentes do mundo inteiro (HALSTEAD, 1963). Em regiões de frio moderado, assim como o Nordeste da Europa, essa espécie é largamente substituída por *S. granarius*, que também é encontrado em regiões tropicais muito frias (HALSTEAD, 1989).

Acredita-se que a origem de *S. zeamais* esteja associada à Índia, sendo que, logo após essa constatação, foram encontrados espécimens infestando armazéns na Europa (TAVARES, 2002). No entanto, o amplo comércio internacional de *commodities* agrícolas permitiu a distribuição cosmopolita dessa espécie (LAZZARI; LAZZARI, 2009). Com tal abrangência, espera-se que essa espécie ocorra em níveis de populações, subespécies geográficas ou raças com diferenças na preferência alimentar, nos requisitos climáticos e na suscetibilidade a pesticidas (HILL, 1990).

Comumente, verifica-se a infestação conjunta de *S. zeamais* e *S. oryzae*, formando um complexo de espécies. No estado de São Paulo, segundo levantamentos realizados por Rossetto (1969), *S. zeamais* é a espécie predominante em milho armazenado, distribuindo-se de forma generalizada por todo o território paulista.

O ciclo biológico de *S. zeamais* inicia quando a fêmea, utilizando as mandíbulas, perfura um orifício no grão, geralmente na região do embrião, depositando, em seguida, um ovo (EVANS, 1981; COTTON; WILBUR, 1982). A cavidade aberta é então coberta com uma secreção gelatinosa, produzida pelo órgão ovipositor, selando o ovo no grão (DANHO; GASPAR; HAUBRUGE, 2002). A secreção endurece rapidamente, deixando uma pequena área acima da superfície dos grãos, que fornece a única evidência externa de que o grão está infestado (LONGSTAFF, 1981).

A fase embrionária dura em média quatro dias, a 25°C. As larvas após a eclosão desenvolvem dentro do grão, escavando-o à medida que crescem, passando por quatro instares larvais e transformando-se em pupa no interior do próprio grão (SANTOS, 1993; LORINI, 1998; GALLO et al., 2002).

As larvas apresentam canibalismo sobre os indivíduos fracos ou pequenos; como resultado, raramente emerge mais que um indivíduo adulto de um simples grão de trigo

ou de arroz, enquanto dois ou três podem emergir de um único grão de milho (GUEDES et al., 2010) (Figura 2). A saída do inseto adulto do grão ocorre através da abertura de um orifício de forma irregular, ocorrendo o acasalamento dois a três dias após a saída (VENDRAMIM; NAKANO; PARRA, 1992).

Figura 2 - Imagens de raio X evidenciando o movimento e interação larval de *Sitophilus zeamais* durante o seu desenvolvimento, em grãos de milho infestados com um ovo (a) ou múltiplos ovos (b) por grão (L: larva; P: pupa) (GUEDES et al., 2010).

Algumas características biológicas adicionais de *S. zeamais* são relatadas por alguns autores (ROSSETTO, 1969; LORINI; SCHENEIDER, 1994; GALLO et al., 2002), como: período médio do desenvolvimento de ovo à emergência do adulto de 34 dias; com longevidade média dos machos de 142 dias (variando de 85 a 221 dias) e das fêmeas de 140,5 dias (80 a 186 dias); período médio de pré-oviposição de 5,8 dias, variando de 4 a 12 dias; número máximo de ovos por fêmea de 607 e período máximo de oviposição de 149 dias; número médio de 282,2 ovos por fêmea com período médio de oviposição de 104,2 dias, e média de 2,7 ovos por dia; número mínimo de ovos por

fêmea de 93, colocados num período de 58 dias; período de incubação de 3 a 6 dias e emergência de 48,1 e 51,9% de adultos machos e fêmeas, respectivamente, sendo que 26,9% dos ovos se desenvolvem até a emergência dos adultos.

O desenvolvimento completo é possível em temperaturas compreendidas entre 15 e 35°C, e levam 35 dias nas condições de 27°C e 70% de umidade relativa (REES, 1996). No entanto, a taxa de desenvolvimento das pragas de armazenamento é influenciada, além da temperatura e umidade relativa, pelo teor de água do alimento e pelo valor nutritivo da dieta (HILL, 1990).

Para *S. zeamais*, o desenvolvimento em grãos com teor de umidade abaixo de 13% ocasiona aumento da mortalidade, e ovos não são geralmente colocados em grãos com umidade abaixo de 10%, sendo o desenvolvimento acelerado em grãos com teor de umidade entre 14 e 16% (SANTOS, 1993). Evans (1982) verificou interação positiva entre a temperatura do ambiente e da umidade da massa de grãos com a taxa intrínseca de crescimento de populações de *S. oryzae*. O autor observou, ainda, que ovos não foram ovipositados em grãos de trigo com umidade inferior a 10,3% na temperatura de 15°C. No entanto, oviposições foram constatadas em grãos de trigo com umidade de 14% em ambiente a 1°C, porém sem ocorrer o desenvolvimento larval.

Okelana e Osuji (1985) estudaram a influência da umidade relativa do ar, a 30°C, no desenvolvimento, na oviposição e na mortalidade de *S. zeamais* em diferentes genótipos de milho. Umidades relativas do ar entre 30 e 50% foram prejudiciais à sobrevivência, oviposição e desenvolvimento da espécie, sendo que a maior progênie F1 foi obtida na umidade de 70%. Em grãos armazenados a 90%, observou-se o maior número de ovos em todos os genótipos estudados, porém, o desenvolvimento de fungos e bactérias reduziu o desenvolvimento populacional dos gorgulhos. Insetos emergidos de grãos acondicionados em ambientes com umidades entre 50 e 70% mostraram-se maiores, mais pesados, mais ativos e com o corpo mais escuro que os insetos emergidos de grãos mantidos em ambiente com 90% de umidade relativa, em todos os genótipos estudados.

2.1.3 Danos

A cultura do milho é considerada a principal opção para a alimentação de *S. zeamais* (BOTTON; LORINI; AFONSO, 2005). Entretanto, esse inseto pode atacar diversos grãos armazenados como trigo, arroz, sorgo, cevada, triticale, feijão e alimentos beneficiados, como macarrão, frutas secas e chocolate (VENDRAMIM; NAKANO; PARRA, 1992; LORINI, 1999; MURATA; IMAMURA; MIYANOSHITA, 2008; TREMATERRA, 2009). Além disso, Botton; Lorini e Afonso (2005) relataram a ocorrência e os danos de *S. zeamais* em cultivos de frutíferas de clima temperado no Rio Grande do Sul. Segundo os autores, o ataque do gorgulho vem ocorrendo em pomares de pêssigo, maçã e videira, localizados próximos a silos e paióis de milho infestados, ocorrendo migração dos insetos para os pomares quando estes se encontram em elevada população nas estruturas armazenadoras, principalmente durante os meses de outubro e novembro.

Os danos ocasionados por *S. zeamais* em grãos armazenados podem ser causados tanto pelas formas jovens (larvas), que se desenvolvem no interior do grão, como pelos adultos (SANTOS; FONTES, 1990). De acordo com Santos e Cruz (1984), as perdas que decorrem do ataque desse inseto são principalmente de peso, de valor comercial e nutritivo do milho. Infestações severas de *S. zeamais* podem reduzir o teor de proteína e de aminoácidos, além de afetar a palatabilidade do grão (LAZZARI; LAZZARI, 2009). Já Lopes et al. (1988) mencionam mudanças na composição química do milho devido ao ataque dessa praga.

A infestação por *S. zeamais* possibilita a instalação de outros agentes de deterioração de grãos, como ácaros, fungos e insetos secundários (LORINI, 1999). O aumento na contaminação por fungos pode ocorrer em virtude dos danos físicos ocasionados aos grãos que se tornam mais vulneráveis (SINHA, 1983) devido ao calor metabólico e água dos insetos, que possibilita a elevação da atividade de água e da temperatura do grão a níveis adequados para o crescimento de fungos (DUNKEL, 1988; LAZZARI; LAZZARI, 2009); ou por estes atuarem como vetores, propagando as estruturas reprodutivas desses microrganismos na massa de grãos (DIX; ALL, 1987). Assim, Barney et al. (1995) verificaram incremento na abundância de 17 espécies de fungos em grãos de milho armazenados quando na presença de *S. zeamais* e,

principalmente, de *Penicillium* spp. e *Aspergillus glaucus*, os principais agentes micóticos de deterioração de grãos.

Além disso, estudos recentes mostram que os insetos de grãos armazenados podem abrigar bactérias enterocócicas resistentes a antibióticos, que são potencialmente virulentas quando presentes nos grãos e em seus subprodutos (LAZZARI; LAZZARI, 2009). A presença de quinonas, secretadas por espécies de *Tribolium* (Coleoptera: Tenebrionidae), ligadas a proteínas da farinha, foram relacionadas com a ocorrência de carcinomas em ratos (LADISCH; SUTER; FROIO, 1968).

Significativa redução na germinação de sementes de milho é observada em grãos infestados por *S. zeamais*, sendo essa redução já constatada desde a postura dos gorgulhos, realizada principalmente no embrião do grão, evoluindo rapidamente com o decorrer do desenvolvimento das formas jovens em seu interior (SANTOS, 1993). Da mesma forma, Smiderle et al. (1997) constataram que sementes de arroz infestadas com os gorgulhos *Rhizopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) e *Sitophilus* sp., sofreram significativa redução no peso e na percentagem de germinação e emergência de plântulas. A redução dos níveis de oxigênio das sementes armazenadas decorrentes da presença de *S. zeamais* e de outros agentes de deterioração associados (fungos) é um dos fatores determinantes da perda da qualidade fisiológica das sementes (MORENO-MARTINEZ; JIMÉNEZ e VÁSQUEZ, 2000).

Correlações positivas entre a perda de peso de grãos e a qualidade física e fisiológica de sementes também foram observadas por Caneppele et al. (2003). Os autores constataram, ainda, perda de matéria seca em amostras de 500 g de grãos de milho, equivalente a $0,36\% \text{ dia}^{-1}$, o que corresponde a um consumo de $0,0001\% \text{ inseto}^{-1} \text{ mês}^{-1}$. Como resultado desses danos, o produto sofreu depreciação comercial em 30 dias, com perda significativa em todos os fatores de qualidade.

O nível de dano econômico (NDE) de *S. zeamais* em trigo foi estimado, com base na redução do peso de grãos, na redução do peso hectolítrico e no valor de mercado do trigo, em $0,18 \text{ inseto kg}^{-1}$ de grão (SANTOS et al., 2002), o que elucida o potencial de dano dessa espécie-praga.

A ocorrência de infestação cruzada, ou seja, a capacidade do inseto em atacar os grãos tanto no campo como no armazém, aumenta a magnitude dos danos de *S. zeamais* (HOWLADER; MATIN, 1988; TIGAR et al., 1994). Nas condições brasileiras, perdas de até 29,62% foram constatadas por Picanço et al. (2004) em cultivos de milho-safrinha, em Coimbra, MG, durante a fase de pré-colheita.

Apesar do exposto, outros danos indiretos e difíceis de serem mensurados devem ser considerados, como os custos ambientais advindos do uso de inseticidas sintéticos e os danos à saúde humana decorrentes da presença de resíduos de inseticidas e de toxinas nos grãos e em seus subprodutos e pela exposição direta dos trabalhadores de silos e armazéns.

2.2 Considerações gerais sobre plantas inseticidas ou inseticidas botânicos

Os inseticidas botânicos são produtos derivados de plantas que, ao longo da sua evolução, desenvolveram sua própria defesa química contra os insetos herbívoros, sintetizando metabólitos secundários com propriedades inseticidas, isto é, com atividade tóxica contra os insetos (CLOYD, 2004).

Os metabólitos secundários, denominados de fitotoxinas ou aleloquímicos (PINTO et al., 2002), são extremamente diversos e variáveis e desempenham o papel de garantir a sobrevivência do organismo no hábitat natural (MAIRESSE, 2005). Estes podem ser sintetizados constitutivamente em órgãos específicos ou em estádios específicos de desenvolvimento da planta, ou sua produção pode ser induzida por ataque de herbívoros ou de patógenos (GERSHENZON; MCCONKEY; CROTEAU, 2000). Mais de 200 mil metabólitos são atualmente conhecidos, entretanto, acredita-se que esse número represente apenas 10% da possível riqueza desses compostos existentes na natureza (DIXON; STRACK, 2003).

O uso de aleloquímicos como fitoinseticidas ou inseticidas botânicos é uma técnica antiga, desenvolvida e utilizada por um longo período pelos pequenos agricultores de países tropicais (ROEL et al., 2000), mas que entrou em desuso a partir do desenvolvimento dos inseticidas sintéticos. Antes desse período, o Brasil foi um grande exportador de inseticidas botânicos, sendo estes obtidos, principalmente, a partir de cinco famílias botânicas: Solanaceae, Compositae, Fabaceae,

Chenopodiaceae e Liliaceae, das quais eram extraídos, respectivamente, a nicotina, piretro, timbó, heléboro e anabasina (MARANHÃO, 1954). Nas duas últimas décadas, a constatação dos efeitos negativos dos inseticidas sintéticos sobre os diferentes partícipes do elo produtivo fez com que os estudos e o uso dos inseticidas botânicos ressurgissem.

De acordo com Jacobson (1989), as famílias botânicas mais estudadas como fonte de metabólitos secundários ou produtos naturais no controle de pragas agrícolas são: Achantaceae, Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Araceae, Asteraceae, Canelaceae, Celastraceae, Chenopodiaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Meliaceae, Moraceae, Piperaceae, Pteridaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Salicaceae, Sapotaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae. No entanto, Maranhão (1954) já havia relacionado cerca de 2.000 plantas com propriedades inseticidas, distribuídas em 170 famílias. Para Schumutterer (1990), espécies de Meliaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Aristolochiaceae e Annonaceae são as principais fontes vegetais de princípios ativos inseticidas.

Atualmente, entre as plantas inseticidas estudadas, o nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae), é considerada a mais importante e promissora, visto sua eficácia sobre diversas espécies-praga. As pesquisas com essa meliácea se intensificaram durante as últimas três décadas, tanto na Índia, seu país de origem, como em outros países, porém, seu uso na agricultura data de mais de 2.000 anos (MARTINEZ, 2002). Cerca de 100 triterpenoides têm sido identificados nas sementes, madeira, cascas, folhas e frutos de nim (LUO et al., 1999), porém a azadiractina é o que ocorre em maior concentração e que apresenta a maior atividade tóxica contra insetos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

Quanto ao modo de ação dos inseticidas naturais, estes provocam não somente a mortalidade dos insetos, mas também podem inibir a alimentação, reduzir a motilidade, inibir a síntese de quitina, inibir o crescimento, provocar deformação das pupas, interferir na biossíntese do ecdisônio e reduzir a longevidade e fecundidade dos insetos (MORDUE; BLACKWELL, 1993). Assim, em virtude dos seus acentuados efeitos insetistáticos, o emprego de inseticidas botânicos deve ser considerado uma técnica

complementar dentro de um sistema de manejo biorracional de insetos-praga (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

Os estudos com inseticidas botânicos apresentam dois objetivos básicos: a) aplicação direta no controle de pragas por meio da utilização de pós, extratos aquosos e óleos em pequenas e médias propriedades ou em sistemas de cultivo orgânico; b) fonte de novas moléculas, visando o desenvolvimento de novos produtos mais seletivos e menos tóxicos aos organismos não-alvo que os inseticidas convencionais utilizados (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000; TAVARES, 2006).

2.2.1 Aplicação direta de inseticidas botânicos no controle de insetos-praga

Os produtos naturais para uso direto no controle de pragas são representados principalmente por extratos aquosos e pós secos, os quais são produzidos na própria propriedade rural, a partir de espécies disponíveis localmente, contribuindo, dessa forma, para a redução da dependência tecnológica dos pequenos agricultores (MENEZES, 2005).

No entanto, o uso de inseticidas botânicos no controle de pragas agrícolas por meio de preparações caseiras (ou domésticas) apresenta algumas limitações, sendo que a disponibilidade de matéria-prima é um dos principais entraves ao seu uso (COSTA; SILVA; FIUZA, 2002). De acordo com Tavares (2006), para o emprego prático de inseticidas de origem vegetal no controle de pragas, é fundamental procurar manter a fonte de matéria-prima a ser utilizada, priorizando-se plantas com maior distribuição, facilitando sua obtenção e aplicação; explorar espécies perenes em relação às anuais, permitindo a coleta periódica do material vegetal; coletar estruturas vegetais que não comprometam o desenvolvimento da planta, como frutos e folhas, seguidos por caules e raízes; quando possível e apropriado realizar o cultivo da planta inseticida, de maneira a aumentar a disponibilidade de recurso vegetal. Em relação à introdução e cultivo dessas espécies vegetais com propriedades inseticidas, torna-se necessário um profundo estudo econômico e ambiental a respeito dessa real necessidade, pois muitas vezes as espécies nativas podem apresentar resultados semelhantes às introduzidas. Aspectos sobre os custos envolvidos na introdução e obtenção de matéria-prima

vegetal e dos produtos botânicos prontos para utilização também são importantes e devem ser considerados.

Alguns produtos à base de óleos e extratos misturados com substâncias inertes, que melhoram suas características e, portanto, sua eficiência (VENDRAMIM; BOGORNÍ, 2002), podem ser obtidos comercialmente, possibilitando o seu emprego em maiores escalas. Atualmente, há um mercado promissor para bioinseticidas ou inseticidas naturais, sendo que o interesse em desenvolver e usar produtos botânicos para o manejo de pragas está novamente aumentando nos últimos anos, com um crescimento anual estimado na ordem de 10 a 15% (ISMAN, 1997). No entanto, compostos químicos naturais chegaram a representar 7,5% do mercado de produtos químicos, farmacêuticos, veterinários e de proteção de plantas (PRIMO YUFERA, 1989), enquanto que os inseticidas botânicos constituem apenas 1% do mercado mundial de inseticidas (ISMAN, 1997).

Algumas barreiras para a comercialização de inseticidas botânicos têm impossibilitado sua maior participação no mercado de insumos agrícolas. Entre essas limitações, está a escassez de recursos botânicos, a falta de padronização e de controle de qualidade das formulações e dificuldades de registro desses fitoquímicos (ISMAN, 1997; MENEZES, 2005), o que impede que muitos pesticidas alcancem a esfera comercial em países onde existe grande demanda desses produtos. No entanto, a busca de novos inseticidas botânicos constitui-se num campo de investigação aberto, amplo e contínuo (VIEGAS JÚNIOR, 2003), sendo que a grande variedade de substâncias presentes na flora ainda configura-se num enorme atrativo na área de controle de insetos (MACIEL et al., 2010).

2.2.2 Aleloquímicos vegetais como moléculas-modelo para a síntese de novos agroquímicos

Um dos caminhos para a síntese de novos agroquímicos é a utilização de moléculas-modelo advindas de metabólitos de defesa das plantas. Segundo Mairesse (2005), a elucidação da estrutura química de metabólitos secundários pode permitir a síntese de novos produtos socialmente mais aceitáveis; e a identificação, o sequenciamento e a clonagem de genes responsáveis pela expressão genética de

aleloquímicos podem tornar viável a transferência de resistência a cultivos agrícolas, dispensando o uso de agroquímicos. Para isso, há a necessidade de identificar o composto bioativo, por meio de biotestes com extratos vegetais, que poderão indicar espécies de plantas mais promissoras na prospecção de genes ou substâncias que atuam na defesa vegetal contra estresses bióticos.

Como exemplos de plantas que permitiram a obtenção de novos produtos sintéticos, podem ser citados *Physostigma venenosum* (Fabaceae), cujos compostos secundários, especialmente a fisostigmina, foram tomados como modelo para a síntese dos carbamatos, e *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae), matéria-prima da qual se extraem as piretrinas, precursoras dos piretroides (GALLO et al., 2002). Nessa linha, o Brasil, país detentor da maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas (SIMÕES; SCHENKEL, 2002), possui um enorme potencial no desenvolvimento de novos agentes ativos baseados em produtos naturais. No entanto, devem ser desenvolvidas linhas de ação voltadas para a exploração racional dessa riqueza vegetal pelo homem, aliado a políticas regulatórias que garantam a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas tropicais.

Na busca pelo desenvolvimento de novos agentes ativos baseados em produtos naturais, várias estratégias são empregadas (MULLA; TIANYUN, 1999). De uma maneira geral, a pesquisa inicia-se com extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes, tais como hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, metanol e água. Em seguida, os extratos ativos são fracionados por meio de métodos cromatográficos e as frações obtidas são testadas novamente, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) composto(s) ativo(s) (SHAALAN et al., 2005). A escolha do bioensaio mais apropriado depende dos hábitos dos insetos a serem combatidos (SIMÕES et al., 1998). Para pragas de produtos armazenados, podem ser utilizadas amostras de grãos tratados com os respectivos compostos, avaliando-se a diferença na oviposição, duração do ciclo biológico, peso e tamanho, mortalidade (sobrevivência) das fases imaturas e da fase adulta, fecundidade, fertilidade etc. (GALLO et al., 2002). No entanto, adaptações metodológicas devem ser realizadas de acordo com as condições do estudo e com os objetivos elencados.

Cabe salientar, no entanto, que a toxicidade de uma substância química em insetos não a qualifica necessariamente como um inseticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos (VIEGAS JÚNIOR, 2003). Assim, estudos prévios devem ser criteriosamente realizados antes da recomendação do uso direto de tais substâncias. No entanto, os compostos bioativos isolados poderão ser utilizados em ensaios de biotransformação para tentativas de transformações estruturais visando à potencialização e/ou expansão do espectro de atividade biológica ou seguir diretamente para o planejamento da síntese química em laboratório.

2.3 Inseticidas botânicos no manejo integrado de insetos-praga de grãos armazenados

Alguns trabalhos de pesquisa têm demonstrado a viabilidade do uso de compostos bioativos obtidos de plantas no controle de pragas de grãos armazenados. As plantas com ação inseticida têm sido utilizadas como método alternativo de controle por meio de produtos nas formas de pós, óleos e extratos para as principais pragas de produtos armazenados em muitos países da América Latina, África e Ásia (MAZZONETTO, 2002), apresentando toxicidade por via de contato, ingestão e fumigação (ALMEIDA et al., 2005; ESTRELA et al., 2006). Os efeitos provocados por essas substâncias são: mortalidade, repelência, inibição da oviposição, aumento da duração do desenvolvimento larval e redução na fecundidade e fertilidade dos adultos (MARTINEZ; VAN EMDEN, 2001).

2.3.1 Bioatividade de inseticidas botânicos sobre *S. zeamais*

A bioatividade de substâncias oriundas de espécies vegetais bem como a sua potencialidade no manejo de *S. zeamais* e de outras pragas de importância econômica de grãos armazenados tem sido demonstrada em alguns estudos.

Como prática caseira, Golob e Kilmister (1982) mencionam que, no sudeste da África, agricultores usam pó de tabaco, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), para controlar infestações de *S. zeamais* durante o armazenamento do milho. No Brasil, a utilização de folhas de eucalipto entre camadas de espigas de milho é prática relativamente comum entre os pequenos agricultores (SANTOS; CRUZ; FONTES, 1984). Por sua vez, a pimenta-do-reino, *Piper nigrum* (Piperaceae), moída, constituiu-se uma fonte segura e promissora de inseticida natural, sendo que seus frutos possuem alcaloides, especificamente do grupo amida insaturada, com ação tóxica sobre muitas pragas de grãos armazenados (MIYAKADO; NAKAYAMA; OHNO, 1989), configurando-se em uma excelente alternativa doméstica para a proteção de grãos e subprodutos.

Entre as espécies botânicas com potencial para uso no manejo de insetos-praga de grãos armazenados, as piperáceas destacam-se pelo grande número de investigações. Assim, Oji (1991) verificou que o pó e o extrato de sementes de *Piper guineense* (Piperaceae) são letais para adultos de *S. zeamais* por um período de até seis meses, ocasionando significativa redução dos danos ocasionados pelos gorgulhos, contudo, sem prejudicar a germinação das sementes. Já os óleos essenciais de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* apresentam efeito inseticida a *S. zeamais*, sendo que sua eficácia é dependente da via de intoxicação e da concentração do óleo aplicado. Em adição, Estrela et al. (2006) verificaram as propriedades inseticida e repelente de extratos de sementes dessas mesmas espécies.

Mordue; Blackwell (1993) observaram que o limonoide azadiractina e outros compostos potencialmente bioativos encontrados no óleo e no extrato de sementes de nim, *A. indica*, são eficientes e promissores para o controle de pragas de grãos armazenados. Desse modo, Maredia; Segura e Mihm (1992) verificaram alterações na sobrevivência de adultos de *S. zeamais* expostos ao pó e ao óleo de sementes de nim.

Pós de espécies vegetais, pertencentes a 38 famílias, foram testadas para avaliar o efeito na sobrevivência e emergência de adultos de *S. zeamais* e *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) por Rodríguez e Sanches (1994). Em relação a *S. zeamais*, das espécies testadas, 22 espécies mostraram promissora bioatividade, com melhores resultados para pós de folhas de *Pimenta dioica* (Myrtaceae), ocasionando 63,4% de

mortalidade, e pós de folhas de *Carica papaya* (Caricaceae), reduzindo em 36% a emergência de adultos.

O óleo extraído da semente de noz-noscada, *Myristica fragans* (Myristicaceae), segundo Huang et al. (1997), confere efetiva proteção contra *S. zeamais*, apresentando efeito por via de contato e fumigação. Já os óleos extraídos de *Cocos nucifera* (Arecaceae), *Arachis hypogaea* (Fabaceae) e *Glycine max* (Fabaceae), na concentração de 10 mL kg⁻¹ de grãos de milho, causam respectivamente, 98; 100 e 100% de mortalidade de adultos de *S. zeamais* (OBENG-OFORI; AMITEYE, 2005).

O pó de *Peumus boldus* (Monimiaceae) é um outro efetivo controlador de *S. zeamais* em milho armazenado (SILVA; LAGUNEZ; RODRÍGUEZ, 2003). Os autores constataram ainda que os pós de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (Apiaceae), *Melissa officinalis* (Lamiaceae) e *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) apresentam efeitos insetistáticos para o gorgulho-do-milho.

De acordo com estudos de Almeida et al. (2005), *S. zeamais*, na fase adulta, é controlado pelo uso de extrato da rutácea *Citrus sinensis* (98,62%) e de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) (97,87%) e pelo extrato de *N. tabacum* (96,50%), pelo método de vaporização. Já a fase imatura do gorgulho é controlada pelos extratos de *N. tabacum* e *C. citratus* verificando-se mortalidade de 96,55 e 95,07%, respectivamente.

Silva et al. (2005), ao avaliarem a bioatividade do pó de 23 espécies vegetais, concluíram que o pó de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae) e de *P. boldus* são efetivos controladores de *S. zeamais* em milho armazenado. No entanto, os autores verificaram que o efeito residual do pó dessas duas espécies é inferior a 30 dias, o que limita sua aplicação como protetores de grãos.

Silva-Aguayo et al. (2005) estudaram a ação de três espécies de *Chenopodium* no controle de *S. zeamais*, sendo que apenas o pó de *C. ambrosioides* controlou eficazmente o gorgulho-do-milho, sendo a inflorescência a estrutura que apresentou as maiores propriedades inseticidas. Entretanto, Tavares e Vendramim (2005) constataram que o pó de frutos e da planta inteira (com frutos) de *C. ambrosioides* apresenta atividade inseticida sobre adultos do gorgulho-do-milho e que extratos aquosos dessas estruturas vegetais não afetam a sobrevivência e a emergência de adultos de *S. zeamais*.

Os óleos fixos de palma, *Elaeis guineensis* (Arecaceae), reduziram a emergência de adultos de *S. zeamais* em grãos de milho, durante seis meses de armazenamento (ABULUDE et al., 2007). Efeitos semelhantes foram observados com os óleos essenciais de *Vernonia amigdalyna* (Asteraceae), em teste de contato e ingestão (ASAWALAM; HASSANALI, 2006), e pelos óleos essenciais dos frutos inteiros e fibras dos frutos de *Xylopia aethiopica* (Annonaceae), em teste de contato e ingestão (KOUNINKI et al., 2007).

O óleo essencial extraído de folhas frescas de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae) é um efetivo controlador de *S. zeamais*, apresentando toxicidade por meio do contato, da aplicação tópica e via fumigação (FAZOLIN et al., 2007). Nesse estudo, os autores constataram percentagens de mortalidade próximas a 100%, nas concentrações entre 2 e 5% (m/v) (contato); 3 e 5% (m/v) (fumigação) e 10% (m/v) para o efeito de aplicação tópica. Adultos de *S. zeamais*, também foram controlados por extratos hexânicos e metanólicos da erva medicinal chinesa *Stemona sessilifolia* (Stemonaceae), em teste de aplicação tópica (LIU; GOH; HO; 2007).

Moreira et al. (2007) constataram a atividade inseticida do extrato hexânico de *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) sobre *S. zeamais*, *Rhyzopherta dominica* (F.) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.). Após o fracionamento desse extrato, os autores verificaram que a substância bioativa presente nessa espécie vegetal para as três espécies de coleópteros-praga é a cumarina, com DL_{50} variável entre 2,72 e 39,71 mg g⁻¹.

Ogunleye e Adefemi (2007) verificaram a atividade inseticida do pó e do extrato metanólico de *Garcinia kola* (Clusiaceae) em relação a *S. zeamais*, sendo esta atribuída à presença de terpenos, esteroides, cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos, ligninas, xantonas e antraquinonas na fração mais polar do extrato dessa espécie vegetal.

Llanos; Arango e Giraldo (2008) avaliaram a atividade inseticida de extratos de sementes de *Annona muricata* (Annonaceae) e constataram que o extrato hexânico dessa espécie foi o que apresentou maior efeito inseticida sobre adultos de *S. zeamais*, sendo o efeito observado atribuído pelos autores, possivelmente pela presença de acetogeninas e alcaloides.

O óleo essencial de folhas de *Mentha longifolia* (Lamiaceae), na dose de 50 $\mu\text{l g}^{-1}$ de grão de milho, ocasiona 100% de mortalidade de adultos de *S. zeamais* e configura-se em potencial alternativa para a proteção de grãos armazenados em relação a essa espécie-praga (ODEYEME; MASIKA; AFOLAYAN, 2008).

Souza et al. (2008) constataram a bioatividade do extrato hexânico de *Attalea phalerata* (Arecaceae), que ocasionou 36,5% de mortalidade de adultos de *S. zeamais* ao décimo dia de exposição, e de extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e em hidroálcool de *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae), que conferiram mortalidade de adultos variável entre 52 e 80,5%.

Estudo de Epidi; Nwani e Udoh (2008) demonstrou que o pó de folhas de *Vitex grandifolia* (Verbenaceae) tem grande potencial de uso para o controle de *S. zeamais* em milho armazenado. Da mesma forma, Othira et al. (2009) verificaram que extratos da planta inteira e o óleo essencial de *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) possuem significativa atividade repelente para *S. zeamais*, mesmo em baixas concentrações.

O óleo essencial obtido de *Citrus bergamia* (Rutaceae) e *Lavandula hybrida* (Lamiaceae) ocasionam alta repelência para *S. zeamais* (COSIMI et al., 2009). Ao analisar a composição química desses óleos, os autores verificaram que o limoneno é o principal constituinte do óleo de *C. bergamia* e que as substâncias prevaletentes no óleo de *L. hybrida* são o linalol e o acetato de linalina.

Nerio; Olivero-Verbel e Stashenko (2009) estudaram a atividade repelente a *S. zeamais* dos óleos essenciais oriundos de sete plantas aromáticas cultivadas na Colômbia, sendo que, dos óleos avaliados, seis apresentaram atividade repelente para o gorgulho-do-milho, sendo *Lippia organoides* (Verbenaceae) o mais ativo. Por sua vez, Ukeh et al. (2009) verificaram o potencial repelente de substâncias isoladas das zingiberáceas *Aframonium melegueta* e *Zingiber officinale*.

Extratos etanólicos de folhas de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae), *E. grandis* (Myrtaceae) e *Cupressus arizonica* (Cupressaceae) apresentam alta toxicidade para *S. zeamais* (AKOB; EWETE, 2009). Recentemente, Fazolin et al. (2010) verificaram que a fumigação de milho com 50 g de segmentos de caules verdes de *T. nocturnum* proporciona redução na infestação por *S. zeamais* e na perda de peso de grãos

comparável à do fosfeto de alumínio, constituindo-se em uma excelente alternativa de inseticida para expurgo de cereais armazenados.

Tadsadjieu et al. (2010) constataram a ação simultânea de três óleos essenciais sobre *S. zeamais* e *Aspergillus flavus*, com destaque para o óleo essencial de *O. gratissimum* (na dose de 60 µL/ 200 g de grãos), o qual controlou eficazmente o gorgulho-do-milho e reduziu consideravelmente o crescimento micelial de *A. flavus*.

2.4 Uso de pós inertes no manejo integrado de pragas de grãos armazenados

O uso de pós inertes para a proteção de grãos armazenados é uma técnica antiga, utilizada desde as civilizações astecas do México, os quais misturavam cal ao milho para prevenir o ataque de insetos em grãos armazenados (GOLOB, 1997). No entanto, somente nos últimos cinquenta anos foram realizados estudos com o intuito de comercializar em larga escala esses materiais para uso na proteção de grãos.

Existem quatro tipos básicos de pós inertes passíveis de serem usados para a proteção de grãos armazenados a insetos-praga: argilas, areias e terra; terra de diatomáceas; sílica aerogel e pós não derivados da sílica (BANKS; FIELDS, 1995; LORINI, 1998; LORINI; MÓRAS; BECKEL, 2002), os quais podem ser diferenciados pela sua composição química ou pelo seu nível de atividade (GOLOB, 1997).

O modo de ação de pós inertes é físico, sendo que a morte do inseto se dá por meio da aderência dos pós inertes à epicutícula dos insetos por carga eletrostática (Figura 3), levando à desidratação corporal, em consequência da ação de adsorção de ceras da camada lipídica pelos cristais de sílica ou de abrasão da cutícula, ou de ambas (SUBRAMANYAM; ROESLI, 2000; MEWIS; ULRICH, 2001). Quando as moléculas de cera da camada superficial são adsorvidas pelas partículas de sílica, ocorre o rompimento da camada lipídica protetora, o que permite a evaporação dos líquidos do corpo do inseto (KORUNIC, 1998).

Figura 3 - Eletromicrografias de *Sitophilus zeamais*: A e C corpo e antena, respectivamente, sem tratamento com terra de diatomácea; B e D corpo e antena, respectivamente, com partículas de terra de diatomácea adsorvidas (CERUTI, 2007)

A terra de diatomácea é o pó inerte mais conhecido e estudado, sendo que duas formulações comerciais (Keepdry® e Insecto®) estão registradas no Brasil para o uso no controle de insetos na armazenagem de grãos (AGROFIT, 2010). Tais produtos são provenientes de algas diatomáceas fossilizadas, possuindo o dióxido de sílica como o principal componente (LORINI, 1999). Entretanto, outros minerais são verificados em sua composição, incluindo alumínio, óxido de ferro, magnésio, sódio e cálcio (GOLOB, 1997).

O preparo da terra de diatomácea para uso comercial é feito por extração, secagem e moagem do material fóssil, o qual resulta em um pó seco, de fina granulometria (LORINI; MÓRAS; BECKEL, 2003). As fontes de terra de diatomácea são o fundo do mar ou dos rios de água doce. Formulações à base de terra de diatomácea de origem marinha são eficazes contra insetos de grãos armazenados na proporção de 0,1% (p/p) (GOLOB, 1997). Segundo esse autor, produtos originados de água doce são

menos eficientes do que os produtos obtidos do ambiente marinho, os quais exigem pelo menos o dobro da dose para produzir níveis semelhantes de controle.

Além da origem geológica e das propriedades físicas (VAYIAS et al., 2009), a atividade inseticida de formulações de terra de diatomácea também pode ser afetada pela mobilidade dos insetos, pelo número e distribuição de pêlos na cutícula, pelas diferenças quantitativas e qualitativas nos lipídios cuticulares nas diferentes espécies de insetos, pelo tempo de exposição e pela umidade relativa do ar, fatores que influenciam a taxa de perda de água, afetando consequentemente a eficiência dos pós inertes (BANKS; FIELDS, 1995; GOLOB, 1997; ALVES; OLIVEIRA; NEVES, 2008). Além disso, o tipo de grão pode interferir na taxa de aderência do produto e na sua atividade biológica (KAVALLIERATOS et al.; 2005; CHAMBANG et al., 2006).

De acordo com Lorini (2002), formulações à base de terra de diatomácea apresentam-se seguras para operadores e consumidores, com ação inseticida duradoura, pois não perde seu efeito ao longo do tempo; e sem período de carência para o consumo dos grãos tratados, visto tratar-se de um produto atóxico. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas, como o seu efeito na redução da fluidez e densidade dos grãos, o desgaste antecipado de equipamentos e, principalmente, os problemas de saúde ocasionados pela poeira e pela exposição à sílica cristalina, substância prejudicial ao sistema respiratório humano (FIELDS, 1998).

2.4.1 Efeito de pós inertes sobre *S. zeamais*

Em virtude do uso de pós inertes vir ao encontro das exigências dos usuários por produtos eficientes e que respeitem a saúde dos consumidores e do ambiente, diversos estudos vêm sendo realizados visando avaliar a eficácia dessa técnica.

A comparação realizada por Lorini et al. (2001) entre terra de diatomácea e fosfina para o tratamento de grãos de milho demonstrou a superioridade do uso de terra de diatomácea já no primeiro ano de utilização. Stathers; Denniff e Golob (2004) também avaliaram a eficácia e persistência de produtos comerciais à base de terra de diatomácea para o controle de *S. zeamais*, constatando que esse pó inerte causa significativa mortalidade de adultos e reduz a progênie da geração exposta.

Arthur e Trone (2003) verificaram a eficácia de terra de diatomácea em relação a *S. oryzae* e *S. zeamais*, e observaram que o tratamento com terra de diatomácea ocasiona redução no número de insetos emergidos na segunda geração, e que tanto as fases larval e pupal desses insetos, como os adultos emergidos, são suscetíveis a esse tratamento. Já Mazzuferi et al. (2006) constataram níveis satisfatórios de controle de *S. zeamais* após 120 dias de armazenagem, verificando que esse tratamento impediu a reprodução dos insetos e permitiu a manutenção da qualidade dos grãos durante todo o período de avaliação. Da mesma forma, Marsaro-Júnior et al. (2007) verificaram que a aplicação de terra de diatomácea em grãos de milho na dosagem de 1 kg t^{-1} apresenta alta eficiência no controle de *S. zeamais* em curto espaço de tempo.

Outros pós inertes também vem sendo estudados para o controle de *S. zeamais*. O tratamento de grãos de milho com cinzas provenientes da queima de *E. grandis* (Myrtaceae) e *O. gratissimum* (Lamiaceae), na proporção de $0,01 \text{ g g}^{-1}$ de grãos, reduz significativamente a emergência de adultos de *S. zeamais*, enquanto que a cinza de *E. grandis*, na mesma dosagem, reduz as perdas ocasionadas por *S. zeamais*, por um período de até seis meses (AKOB; EWETE, 2007). Outros pós inertes com excelente bioatividade são a cal hidratada e a cal virgem que, quando aplicadas em grãos de milho, na dosagem de 2 kg t^{-1} , controlam eficientemente *S. zeamais*, não apresentando diferença em relação aos tratamentos padrão (terra de diatomácea e deltametrina 0,2%) (RIBEIRO et al., 2008).

2.5 Associação de pós inertes e inseticidas naturais: perspectivas para o desenvolvimento de novas formulações

A combinação de pós inertes com inseticidas naturais pode se configurar em uma estratégia interessante para potencializar o efeito inseticida, por meio de possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos. Tal combinação, em hipótese, pode reduzir a incidência de populações resistentes para ambas as técnicas de controle, por meio da combinação de diferentes mecanismos de ação; minimizar as limitações do uso de terra de diatomácea, principalmente da poeira nas estruturas de armazenagem por meio da redução das doses utilizadas e reduzir a taxa de degradação de substâncias naturais

fotoinstáveis, por meio de um possível efeito protetor dos pós inertes. Com base nessa perspectiva, alguns estudos foram realizados recentemente.

A mistura de cal e pó de *P. boldus*, nas proporções de 0,5:0,5 e 0,4:0,6, causam mortalidade de *S. zeamais* acima de 97%, em condições de laboratório. Já em ambiente de armazenagem, todas as combinações de *P. boldus* e cal exibiram uma alta eficácia, não diferindo do tratamento padrão (malathion) (SILVA-AGUAYO et al., 2006).

Athanassiou, Korunic e Vayias (2009) verificaram que uma formulação de terra de diatomácea reforçada com extratos de raízes de *Celastrus angulatus* (Celastraceae), denominada como DEBBM-P/WP, foi mais efetiva que a aplicação somente de terra de diatomácea, sugerindo a ocorrência de efeito sinérgico entre as duas técnicas.

A combinação de óleo essencial de *Allium sativum* (Amaryllidaceae) com terra de diatomácea proporciona um forte efeito aditivo no controle de coleópteros-praga de grãos armazenados (YANG et al., 2010). Segundo os autores, adultos estressados com o contato no substrato tratado com o óleo essencial ficam mais vulneráveis à ação da terra de diatomácea. Na mesma linha, Islan et al. (2010) constataram que a aplicação dos monoterpenos eugenol e cinamaldeído, constituintes de muitos óleos essenciais, proporciona significativo incremento na eficácia de uma formulação de terra de diatomácea, sendo esse efeito refletido na dose letal média necessária para o controle de *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) e *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae).

Nguemtchouin et al. (2010) utilizaram argila caulinítica como suporte do óleo essencial de *X. aethiopica* no preparo de uma formulação inseticida visando à proteção de grãos de milho contra *S. zeamais*. Os resultados obtidos com a formulação proposta foram comparáveis ao inseticida Poudrox[®] (um inseticida sintético à base de malathion).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é resultante da parceria do Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), com o Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como parte das atividades do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Controle Biorracional de Insetos Pragas, sediado na UFSCar. Assim, os ensaios biológicos foram conduzidos no Laboratório de Plantas Inseticidas da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, enquanto que as extrações, as análises cromatográficas e os fracionamentos e partições químicas foram desenvolvidas no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, em São Carlos, SP.

3.1 Estabelecimento e manutenção da criação de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855

A criação de *S. zeamais* foi estabelecida a partir de exemplares obtidos de uma população mantida no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP. A confirmação da espécie foi realizada pelo Dr. Roberto Antônio Zucchi (ESALQ/USP), por meio do estudo da genitália de alguns espécimens adultos.

Os insetos utilizados nos bioensaios foram criados em sala climatizada à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$, fotofase de 14 horas e luminosidade média de 172 lux, em frascos de vidro com capacidade para três litros, com a boca vedada com tecido fino (*voile*). Grãos de trigo foram utilizados como substrato para a manutenção da criação de *S. zeamais*, os quais foram expostos, previamente, a -10°C , por pelo menos 48 horas, em um congelador doméstico, com vistas a eliminar insetos contaminantes (SILVA-AGUAYO et al., 2004). Feito isso, os grãos foram mantidos em sala climatizada, nas condições mencionadas anteriormente, por um período de 30 dias antes de sua utilização, para atingirem o equilíbrio higroscópico.

3.2 Obtenção das espécies e preparação dos extratos vegetais

Os dados de coleta das estruturas vegetais utilizadas no preparo dos extratos encontram-se elucidados na Tabela 1. Após a coleta, foi obtida uma excicata de cada uma das espécies, as quais foram encaminhadas para identificação específica aos seguintes taxonomistas: Dr. Heimo Rainer, do Department of Systematics and Evolution of Higher Plants, University of Vienna e Dr. Renato de Mello-Silva, do Instituto de Biociências, USP, para identificação das Annonaceae; Dr. Lindolpho Capellari Júnior, do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, para identificação da Aristolochiaceae e Dr. Gerson Oliveira Romão, do Museu E.S.A., do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, para identificação da Salicaceae. No entanto, durante a coleta e no decorrer do ano, não se constataram estruturas reprodutivas no exemplar da espécie de Aristolochiaceae estudada, o que impediu uma identificação específica mais precisa.

Para a preparação dos extratos, as estruturas vegetais coletadas foram desidratadas em estufa a 40°C, por um período de 48 a 72 horas. Posteriormente, os materiais foram moídos em um moinho de facas, obtendo-se os pós vegetais, que foram armazenados, separadamente por espécie e estrutura vegetal, em vidros hermeticamente fechados até sua utilização.

Os extratos orgânicos foram obtidos por maceração, utilizando-se como solventes (na proporção de 5:1, p/v), em ordem crescente de polaridade, o hexano (polaridade: 0,06), o diclorometano (polaridade: 3,4) e o etanol (polaridade: 5,2). Para cada solvente, foi feita a extração até a exaustão, utilizando-se a seguir o solvente de polaridade imediatamente superior. A cada troca de solvente, filtrou-se o macerado através de papel filtro, e eliminou-se o solvente da amostra remanescente em rotoevaporador a 40°C e à pressão de -600 mmHg. Após a completa evaporação do solvente em câmara com fluxo de ar, determinou-se o rendimento da extração para cada estrutura das espécies vegetais, nos distintos solventes utilizados.

Tabela 1 - Espécies, famílias botânicas e estruturais vegetais utilizadas no estudo com *Sitophilus zeamais*, com os seus respectivos locais e datas de coleta

Espécie	Família botânica	Estrutura coletada	Local de Coleta	Data de coleta
<i>Annona montana</i> Macfadyen	Annonaceae	Folhas, ramos e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (Lat.: 22°42' 29"S, Long.: 47°37'36"O)	22/01/2010
<i>Annona mucosa</i> Jacquin	Annonaceae	Folhas, ramos e sementes	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (Lat.: 22°42' 26"S, Long.: 47°37'39"O)	22/01/2010
<i>Aristolochia cf. paulistana</i> Hoehne	Aristolochiaceae	Ramos	Dist. Coronel Finzito, Erval Seco, RS (Lat.: 27°31' 54"S, Long.: 53°33'13"O)	10/01/2010
<i>Casearia sylvestris</i> Swartz	Salicaceae	Folhas e ramos	Campus ESALQ/USP, Piracicaba, SP (Lat.: 22°42' 50"S, Long.: 47°37'36"O)	16/01/2010

3.3 Análise cromatográfica dos extratos obtidos

Para verificar as diferenças qualitativas dos grupos químicos presentes em cada extrato, foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos orgânicos obtidos. A CCD é uma técnica de adsorção líquido-sólido, onde a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Para isso, utilizaram-se cromatofolhas de alumínio com 0,2 mm de sílica aerogel com indicador fluorescente UV 254 nm (Macherey-Nagel Co., Diiren, Germany).

As amostras a serem analisadas por CCD foram aplicadas a aproximadamente 0,5 cm da base inferior da placa, por meio de um tubo capilar, permitindo, dessa forma, que a amostra fosse adsorvida pela fase estacionária. Em seguida, a cromatoplaça foi introduzida numa cuba contendo a fase móvel (eluente), na qual se utilizou uma solução de hexano:acetona (3:2, v/v), proporção definida a partir de testes preliminares. A cromatoplaça foi deixada na cuba até que o eluente subisse, por capilaridade, até aproximadamente 0,5 cm da extremidade superior da placa. Feito isso, a cromatoplaça foi retirada da cuba e logo após foi aplicada sobre a cromatoplaça uma solução reveladora de vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento com um secador industrial. Além da solução reveladora, a visualização dos resultados obtidos também foi efetuada por meio de luz ultravioleta (254 e 365 nm). No entanto, em virtude da dificuldade na distinção entre os compostos revelados pela solução reveladora e pela luz ultravioleta, em virtude da sobreposição de grupos químicos com mesmo fator de retenção (R_f), optou-se pela utilização apenas da exposição dos resultados obtidos com a solução de vanilina sulfúrica na análise dos extratos orgânicos brutos.

3.4 Bioensaios

Todos os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas e luminosidade média de 172 lux. Como substrato para realização dos testes, utilizaram-se, em todos os bioensaios, grãos de milho inteiros, previamente selecionados manualmente, do híbrido AG 1051 (dentado amarelo; semiduro), obtidos de um cultivo realizado na área experimental do Departamento de Entomologia e Acarologia, na safra 2009/2010.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, exceto quando especificado na descrição do bioensaio.

3.4.1 Testes preliminares

Bioensaios preliminares foram realizados com o intuito de determinar o volume de calda a ser utilizado, verificar a uniformidade da aplicação dos extratos na massa de grãos e avaliar possíveis efeitos, sobre *S. zeamais*, dos solventes orgânicos passíveis de serem utilizados na ressuspensão dos extratos vegetais.

3.4.1.1 Determinação do volume de calda a ser aplicado e avaliação da uniformidade da distribuição

Para determinação do volume de calda a ser aplicado nos bioensaios definitivos, bem como da uniformidade de distribuição dos extratos vegetais em grãos de milho, testes preliminares foram conduzidos utilizando-se uma calda composta pelo corante alimentício azul brilhante (Corante Azul FCF[®], Duas Rodas Industrial), na concentração de 5.000 mg L⁻¹, dissolvido previamente em água deionizada, conforme proposto por Simões; Teixeira e Faroni (2009).

Para a aplicação dos diferentes volumes de calda, utilizou-se um microatomizador acoplado a uma bomba pneumática, ajustada para propiciar uma pressão de 0,5 kgf/cm². Após a pulverização, a mistura dos grãos com os extratos foi feita manualmente, em sacos plásticos com capacidade para dois litros, os quais foram agitados por um minuto. Feito isso, análises visuais da uniformidade de distribuição do corante ao longo dos grãos foram efetuadas para os distintos volumes de calda aplicados.

Com base nos perfis de distribuição obtidos, constatou-se uma satisfatória distribuição do corante empregado na massa de grãos com a aplicação de um volume de calda de 30 L t⁻¹ e nas demais condições de pressão de pulverização e modo de homogeneização mencionadas (Figura 4). Assim, nos bioensaios seguintes, tais condições foram adotadas, sendo que, na homogeneização de cada tratamento, utilizaram-se sacos plásticos individuais.

Figura 4 - Perfil da distribuição do corante azul brilhante (esquerda) em grãos de milho, por meio da aplicação de um volume de calda de 30 L t^{-1} , em comparação a grãos não pulverizados (direita)

3.4.1.2 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre *S. zeamais*

De acordo com a polaridade química dos extratos vegetais a serem testados, foram realizados ensaios para verificar a atividade inseticida e o efeito no comportamento do gorgulho-do-milho de alguns solventes orgânicos passíveis de serem utilizados na ressuspensão dos referidos extratos: acetona, etanol, metanol e água deionizada. O procedimento adotado nesse teste foi o mesmo utilizado no *screening* (descrito no item 3.4.2.1.1). Assim, cada tratamento foi constituído pela aplicação de cada um dos solventes, adotando-se como controle o tratamento constituído por água deionizada. Antes da infestação, os grãos tratados foram deixados por um período de 2 horas em câmara de fluxo laminar, para evaporação do solvente utilizado.

Assim, com base nos resultados obtidos neste teste e em avaliações de solubilidade dos extratos vegetais nos diferentes solventes orgânicos, foram selecionados os solventes adequados para a ressuspensão dos extratos.

3.4.2 Bioensaios definitivos

3.4.2.1 Avaliação da ação de extratos orgânicos de plantas com atividade inseticida a *S. zeamais*

3.4.2.1.1 Screening para identificação dos extratos promissores

Para a discriminação dos extratos que apresentaram maior bioatividade sobre *S. zeamais*, foram realizados bioensaios para verificar a atividade inseticida, o efeito na progênie F1 e nos danos de *S. zeamais*, bem como a ação dos extratos vegetais no comportamento do gorgulho-do-milho. Todos os extratos foram testados nas concentrações de 300 e 1.500 ppm (correspondendo a 300 e 1.500 mg de extrato kg⁻¹ de milho, respectivamente).

3.4.2.1.1.1 Avaliação da atividade inseticida

Para realização deste bioensaio, foram utilizadas placas de Petri (6 cm de diâmetro e 2 cm de altura) contendo amostras de 10 g de milho, as quais foram tratadas, separadamente, com os respectivos extratos vegetais, além de uma testemunha, onde foi mantido apenas o substrato de criação tratado com o respectivo solvente utilizado na ressuspensão dos extratos.

Cada caixa plástica foi infestada por 20 adultos, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias, utilizando-se 10 repetições por tratamento. A sobrevivência dos adultos foi avaliada ao 10º dia após a infestação. Foi considerado morto o indivíduo cujas extremidades estavam completamente distendidas e que não apresentava reação ao contato com um pincel, durante um minuto de observação.

3.4.2.1.1.2 Avaliação da progênie F1 e danos

As mesmas unidades amostrais do teste anterior foram utilizadas neste bioensaio. Os grãos foram tratados com os respectivos extratos, infestados com 20 adultos não sexados e com idade entre 10 e 20 dias. Decorridos 10 dias da infestação, os adultos foram retirados e as unidades amostrais mantidas nas condições climáticas mencionadas anteriormente. Da mesma forma que no bioensaio anterior, utilizaram-se 10 repetições tratamento⁻¹.

Decorridos 60 dias da infestação inicial, o número de adultos emergidos foi contado em cada placa. Nesse momento, também foram estimados os danos ocasionados pela alimentação de *S. zeamais*, verificando-se a percentagem de grãos danificados ou perfurados em cada amostra, por meio da avaliação visual de cada grão.

Feito isso, a perda de peso de grãos (%) foi estimada com base na equação proposta por Adams e Schulten (1976):

$$Pp(\%) = (Ngd / Ntg) \times 100 \times C$$

onde: Pp= perda de peso (%); Ngd= número de grãos danificados; Ntg= número total de grãos; C= 0,125 se o milho é armazenado em grão solto ou espiga sem brácteas e 0,222 se o milho é armazenado em espiga com brácteas.

3.4.2.1.1.3 Avaliação da atratividade de adultos

Para a avaliação do efeito dos extratos na atratividade de adultos de *S. zeamais*, foram utilizadas 10 arenas (repetições), cada qual constituída por cinco placas de Petri de plástico (6 cm de diâmetro e 2 cm de altura) montadas sobre uma base plástica (30 x 30 cm) (Figura 5). Nessa arena, uma das placas encontra-se fixa no centro da base, sendo conectada às demais por meio de tubos plásticos de igual comprimento.

Figura 5 - Diagrama, em vista diagonal, da arena utilizada nos bioensaios de atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais*

Em uma das placas de Petri (controle) foram colocados 10 g de grãos de milho tratados com o mesmo solvente utilizado para a ressuspensão dos extratos, enquanto que nas demais caixas, foram colocadas amostras de milho tratadas com os

respectivos extratos, escolhidos de forma aleatória dentro de cada bioensaio. No recipiente central foram então liberados 50 adultos de *S. zeamais*, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias. Decorridas 24 horas, avaliou-se o número de insetos em cada recipiente.

Os diversos tratamentos foram comparados entre si por meio do índice de repelência/deterrência (I.R./I.D.) (adaptado de LIN; KOGAN; FISCHER, 1990), calculado pela fórmula $I.R./I.D. = 2G/(G + P)$, onde G= % de insetos nos grãos tratados com o extrato em teste e P= % de insetos nos grãos controle (testemunha). Com base no I.R./I.D. e no desvio padrão obtidos, determinou-se o intervalo de classificação (I.Class.) para as médias dos tratamentos, pela fórmula: $I.Class. = 1 \pm t_{(n-1; \alpha: 0,05)} \times (DP/\sqrt{n})$; onde t= valor de “t” tabelado; DP= desvio padrão; n= número de repetições. Os extratos foram considerados neutros quando o valor de I.R./I.D. esteve compreendido dentro do I.Class. avaliado; repelente e/ou deterrente quando o valor do I.R./I.D. foi inferior ao menor valor obtido para o I.Class.; e atraente e/ou fagodeterrente quando o I.R./I.D. foi superior ao maior I.Class. calculado.

3.4.2.2 Curvas de concentração-resposta dos extratos promissores

Os extratos que apresentaram os resultados mais promissores foram testados para estimar a CL₃₀, a CL₅₀ e a CL₉₀, correspondentes às concentrações necessárias para matar 30, 50 e 90% da população dos gorgulhos, respectivamente. Para escolha dos extratos mais promissores, optou-se pela seleção de todos os extratos que provocaram mortalidade superior a 50% no teste de *screening* descrito anteriormente.

Para essas estimativas, foram realizados testes preliminares com os referidos extratos para verificar as concentrações básicas que provocam mortalidade de adultos de 95% e mortalidade semelhante à obtida na testemunha. Com base nessas concentrações, foram estabelecidas as concentrações a serem testadas, por meio da fórmula (FINNEY, 1971):

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

onde: q= razão de progressão geométrica (p.g.); n= número de concentrações a extrapolar; a_n= limite superior da p.g. (concentração que provoca mortalidade de cerca

de 95%, estimada por meio de teste preliminar); a_1 = limite inferior da p.g. (concentração que provoca mortalidade semelhante ao controle, estimada por meio de teste preliminar).

Os mesmos procedimentos realizados no item 3.4.2.1.1.1 foram adotados para este bioensaio, sendo as avaliações de mortalidade realizadas ao décimo dia.

3.4.2.3 Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀) dos extratos promissores

O TL₅₀ (tempo necessário para matar 50% da população dos gorgulhos) foi estimado na CL₉₀ determinada no bioensaio anterior. Os mesmos procedimentos realizados no item 3.4.2.1.1 foram adotados para este bioensaio, porém, as avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente por um período de 10 dias.

3.4.2.4 Avaliação da atividade inseticida por ação de contato dos extratos promissores

3.4.2.4.1 Contato em superfície contaminada (papel filtro)

A técnica de impregnação dos extratos em discos de papel filtro (TAKEMATSU, 1983) foi utilizada neste bioensaio para investigar o efeito do contato de adultos de *S. zeamais* em superfícies contaminadas com os respectivos extratos vegetais. Para isso, discos de papel filtro com 6 cm de diâmetro foram dispostos sobre alfinetes entomológicos fixados sobre uma base de isopor, visando evitar perdas de solução decorrentes do contato dos discos de papel filtro com a superfície, propiciando uma absorção total dos extratos nos discos (POTENZA; JUSTI JÚNIOR; ALVES, 2006). Feito isso, aplicou-se, sobre os discos de papel filtro, 0,5 mL da solução de cada um dos extratos selecionados na concentração correspondente à CL₅₀ determinada no item 3.4.2.2. Como tratamento-controle, aplicou-se apenas uma solução de acetona, sendo que para cada tratamento foram utilizados seis discos (repetições).

Decorridos 10 minutos da aplicação, tempo necessário para a evaporação do solvente, os discos de papel filtro foram transferidos para placas de Petri (6 x 2 cm), com a tampa recoberta com tecido fino (*voile*) de modo a permitir a livre passagem do ar e impedir a fuga dos insetos. Para garantir a permanência dos gorgulhos sobre os

discos contaminados com os respectivos extratos, aplicou-se uma solução de fluon (politetrafluoroetileno) nas paredes internas das placas, evitando que os insetos subissem pelas paredes das placas. Feito isso, infestou-se cada placa com 20 gorgulhos adultos não sexados e com idade entre 10 e 20 dias e, diariamente, avaliou-se a mortalidade em cada tratamento até o quinto dia após a exposição.

3.4.2.4.2 Contato via aplicação tópica

Para realização deste bioensaio, adultos de *S. zmais*, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias, foram dispostos, em grupos de 10 indivíduos, sobre placas de Petri de vidro (9 x 2 cm), cujas paredes internas tinham sido previamente revestidas por uma camada de solução de fluon, com vistas a evitar a fuga dos insetos durante a aplicação dos extratos.

Os ensaios consistiram na aplicação tópica, na região dorsal de cada gorgulho, de 1 μ L da solução de cada um dos extratos selecionados na concentração correspondente à CL₅₀ determinada no item 3.4.2.2., com auxílio de uma micropipeta. Como tratamento-controle, aplicou-se o mesmo volume de acetona (solvente utilizado na ressuspensão dos extratos).

Posteriormente, os gorgulhos foram transferidos para placas de Petri (6 x 2 cm), com a tampa recoberta com tecido fino (*voile*) de modo a permitir a livre passagem do ar e impedir a fuga dos insetos, formando grupos de 10 indivíduos em cada placa (repetição). Para cada tratamento, foram utilizadas seis placas.

Após uma hora da aplicação, tempo suficiente para evaporação do excesso de solução aplicado sobre o corpo do inseto, estes foram transferidos para placas contendo 5 g de milho como substrato de alimentação.

Diariamente, até o quinto dia após a aplicação, avaliou-se a mortalidade em cada unidade amostral (placa), sendo que cada tratamento constou de seis repetições.

3.4.2.5 Determinação do efeito residual dos extratos promissores

Para determinar o efeito residual dos extratos selecionados no teste de *screening*, amostras de milho (100 g) foram pulverizadas com os respectivos extratos, na CL₉₀ determinada no item 3.4.2.2. Após a aplicação, as amostras foram colocadas em potes plásticos de 250 mL, com a tampa perfurada com furos equidistantes de 2 mm

de diâmetro, de modo a permitir a livre passagem do ar e evitar a contaminação da amostra por insetos. Decorridos 0 (imediatamente após a evaporação do solvente utilizado na ressuspensão dos extratos), 7, 14, 28 e 56 dias da aplicação, as amostras foram divididas em sub-amostras de 10 g (repetições) e ensaiadas para verificar o efeito dos extratos na sobrevivência de adultos de *S. zeamais*. Da mesma forma que nos bioensaios anteriores, cada repetição foi infestada com 20 adultos não sexados e com idade entre 10 e 20 dias, e mantidas em sala climatizada nas mesmas condições climáticas já mencionadas.

Após 10 dias da infestação, foi verificado o número de insetos mortos em cada repetição. Para cada tratamento e tempo de avaliação, utilizaram-se 10 repetições, sendo que para o tratamento-controle (testemunha) utilizaram-se amostras de milho tratadas, no momento da aplicação, com o solvente utilizado na ressuspensão dos extratos.

3.4.2.6 Avaliação da atividade inseticida de formulações à base de terra de diatomácea para adultos de *S. zeamais*

3.4.2.6.1 Curvas de concentração-resposta de duas formulações comerciais de terra de diatomácea

As estimativas da CL₃₀, da CL₅₀ e da CL₉₀, expressas em ppm (mg de terra de diatomácea kg⁻¹ de milho), foram realizadas para duas formulações comerciais à base de terra de diatomácea: Keepdry® (Irrigação Dias Cruz Ltda, Santo André, SP) e Insecto® (Bernardo Química S.A., São Vicente, SP).

Para isso, amostras de grãos de milho (50 g), dispostas em potes plásticos de 250 mL, foram tratadas com as respectivas formulações, nas doses definidas de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.3.2. A mistura do produto com os grãos foi realizada por meio de agitação manual por um minuto de cada pote plástico contendo os grãos e a respectiva concentração do produto. Cada unidade amostral foi infestada com 50 gorgulhos adultos, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias, sendo que para cada tratamento foram utilizadas seis repetições. A avaliação da mortalidade dos gorgulhos foi efetuada ao décimo dia.

3.4.2.6.2 Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀) de duas formulações comerciais de terra de diatomácea

O TL₅₀ (tempo necessário para matar 50% da população dos gorgulhos), para ambas as formulações comerciais de terra de diatomácea, foi estimado nas concentrações de 250, 500, 1.000 e 2.000 ppm. Para isso, os mesmos procedimentos adotados no bioensaio anterior foram empregados neste teste, porém, as avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente por um período de 10 dias.

3.4.2.7 Associação de extratos vegetais e formulações de terra de diatomácea no controle de *S. zeamais*

Entre os extratos vegetais testados nos bioensaios anteriores, foram selecionados os dois que apresentaram os resultados mais promissores, refletidos nas menores concentrações letais média. Da mesma forma, selecionou-se a formulação de terra de diatomácea que se mostrou mais eficiente.

Visando avaliar o efeito interativo de ambas as técnicas, amostras de 50 g de milho foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- T1 - Testemunha (solvente utilizado na ressuspensão dos extratos);
- T2 - Extrato 1 (na CL₃₀ determinada);
- T3 - Extrato 1 (na CL₅₀ determinada);
- T4 - Extrato 2 (na CL₃₀ determinada);
- T5 - Extrato 2 (na CL₅₀ determinada);
- T6 - Terra de diatomácea (na CL₃₀ determinada);
- T7 - Terra de diatomácea (na CL₅₀ determinada);
- T8 - Terra de diatomácea (na CL₃₀) + Extrato 1 (na CL₅₀);
- T9 - Terra de diatomácea (na CL₅₀) + Extrato 1 (na CL₃₀);
- T10 - Terra de diatomácea (na CL₃₀) + Extrato 2 (na CL₅₀);
- T11 - Terra de diatomácea (na CL₅₀) + Extrato 2 (na CL₃₀);

Nas respectivas associações, os grãos foram submetidos primeiramente ao tratamento com os extratos vegetais e após a secagem dos grãos (2 horas), foi

realizado o tratamento com terra de diatomácea, utilizando-se os mesmos procedimentos adotados nos bioensaios anteriores.

Feito isso, cada amostra foi infestada com 50 adultos, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias, com seis repetições tratamento⁻¹. A mortalidade foi avaliada a cada dois dias até o décimo dia de exposição.

3.4.2.8 Fracionamentos biomonitorados dos extratos mais promissores

Com base nos resultados dos ensaios biológicos, na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos brutos obtidos por CCD e no rendimento de extração, selecionaram-se dois extratos para realização de fracionamentos biomonitorados, com a finalidade de se obterem os compostos responsáveis pela bioatividade observada.

3.4.2.8.1 Partição líquido-líquido dos extratos brutos

A partição líquido-líquido, também conhecida como extração por solvente e partição, é um método para separar compostos baseado em suas diferentes solubilidades em dois líquidos imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico. Assim, os extratos selecionados, separadamente, foram ressuspensos em metanol:água (3:1, v/v) e submetidos à partição líquido-líquido, utilizando-se um funil de separação e solventes orgânicos de polaridades crescentes (Figura 6). A utilização desse sistema permitiu agrupar substâncias com polaridades próximas e separar a fase oleosa do extrato, permitindo, dessa forma, o emprego de colunas cromatográficas de sílica.

Figura 6 - Funil de separação (A) e esquema da partição líquido-líquido (B) dos extratos orgânicos brutos selecionados

As partições (frações) obtidas foram concentradas em rotoevaporador sob as mesmas condições de temperatura e pressão já mencionadas no item 3.2. A determinação dos rendimentos foi realizada tendo-se como base as massas dos respectivos extratos brutos.

As frações orgânicas obtidas foram ensaiadas visando avaliar o efeito de cada partição na sobrevivência de adultos de *S. zeamais*. Para isso, amostras de grãos de milho (10 g) foram tratadas com as referidas frações, adotando-se o mesmo procedimento experimental descrito no item 3.4.2.1.1.

A mortalidade dos adultos expostos às respectivas frações foi avaliada ao décimo dia após a exposição, sendo que cada tratamento constou de 10 repetições, e em cada repetição foram expostos 20 gorgulhos adultos, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias.

3.4.2.8.2 Análises químicas das frações bioativas

Visando identificar e isolar os compostos responsáveis pela bioatividade observada nas frações mais ativas, foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H).

3.4.2.8.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os mesmos procedimentos realizados no item 3.3 foram adotados para as análises das frações bioativas dos extratos selecionados, porém, utilizaram-se eluentes de diferentes polaridades [hexano:acetona (3:1, v/v), hexano:acetona (3:2, v/v), hexano:diclorometano (1:3, v/v) e diclorometano puro] de modo a verificar as proporções mais adequadas para a separação dos grupos químicos das amostras. Além da solução reveladora de vanilina sulfúrica, a visualização dos resultados obtidos também foi efetuada por meio de luz ultravioleta (254 nm) e por meio da solução de Dragendorff, sendo esta última específica para a identificação de alcaloides nas amostras.

3.4.2.8.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises dos perfis químicos das frações bioativas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo 1200 (Agilent Technologies), equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de ultravioleta G1314B. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados por meio do *software* EZCrom Ellite. Nas análises, adotaram-se as seguintes condições de injeção:

Concentração das amostras: [] = 100 ug/mL

Volume de injeção: $V_{inj} = 20\mu\text{L}$

Coluna Cromatográfica: Eclipse XDB-C18 (150 x 4,60) x 5 μm

Condições cromatográficas: isocrático 10% de MeOH por 5 min, 10-50% em 15 min. 50-95% em 10 min., isocrático 95% por 10 min.

Vazão: 0,8 mL/min

Detector: $\lambda = 254\text{ nm}$

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

As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H foram realizadas no aparelho BRUKER DRX 400 (9,4 Tesla), sendo utilizados os solventes deuterados CDCl_3 e DMSO.

3.4.2.9 Análises dos dados

As estimativas das concentrações letais, doses letais e tempos letais foram realizadas por meio de análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando o programa Poloplus 1.0 (LeORA SOFTWARE, 2003).

Para os demais bioensaios, primeiramente, realizou-se um pré-ajuste do modelo normal aos dados e verificou-se a normalidade de resíduos com o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), bem como a homogeneidade de variâncias com o teste de Bartlett (BARTLETT, 1937). Quando os dados não apresentaram normalidade e/ou homocedasticidade, buscou-se uma transformação pelo método da potência máxima de Box-Cox (BOX; COX, 1964).

Nos casos em que a transformação dos dados não satisfizesse às condições para a análise de variância, prosseguiu-se ao ajuste de um modelo linear generalizado (GLM) pertencente à família exponencial de distribuições (NELDER; WEDDERBUM, 1962). Para a comparação do efeito residual dos extratos (item 3.4.2.5), utilizou-se análise de regressão linear.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS versão 9.1 (SAS Institute, Cary, NC).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do rendimento de extração

Houve variação do rendimento de extração quando comparadas as diferentes espécies, estruturas vegetais e solventes orgânicos empregados (Tabela 3), sendo que os maiores rendimentos foram obtidos a partir das sementes de *Annona montana* (24,65%) e de *Annona mucosa* (9,84%), empregando, em ambos os casos, o hexano como solvente orgânico. Na comparação entre as três estruturas estudadas, somando-se as quantidades obtidas com os três solventes, o maior rendimento de extração ocorreu com as sementes, seguindo-se as folhas e depois os ramos que propiciaram o menor rendimento.

De um modo geral, maiores rendimentos foram obtidos com solventes mais apolares (hexano e diclorometano) a partir das sementes das duas anonas estudadas por meio da técnica de extração empregada. Para as demais estruturas vegetais (ramos e folhas), obtiveram-se maiores rendimentos com o emprego do solvente de maior polaridade (etanol), exceto para folhas de *A. montana* e de *Casearia sylvestris*, que não apresentaram a mesma tendência observada para as demais estruturas e/ou espécies, possivelmente devido a maiores proporções de óleo essencial e de compostos de baixa polaridade nas folhas de ambas as espécies (LEBOEUF et al., 1980; SILVA et al., 2004), fato ratificado pela consistência do extrato obtido.

O rendimento de extração, no entanto, é reflexo direto do método e das condições de extração (GNOATTO et al., 2007; BRANCO et al., 2010), das características fenológicas das espécies e de suas variações fisiológicas sazonais no acúmulo e síntese de compostos orgânicos (BORELLA et al., 2006; STEFANELLO et al., 2010), das peculiaridades do ambiente de cultivo das espécies (FIGUEIREDO et al., 2008) e da variação genética intraespecífica (LEATEMIA; ISMAN, 2004a). Dessa forma, o rendimento de extração configura-se em uma variável de difícil comparação entre os diferentes estudos disponíveis na literatura.

A concentração relativa das possíveis substâncias bioativas nos respectivos extratos brutos é outro aspecto que deve ser considerado, o que pode não condizer com os maiores rendimentos obtidos, considerando os objetivos elencados para este

tipo de estudo. Assim, tal variável deve ser analisada conjuntamente com as doses necessárias para produzir os efeitos bioativos que justificam o emprego dos referidos compostos no manejo integrado do inseto-praga alvo do estudo.

Tabela 2 - Rendimentos de extratos orgânicos obtidos pelo processo de maceração em solventes, na proporção de 1:5 (p/v), das diferentes estruturas e/ou espécies vegetais utilizadas no estudo com *Sitophilus zeamais*

Espécie	Estrutura	Material vegetal (g)	Solvente	Rendimento ¹	
				(g)	(%)
<i>Annona montana</i>	Sementes	166	Hexano	40,92	24,65
			Diclorometano	9,39	5,65
			Etanol	4,10	2,47
	Folhas	261	Hexano	8,59	3,29
			Diclorometano	12,59	4,82
			Etanol	7,28	2,79
	Ramos	173	Hexano	1,28	0,74
			Diclorometano	1,70	0,98
			Etanol	2,08	1,20
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	88	Hexano	8,66	9,84
			Diclorometano	4,58	5,20
			Etanol	1,72	1,95
	Folhas	128	Hexano	4,48	3,50
			Diclorometano	4,38	3,42
			Etanol	6,86	5,36
	Ramos	102	Hexano	1,54	1,51
			Diclorometano	1,20	1,17
			Etanol	1,61	1,58
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	194	Hexano	2,48	1,28
			Diclorometano	3,08	1,59
			Etanol	5,91	3,05
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	389	Hexano	11,98	3,08
			Diclorometano	6,28	1,61
			Etanol	12,77	3,28
	Ramos	389	Hexano	3,35	0,86
			Diclorometano	1,70	0,44
			Etanol	8,15	2,09

¹ Obtido a partir da quantidade (g) do material vegetal especificado após trituração em moinho de facas.

O alto rendimento de extratos em hexano obtido nesse estudo, a partir das sementes das anonas avaliadas, é decorrente do alto teor de óleo nessa estrutura vegetal, o qual é majoritariamente extraído pelos solventes mais apolares, no sistema de extração empregado. Estudos recentes relatam que espécies do gênero *Annona*

acumulam significativas quantidades de óleo nas sementes, as quais vêm sendo pesquisadas para utilização na produção de bioenergia e de óleos alimentícios (AGOSTINI; CECCHI; BARRERA-ARELLANO, 1995; AMADOR et al., 2007; BRANCO et al., 2010).

Diante do exposto, Branco et al. (2010) verificaram que o rendimento em extrato lipídico das sementes de *Annona cherimola* é variável de acordo com a temperatura de extração, sendo de 25,1% em condições ambientais e por meio do emprego do solvente hexano. Por sua vez, sementes de *Annona coriaceae* contêm 45% de óleo (em base seca), sendo este dotado de características físico-químicas potenciais para a produção de óleos alimentícios finos (AGOSTINI; CECCHI; BARRERA-ARELLANO, 1995), necessitando, no entanto, do emprego de refino para a eliminação de alcaloides tóxicos. Dessa forma, caso sejam constatados compostos bioativos nas sementes das anonas estudadas, a possibilidade de utilização das frações oleosas dos extratos brutos para a produção de bioenergia ou óleos alimentícios pode melhorar a economicidade ou mesmo viabilizar o processo de extração. Entretanto, posteriores estudos serão necessários para melhor elucidação dessa hipótese.

4.2 Perfil cromatográfico dos extratos obtidos (CCD)

O sistema de eluente composto por hexano:acetona (3:2, v/v), aliado à solução reveladora de vanilina sulfúrica, proporcionou uma boa avaliação cromatográfica dos extratos, com manchas diferenciadas e distribuídas por toda a placa, em diferentes fatores de retenção (R_fs) (Figura 7), possibilitando, dessa forma, obter um perfil *fingerprint* de cada extrato orgânico bruto. No entanto, verificou-se uma melhor separação nos extratos obtidos por meio de solventes mais apolares (hexano e diclorometano), uma vez que para os extratos em etanol verificou-se uma concentração de compostos no ponto inicial de arraste da placa cromatográfica, o que implicaria na necessidade do emprego de uma solução de eluente de maior polaridade. No entanto, como tal técnica foi empregada apenas para realização de uma análise preliminar das diferenças qualitativas entre os diferentes extratos e da qualidade da separação proporcionada pelos solventes e pela técnica de extração empregada, optou-se pela

utilização do mesmo sistema de eluente para facilitar a comparação dos diferentes perfis.

A análise dos perfis cromatográficos obtidos por CCD (Figura 7) mostrou a presença de extratos com grande variação na sua composição química, fato evidenciado pelos fatores de retenção (Rfs) e coloração. Contudo, também podem se observar similaridades no perfil químico de extratos obtidos com diferentes solventes a partir da mesma estrutura e espécie vegetal, como, por exemplo, os perfis H1 e D1 dos extratos de ramos de *Aristolochia* cf. *paulistana*, obtidos com hexano e diclorometano, respectivamente. Apesar de os dois solventes possuírem polaridades diferentes, o solvente em hexano pode ter extraído compostos medianamente polares (afins com o diclorometano) devido a forças de atração intermolecular de alguns compostos apolares com compostos de polaridade intermediária, similarmente ao relatado por Llanos; Arango e Giraldo (2008). Cabe salientar, no entanto, que mesmo dentro de um mesmo grupo químico poderão ser constatadas substâncias com diferentes bioatividades sobre *Sitophilus zeamais*.

Os perfis cromatográficos dos extratos de sementes de *A. montana* (perfil H4) e de *A. mucosa* (perfil H7), ambos obtidos com o solvente hexano, mostraram semelhanças em comparação aos grupos químicos, o que é bastante plausível por tratar-se de extratos do mesmo gênero botânico e da mesma estrutura da planta, podendo, até mesmo, alguns dos grupos químicos observados constituir-se em marcadores quimiotaxonômicos. Dessa forma, Vilegas et al. (1991) constataram que diterpenos são substâncias comuns às espécies de *Xylopi*a (Annonaceae), os quais constituem-se em importantes marcadores quimiotaxonômicos de espécies pertencentes a esse gênero.

Observou-se, ainda, que, com exceção do extrato de *A. cf. paulistana*, os extratos de ramos das demais espécies (perfis 3, 6 e 9) apresentam uma pequena quantidade de manchas nas cromatoplas (componentes químicos), principalmente nos extratos em hexano e diclorometano, o que pode ser reflexo do processo de extração, ou mesmo da predominância de constituintes mais polares, majoritariamente retidos no extrato em etanol e de difícil análise por CCD, ou mesmo de uma pouca quantidade de classes químicas presentes nessa estrutura.

De um modo geral, a CCD mostra-se um método rápido e econômico para realização de uma análise preliminar das características qualitativas de extratos orgânicos, permitindo a comparação do perfil químico de cada extrato e sua correlação com os resultados dos ensaios biológicos, subsidiando sua discussão.

Figura 7 - Perfil cromatográfico dos extratos brutos estudados, obtidos por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como eluente uma solução de hexano:acetona (3:2, v/v) e revelados por meio de uma solução de vanilina sulfúrica. Solvente empregado: H: hexano; D: diclorometano; E: etanol. Espécie e estrutura vegetal empregada: 1: *Aristolochia* cf. *paulistana*; 2: *Annona montana* (folhas); 3: *A. montana* (ramos); 4: *A. montana* (sementes); 5: *A. mucosa* (folhas); 6: *A. mucosa* (ramos); 7: *A. mucosa* (sementes); 8: *Casearia sylvestris* (folhas); 9: *C. sylvestris* (ramos)

4.3 Bioensaios

4.3.1 Testes preliminares

4.3.1.1 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre *S. zeamais*

De acordo com Castillo-Sánchez; Jimenez-Osornio e Delgado-Herrera (2010), extratos vegetais têm sido ressuspensos em diversos solventes, tais como acetona, água destilada, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e Tween 20[®]. No entanto, o critério de escolha dos solventes a serem utilizados na ressuspensão de extratos de plantas e metabólitos secundários está focado no menor efeito negativo sobre o organismo alvo (CARVALHO, 2008).

Com base nos dados obtidos (Tabela 3), verificou-se que os solventes orgânicos avaliados não ocasionaram mortalidade significativa e nem reduziram o tamanho da progênie F1 de *S. zeamais*, podendo, dessa forma, ser empregados como solubilizantes de extratos vegetais, desde que respeitadas as demais condições empregadas.

Tabela 3 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10^o dia, e número de insetos emergidos (progênie F1), após 60 dias da infestação de *Sitophilus zeamais*, em amostras de milho (10 g) tratadas com diferentes solventes orgânicos puros*. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Solvente	Mortalidade (%) ¹	Nº de insetos emergidos ²
Acetona	1,0 $\pm$ 0,66	14,60 $\pm$ 1,33
Metanol	1,5 $\pm$ 0,76	11,10 $\pm$ 1,91
Etanol	1,0 $\pm$ 0,66	10,70 $\pm$ 0,88
Água deionizada	2,0 $\pm$ 1,11	11,50 $\pm$ 2,02

¹ Diferença não significativa por meio da comparação dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

² Diferença não significativa por meio da comparação dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial negativo ($p \leq 0,05$).

* Aplicados com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Estudo de Oliveira et al. (2010) corroboram, em parte, os resultados obtidos neste trabalho. Assim, os autores, avaliando o efeito agudo de solventes orgânicos sobre adultos de *S. zeamais*, constataram que os solventes diclorometano e metanol

(puros) não afetaram os insetos, quando estes foram expostos por via de contato e ingestão. No entanto, verificaram que DMSO e Tween 20[®] (puros) causam efeito agudo nos adultos, mas não ocasionam qualquer efeito quando diluídos a 1% ou 5% (v/v), ressaltando-se, dessa forma, a importância da realização de bioensaios preliminares para avaliação de possíveis efeitos negativos de diferentes concentrações de solubilizantes de extratos sobre o inseto alvo.

No presente estudo, levando-se em consideração os resultados obtidos neste bioensaio e com base em testes preliminares de solubilidade dos extratos vegetais a serem avaliados, optou-se pelo emprego de acetona pura para ressuspensão dos extratos em hexano e em diclorometano e de acetona:água deionizada (1:1, v/v) para ressuspensão dos extratos mais polares (em etanol).

4.3.2 Bioensaios definitivos

4.3.2.1 *Screening* para identificação dos extratos vegetais mais promissores

4.3.2.1.1 Efeito de extratos vegetais na sobrevivência de adultos, progênie F1 e danos de *S. zeamais*

Os extratos mais promissores foram obtidos de sementes de *A. mucosa* e de *A. montana*, seguido pelos extratos de folhas das mesmas espécies (Tabelas 4, 5 e 6). Os efeitos bioativos desses extratos foram observados em todas as variáveis estudadas e o nível de resposta obtido foi dependente da concentração utilizada e do solvente orgânico empregado na produção destes.

Os extratos de sementes de *A. mucosa*, tanto em solvente hexano como em diclorometano, foram os tratamentos que propiciaram os efeitos bioativos mais pronunciados sobre as variáveis estudadas, levando-se em consideração a menor concentração testada (300 ppm) (Tabelas 4 e 5). A 300 ppm, tais extratos ocasionaram, respectivamente, mortalidades de 98,00 e 85,50% dos gorgulhos, e inibiram quase que totalmente a progênie F1, o que reduziu drasticamente os danos às amostras de milho. Na maior concentração estudada (1.500 ppm), houve mortalidade total dos gorgulhos expostos a grãos tratados com ambos os extratos e completa inibição da progênie F1

com o emprego do extrato obtido das sementes de *A. mucosa*, por meio do solvente hexano. Para o extrato em etanol das sementes dessa espécie, observaram-se efeitos bioativos significativos, porém em níveis menos acentuados que para os extratos mais apolares (hexano e diclorometano) (Tabela 6). Para as demais estruturas de *A. mucosa*, observaram-se efeitos significativos sobre as variáveis estudadas apenas com o extrato obtidos de folhas, por meio do solvente hexano e na maior concentração testada (1.500 ppm), o qual ocasionou 61,50% de mortalidade dos gorgulhos e reduziu significativamente a progênie F1 e os danos, porém, em níveis menos acentuados que os extratos obtidos a partir das sementes dessa espécie.

De modo semelhante, extratos obtidos de sementes de *A. montana* também propiciaram resultados expressivos, com destaque para os extratos em hexano e em diclorometano das sementes (Tabelas 4 e 5) que, na concentração de 1.500 ppm, ocasionaram o controle total dos gorgulhos e inibiram quase que totalmente a progênie F1 e os danos às amostras de milho. Na menor concentração testada (300 ppm), embora não tenha ocorrido mortalidade significativa, observou-se redução da progênie F1 e dos danos, o que pode ser reflexo, em hipótese, de possíveis efeitos deterrentes de alimentação e/ou oviposição, ou mesmo sua ação sobre o desenvolvimento pré e/ou pós-embrionário de *S. zeamais*, necessitando-se, no entanto, de estudos complementares para melhor elucidação desses aspectos. Para as demais estruturas dessa espécie, apenas o extrato de folhas em hexano (1.500 ppm) ocasionou mortalidade de adultos (93,00%), sendo esta comparável à obtida com o extrato de sementes, porém com efeitos menos acentuados sobre as demais variáveis. Já os extratos em etanol das diferentes estruturas de *A. montana* não ocasionaram efeitos bioativos promissores, em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 6).

Para as demais espécies estudadas, os efeitos mais significativos foram obtidos com os extratos (a 1.500 ppm) de ramos de *C. sylvestris*, em diclorometano, e de *A. cf. paulistana*, em hexano, os quais ocasionaram mortalidades de adultos de 37,00 e 41,50%, respectivamente, e com efeitos significativos sobre as demais variáveis (Tabelas 4 e 5). Apesar de o gênero *Aristolochia* ser abundante em ácido aristolóquico, composto exclusivo desse gênero, e possuir grande diversidade de terpenos (WU et al., 2004), a bioatividade de extratos de *A. cf. paulistana* sobre *S. zeamais* mostrou-se

menos promissora que outras espécies de *Aristolochia* já estudadas visando ao controle de *S. zeamais* ou de outras espécies-praga (NASCIMENTO et al., 2003; ARANNILEWA, EKRAKENE; AKIINNEYE, 2006; JBILOU; ENNABILI; SAYAH, 2006; MESSIANO et al., 2008; VIEIRA et al., 2009; BASKAR et al., 2010), o que pode ser consequência da baixa concentração dos compostos bioativos em *A. cf. paulistana*, ou mesmo de uma alta tolerância de *S. zeamais* a tais compostos.

Tabela 4 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, nº insetos emergidos (progênie F1) e danos, após 60 dias da infestação de *Sitophilus zeamais*, em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em hexano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações*. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie	Estrutura vegetal	Mortalidade (%) ¹	Nº insetos emergidos ²	% grãos danificados ¹	Perda de peso de grãos	
					Total (%) ³	Relativa ⁴
300 ppm						
<i>Annona montana</i>	Sementes	1,00±0,66 b	26,20±3,46 b	73,84±5,66 b	9,23	83,37
	Folhas	3,00±2,16 b	31,60±1,68 ab	85,62±2,53 ab	10,70	96,65
	Ramos	0,00±0,00 b	38,30±2,28 a	91,65±1,31 a	11,46	103,52
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	98,00±1,10 a	0,80±0,32 c	3,60±1,07 c	0,45	4,06
	Folhas	0,50±0,50 b	38,60±2,70 a	90,92±1,85 a	11,35	102,52
	Ramos	1,50±0,76 b	34,70±3,25 ab	81,01±6,71 b	10,10	91,23
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	0,00±0,00 b	39,80±1,76 a	91,75±1,68 a	11,47	103,61
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,00±0,00 b	39,10±2,14 a	89,33±2,88 a	11,17	100,90
	Ramos	1,50±0,76 b	38,10±2,93 a	88,66±2,38 a	11,07	100,00
Testemunha (acetona)	--	0,00±0,00 b	36,90±2,66 a	88,61±1,68 a	11,07	100,00
1.500 ppm						
<i>Annona montana</i>	Sementes	100,00±0,00 a	0,40±0,22 e	1,89±0,81 f	0,23	2,17
	Folhas	93,00±2,00 ab	2,60±0,40 d	9,19±1,29 e	1,14	10,78
	Ramos	2,0±0,81 d	28,70±2,68 ab	75,91±5,66 b	9,50	89,87
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	100,00±0,00 a	0,00±0,00 f	0,00±0,00 f	0,00	0,00
	Folhas	61,50±6,50 b	5,60±1,83 c	22,39±4,92 d	2,80	26,49
	Ramos	0,00±0,00 d	39,10±2,52 a	91,75±2,00 a	11,47	108,51
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	41,50±5,87 c	19,30±2,83 b	58,58±6,28 c	7,33	69,34
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,50±0,50 d	38,00±1,81 a	90,71±2,12 ab	11,35	107,37
	Ramos	0,50±0,50 d	38,30±3,66 a	91,88±3,19 a	11,47	108,51
Testemunha (acetona)	--	0,00±0,00 d	37,00±4,74 a	84,76±4,97 b	10,57	100,00

¹ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (separadamente por concentração), não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (separadamente por concentração), não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial negativo ($p \leq 0,05$).

³ Calculada por meio da fórmula de Adams; Schulten (1976). ⁴ Calculada com base na comparação relativa do tratamento (extrato) com seu respectivo controle (testemunha). * Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Tabela 5 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, nº insetos emergidos (progênie F1) e danos, após 60 dias da infestação de *Sitophilus zeamais*, em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em diclorometano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações*. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie	Estrutura vegetal	Mortalidade (%) ¹	Nº insetos emergidos ²	% grãos danificados ¹	Perda de peso de grãos	
Total (%) ³ Relativa ⁴						
300 ppm						
<i>Annona montana</i>	Sementes	2,50±1,11 b	18,90±1,81 c	65,13±5,60 b	8,13	79,31
	Folhas	1,00±0,66 b	20,90±3,02 bc	63,86±5,71 b	7,99	77,95
	Ramos	1,00±0,66 b	21,60±1,41 bc	64,79±3,48 b	8,10	79,02
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	85,50±2,92 a	1,10±0,40 d	7,84±1,02 c	0,97	9,46
	Folhas	1,00±0,66 b	31,30±3,06 ab	81,97±5,95 a	10,21	99,60
	Ramos	0,00±0,00 b	29,90±2,97 ab	83,71±3,81 a	10,44	101,85
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	0,00±0,00 b	35,50±2,84 a	86,55±2,85 a	10,83	105,65
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,50±0,50 b	35,50±2,96 a	86,96±5,08 a	10,89	106,24
	Ramos	1,50±0,76 b	35,10±2,84 a	87,24±4,47 a	10,93	106,63
Testemunha (acetona)	--	0,00±0,00 b	31,50±2,50 a	81,94±3,26 a	10,25	100,00
1.500 ppm						
<i>Annona montana</i>	Sementes	100,00±,00 a	0,00±0,00 e	0,27±0,27 e	0,03	0,29
	Folhas	2,00±1,52 bc	20,10±2,13 cd	60,00±4,14 c	7,50	73,67
	Ramos	1,00±0,66 bc	31,60±3,11 ab	81,70±4,51 b	10,19	100,09
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	100,00±0,00 a	0,10±0,10 e	1,12±0,61 e	0,14	1,37
	Folhas	4,00±2,56 bc	19,60±2,70 cd	57,90±6,42 c	7,24	71,11
	Ramos	0,00±0,00 c	22,50±2,51 bc	64,97±5,64 c	8,09	79,46
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	1,00±0,66 bc	38,60±1,73 a	90,44±1,31 a	11,30	111,00
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	1,00±1,0 bc	27,90±1,94 abc	79,52±3,91 b	9,94	97,64
	Ramos	37,00±4,48 b	12,10±2,58 d	44,29±5,72 d	5,53	54,32
Testemunha (acetona)	--	0,00±0,00 c	30,20±3,74 abc	81,74±4,63 b	10,18	100,00

¹ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (separadamente por concentração), não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (separadamente por concentração), não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial negativo ($p \leq 0,05$).

³ Calculada por meio da fórmula de Adams; Schulten (1976). ⁴ Calculada com base na comparação relativa do tratamento (extrato) com seu respectivo controle (testemunha). * Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Tabela 6 - Médias ($\pm$ erro padrão) de mortalidade, ao 10º dia, nº insetos emergidos (progênie F1) e danos, após 60 dias da infestação de *Sitophilus zeamais*, em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em etanol de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações*. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase: 14 h; luminosidade: 172 lux

Espécie	Estrutura Vegetal	Mortalidade (%) ¹	Nº insetos emergidos ²	% grãos danificados ²	Perda de peso de grãos	
					Total (%) ³	Relativa ⁴
300 ppm						
<i>Annona montana</i>	Sementes	3,50±2,58 b	20,30±2,78 a	62,32±6,62 b	7,81	90,39
	Folhas	1,00±0,66 b	24,80±2,64 a	72,31±5,76 ab	9,08	105,09
	Ramos	0,50±0,50 b	28,80±3,44 a	75,03±4,44 ab	9,39	108,68
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	16,50±3,57 a	7,60±2,21 b	31,32±5,96 c	3,92	45,37
	Folhas	0,50±0,50 b	24,40±2,70 a	69,33±4,41 ab	8,70	100,69
	Ramos	0,50±0,50 b	28,00±1,98 a	79,13±3,24 a	9,89	114,46
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	0,50±0,50 b	25,30±3,29 a	74,96±5,99 ab	9,36	108,33
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,00±0,00 b	23,70±3,18 a	71,75±5,43 ab	9,01	104,28
	Ramos	0,00±0,00 b	18,20±2,16 a	61,72±4,81 b	7,69	89,00
Testemunha (acetona:água, 1:1)	--	0,00±0,00 b	21,00±2,57 a	69,16±5,81 ab	8,64	100,00
1.500 ppm						
<i>Annona montana</i>	Sementes	17,5±4,54 ab	20,0±2,80 b	65,51±7,21 c	8,15	68,89
	Folhas	0,0±0,00 b	48,2±4,06 a	91,12±5,26 b	11,38	96,19
	Ramos	0,5±0,0 ab	43,1±4,48 a	88,17±5,66 b	11,01	93,06
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	33,0±7,15 a	6,6±1,15 c	38,60±7,04 d	4,82	40,74
	Folhas	0,0±0,00 b	35,7±2,99 a	87,16±2,51 b	10,90	92,13
	Ramos	0,0±0,00 b	42,4±2,68 a	92,24±1,71 ab	11,54	97,54
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	0,0±0,00 b	41,7±1,93 a	92,77±1,50 ab	11,60	98,05
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,0±0,00 b	40,4±2,29 a	92,67±1,74 ab	11,59	97,97
	Ramos	0,0±0,00 b	41,8±1,81 a	96,75±1,68 a	12,09	102,19
Testemunha (acetona:água, 1:1)	--	0,5±0,50 ab	37,2±2,19 a	94,61±1,60 ab	11,83	100,00

¹ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (separadamente por concentração), não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

² Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (separadamente por concentração), não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial negativo ($p \leq 0,05$).

³ Calculada por meio da fórmula de Adams; Schulten (1976). ⁴ Calculada com base na comparação relativa do tratamento (extrato) com seu respectivo controle (testemunha). * Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Os resultados obtidos por meio da análise das variáveis mostram que extratos orgânicos brutos de sementes e de folhas das duas espécies de *Annona* estudadas, dependendo do solvente orgânico utilizado e da concentração aplicada, ocasionam expressiva bioatividade sobre *S. zeamais* e, conseqüentemente, mostram-se promissores para o desenvolvimento de novos inseticidas para uso no manejo preventivo desse coleóptero-praga. Ressalta-se que o presente estudo relata pela primeira vez a atividade biológica de extratos de *A. mucosa* sobre insetos-praga de importância agrícola e realiza a primeira descrição da bioatividade de extratos de *A. montana* para pragas de grãos armazenados.

Tradicionalmente, estruturas vegetais de algumas espécies de Annonaceae têm sido utilizadas como inseticida botânico por meio de preparações caseiras (SECOY; SMITH, 1983). No entanto, essa família botânica despertou maior atenção a partir da década de 1980, com a descoberta das acetogeninas anonáceas, as quais apresentam uma série de atividades biológicas, incluindo atividades anti-helmíntica, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária e pesticida, além de ser tóxica para células tumorais (CORREA; BERNAL, 1989, ALALI; XIAO-XI; MCLAUGHLIN, 1999; OCAMPO; OCAMPO, 2006). As acetogeninas compreendem uma série de produtos naturais (C-35/C-37) derivados de ácidos graxos de cadeia longa (C-32/C-34) combinados com uma unidade de 2-propanol (ALALI; XIAO-XI; MCLAUGHLIN, 1999), sendo estas encontradas unicamente em estruturas vegetais da família Annonaceae (JOHNSON et al., 2000).

Diante do exposto, as acetogeninas *annonacin*, *annonacin-A* e *cis-annonacin-10-one* isoladas de folhas de *A. montana*, aplicadas topicamente ($10 \mu\text{g inseto}^{-1}$) sobre *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Hemiptera: Lygaeidae), ocasionaram mortalidades de adultos de 72,8; 56,7 e 51,5%, respectivamente, porém, foram menos eficientes no controle de larvas de quinto ínstar (CÓLOM et al., 2008). Recentemente, Blessing et al. (2010) verificaram que a aplicação (separadamente por composto) de $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de dieta das acetogeninas *annonacin*, *cis-annonacin-10-one*, *densicomacin-1*, *gigantetronenin*, *murihexocin-B* e *tucupentol*, isoladas de folhas de *A. montana* ocasionam 100% de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), durante a fase imatura.

Visando ao controle de insetos-praga de grãos armazenados, algumas referências disponíveis na literatura sobre a utilização de extratos ou compostos isolados de outras espécies do gênero *Annona* corroboram os promissores resultados obtidos neste estudo. Assim, Ohsawa et al. (1990) obtiveram bons resultados com o emprego de extratos de sementes de *Annona squamosa*, em éter de petróleo, no controle de *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). Posteriormente, Kotkar et al. (2001) verificaram que flavonoides isolados do extrato aquoso de *A. squamosa*, na concentração de $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$, controlam 80% da população do bruquídeo *C. chinensis*. Rao; Sharma e Sharma (2005) constataram que extratos em hexano e em acetato de etila de sementes de *A. squamosa* são tóxicos para larvas de terceiro instar de *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae), além de provocarem alterações no crescimento e desenvolvimento e ocasionarem efeito fagodeterrente. Para *S. zeamais*, Llanos; Arango e Giraldo (2008) obtiveram controle eficiente dos gorgulhos expostos e constataram inibição total da progênie F1 por meio do emprego de extratos de sementes de *A. muricata*, obtidos com o uso de hexano e de acetato de etila, em concentrações superiores a 2.500 ppm.

Vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas estruturas de plantas da família Annonaceae, sendo os alcaloides, as acetogeninas, os diterpenos e os flavonoides os principais grupos químicos presentes em extratos de cascas, ramos, folhas, frutos e sementes de espécies dessa família botânica (LEBOEUF et al., 1980; CHANG et al., 1998; KOTKAR et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002). No presente estudo, verificaram-se diferenças químicas qualitativas entre as estruturas vegetais das anonas estudadas, sendo estas confirmadas pela análise dos perfis cromatográficos obtidos por CCD (item 4.2), o que pode ter influenciado na expressão diferenciada da atividade biológica para *S. zeamais* dos extratos das diferentes estruturas. No entanto, outras hipóteses podem ser levantadas, como a variação quantitativa dos compostos ativos nas partes vegetais e possíveis interações químicas de compostos orgânicos. Assim, como extratos vegetais brutos contêm muitos compostos ativos, alguns destes podem ter atuado sinergicamente para promover uma bioatividade específica, enquanto que outros

podem ter atuado de forma antagônica para mascarar as atividades biológicas (LEATEMIA; ISMAN, 2004b).

De um modo geral, os efeitos bioativos mais pronunciados sobre *S. zeamais* foram observados por meio da aplicação de extratos obtidos a partir dos solventes mais apolares (hexano e diclorometano), o que dá indícios preliminares da natureza química das substâncias responsáveis por tal bioatividade. Resultados similares foram obtidos por Llanos; Arango e Giraldo (2008), que observaram que os extratos em hexano e em acetato de etila, a partir das sementes de *A. muricata*, são as frações mais bioativas para *S. zeamais*. Nessa mesma linha, Salamanca et al. (2001) observaram que os extratos em acetato de etila de sementes de *A. muricata* são mais efetivos no controle de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabeidae), quando comparados com os extratos obtidos com solventes de outras polaridades.

Dessa forma, os resultados deste *screening* sugerem que os extratos de sementes, em hexano e em diclorometano, e de folhas, em hexano, das duas espécies de *Annona* estudadas, poderão ser investigados quimicamente e monitorados por meio de bioensaios com vistas a detectar os compostos responsáveis por tal bioatividade, podendo, assim, ser usados como moléculas-modelo ou como compostos biorracionais em programas de controle de *S. zeamais*.

4.3.2.1.2 Efeito de extratos vegetais no comportamento de adultos de *S. zeamais*

Em virtude do tempo de avaliação adotado, não foi possível a distinção entre os possíveis efeitos dos extratos testados nas diferentes fases do processo de seleção hospedeira de *S. zeamais*. Como tal etapa é uma triagem inicial de uma grande quantidade de extratos, o objetivo foi apenas detectar possíveis efeitos bioativos, porém sem a intenção de caracterizá-los neste primeiro momento. A caracterização dos possíveis efeitos dos extratos vegetais na seleção hospedeira de *S. zeamais* deverá ser alvo de investigações futuras.

Nos recipientes onde foram adicionados grãos de milho tratados com extratos (a 300 ppm) de ramos de *A. montana* e de *A. mucosa*, ambos em hexano, e de sementes de *A. mucosa*, em hexano e em diclorometano, observou-se um menor número de insetos atraídos em comparação às caixas contendo somente milho (controle) (Tabelas

7 e 8), diferindo significativamente de acordo com o índice adotado (I.R./I.D.), demonstrando a existência de efeito repelente e/ou deterrente de alimentação e/ou oviposição desses extratos para adultos de *S. zeamais*. No entanto, nessa mesma concentração, os extratos em etanol de folhas de *A. montana* e, separadamente, de folhas e de sementes de *A. mucosa* classificaram-se como atraentes e/ou estimulantes de alimentação e/ou oviposição (Tabela 9). Assim, tal constatação revela a diversidade de substâncias nos extratos da mesma estrutura e espécie vegetal, os quais são passíveis de desencadear efeitos comportamentais distintos em *S. zeamais*, dependendo do solvente empregado na extração dos compostos. Da mesma forma, tais resultados evidenciam a separação química proporcionada pelos solventes orgânicos por meio do método de extração, fato já constatado nos perfis cromatográficos obtidos por CCD (item 4.2).

Na concentração de 1.500 ppm, os extratos em hexano das diferentes estruturas de *A. montana*, *A. mucosa* e *C. sylvestris* classificaram-se como repelentes e/ou deterrentes de alimentação e/ou oviposição para adultos de *S. zeamais* (Tabela 7), sendo que o extrato de ramos de *C. sylvestris* foi o tratamento que ocasionou a maior repelência e/ou deterrência. Para os extratos em diclorometano (1.500 ppm), os oriundos de ramos e de sementes de *A. montana*, de sementes de *A. mucosa* e de folhas e de ramos de *C. sylvestris* classificaram-se como repelentes e/ou deterrentes de alimentação e/ou oviposição para adultos de *S. zeamais* (Tabela 8). Com o uso do etanol, no entanto, e na maior concentração (1.500 ppm), apenas o extrato de sementes de *A. mucosa* foi repelente e/ou deterrente para o gorgulho em estudo, enquanto o extrato de ramos de *C. sylvestris* ocasionou efeito atraente e/ou estimulante de alimentação e/ou oviposição (Tabela 9). Possivelmente, com a utilização de concentrações mais elevadas de extratos em etanol, com constituição de compostos com diferentes características físico-químicas dos demais extratos, ocorreu a saturação do ar dentro da arena utilizada, fato ratificado pela maior variação dos dados (maior desvio padrão), o que pode ter influenciado na escolha dos adultos de *S. zeamais*. A utilização de técnicas olfatométricas, entretanto, pode contornar tal dificuldade e constituir-se em alvo de futuras investigações.

Por sua vez, extratos de caules de *A. cf. paulistana* não ocasionaram efeito no comportamento de *S. zeamais*, em nenhuma das concentrações testadas (Tabelas 7, 8 e 9). Pinto et al. (2009) verificaram que o ácido aristolóquico extraído de *A. chilensis* ocasiona efeito estimulante de alimentação, para larvas, e de oviposição, para fêmeas, de *Battus polydamas archidamas* (Boisduval) (Lepidoptera: Papilionidae), e que tal substância pode, até mesmo, atuar na determinação dos sítios de oviposição das fêmeas desse lepidóptero durante sua seleção hospedeira. Lajide; Escoubas e Mizutani (1993), por outro lado, constataram efeito fagodeterrente do extrato de raiz de *A. albida* para larvas de *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae), sendo que tal atividade foi atribuída a um grupo carboxílico livre situado na proximidade de um grupo nitro da estrutura do ácido aristolóquico. Assim, verifica-se que os compostos presentes em *Aristolochia* podem apresentar efeitos diferenciados em função da espécie de inseto-alvo.

Tabela 7 - Atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais* por amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em hexano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie	Estrutura vegetal	I.R./I.D. ¹ (Média±DP)	I.Class. ²	Classificação
300 ppm				
<i>Annona montana</i>	Sementes	0,88±0,33	1±0,24	Neutro
	Folhas	0,97±0,18	1±0,13	Neutro
	Ramos	0,88±0,12	1±0,09	Repelente e/ou Deterrente
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	0,63±0,28	1±0,20	Repelente e/ou Deterrente
	Folhas	0,89±0,24	1±0,17	Neutro
	Ramos	0,74±0,26	1±0,19	Repelente e/ou Deterrente
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	1,01±0,49	1±0,35	Neutro
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,88±0,51	1±0,36	Neutro
	Ramos	0,99±0,42	1±0,30	Neutro
1.500 ppm				
<i>Annona montana</i>	Sementes	0,39±0,38	1±0,27	Repelente e/ou Deterrente
	Folhas	0,47±0,42	1±0,30	Repelente e/ou Deterrente
	Ramos	0,68±0,48	1±0,34	Repelente e/ou Deterrente
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	0,21±0,19	1±0,13	Repelente e/ou Deterrente
	Folhas	0,53±0,50	1±0,36	Repelente e/ou Deterrente
	Ramos	0,44±0,35	1±0,25	Repelente e/ou Deterrente
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	1,09±0,35	1±0,25	Neutro
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,48±0,30	1±0,21	Repelente e/ou Deterrente
	Ramos	0,12±0,16	1±0,11	Repelente e/ou Deterrente

¹ I.R./I.D.: índice de repelência e/ou deterrência.

² I.Class.: Intervalo de classificação.

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Tabela 8 - Atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais* por amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em diclorometano de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie	Estrutura vegetal	I.R./I.D. ¹ (Média±DP)	I.Class. ²	Classificação
300 ppm				
<i>Annona Montana</i>	Sementes	0,82±0,48	1±0,34	Neutro
	Folhas	1,14±0,35	1±0,25	Neutro
	Ramos	1,21±0,42	1±0,30	Neutro
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	0,65±0,32	1±0,23	Repelente e/ou Deterrente
	Folhas	1,09±0,27	1±0,19	Neutro
	Ramos	0,84±0,46	1±0,33	Neutro
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	1,24±0,52	1±0,37	Neutro
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	1,09±0,58	1±0,41	Neutro
	Ramos	0,85±0,72	1±0,51	Neutro
1.500 ppm				
<i>Annona Montana</i>	Sementes	0,35±0,33	1±0,23	Repelente e/ou Deterrente
	Folhas	0,89±0,45	1±0,32	Neutro
	Ramos	0,31±0,30	1±0,21	Repelente e/ou Deterrente
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	0,29±0,37	1±0,26	Repelente e/ou Deterrente
	Folhas	0,73±0,38	1±0,28	Neutro
	Ramos	0,71±0,44	1±0,32	Neutro
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	0,93±0,39	1±0,28	Neutro
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	0,40±0,36	1±0,26	Repelente e/ou Deterrente
	Ramos	0,18±0,20	1±0,14	Repelente e/ou Deterrente

¹ I.R./I.D.: índice de repelência e/ou deterrência.

² I.Class.: Intervalo de classificação.

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Tabela 9 - Atratividade de adultos de *Sitophilus zeamais* por amostras de milho (10 g) tratadas com extratos em etanol de diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, em duas concentrações*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie	Estrutura vegetal	I.R./I.D. ¹ (Média±DP)	I.Class. ²	Classificação
300 ppm				
<i>Annona montana</i>	Sementes	0,83±0,28	1±0,23	Neutro
	Folhas	1,37±0,31	1±0,26	Atraente
	Ramos	1,25±0,42	1±0,35	Neutro
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	1,33±0,26	1±0,21	Atraente
	Folhas	1,35±0,21	1±0,17	Atraente
	Ramos	1,15±0,31	1±0,26	Neutro
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	1,13±0,38	1±0,31	Neutro
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	1,14±0,44	1±0,36	Neutro
	Ramos	1,09±0,39	1±0,32	Neutro
1.500 ppm				
<i>Annona montana</i>	Sementes	0,75±0,45	1±0,37	Neutro
	Folhas	1,17±0,52	1±0,43	Neutro
	Ramos	1,17±0,54	1±0,45	Neutro
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	0,33±0,34	1±0,28	Repelente
	Folhas	1,16±0,46	1±0,38	Neutro
	Ramos	0,90±0,51	1±0,42	Neutro
<i>Aristolochia cf. paulistana</i>	Ramos	1,08±0,57	1±0,47	Neutro
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	1,28±0,41	1±0,34	Neutro
	Ramos	1,31±0,34	1±0,28	Atraente

¹ I.R./I.D.: índice de repelência e/ou deterrência.

² I.Class.: Intervalo de classificação.

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

A ação de compostos vegetais pode manifestar-se em diferentes etapas do comportamento de seleção hospedeira (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000) por meio da atuação diferencial sobre os mecanismos fisiológicos dos insetos. Assim, a atividade repelente é revelada em extratos de plantas que possuem compostos com odores desagradáveis e irritantes aos insetos (PETERSON; COATS, 2001), os quais atuam ao nível dos receptores olfativos (SUKUMAR et al., 1991). Contudo, a deterrência alimentar é um distúrbio que está associado a mecanismos sensoriais que causam redução do consumo de alimento (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). Para esses autores, o comportamento alimentar dos insetos depende da integração do sistema nervoso central com os quimiorreceptores, localizados nos tarsos, peças bucais e cavidade oral. Relatam ainda que determinadas substâncias, como a azadiractina, presente nos extratos de nim, podem atuar sobre os quimiorreceptores, estimulando as

“células deterrentes específicas” ou bloqueando os fagoestimulantes, como as “células receptoras de açúcar”, inibindo a alimentação. Não obstante, algumas substâncias podem interferir nas características do substrato, tornando-os impróprios para oviposição, ou mesmo interferir nos níveis dos estimulantes de oviposição presentes nos grãos suscetíveis (GOMEZ et al., 1983), ocasionando, dessa forma, deterrência de oviposição.

Nesse estudo, os extratos de ramos de *C. sylvestris*, em hexano e em diclorometano, foram os tratamentos em que se obteve o menor I.R./I.D. e, conseqüentemente, os efeitos mais promissores. Alguns pesquisadores têm isolado diterpenos clerodânicos com certa abundância em diferentes estruturas de *C. sylvestris* (CARVALHO; SANTOS; CAVALHEIRO, 2009; WANG et al., 2009), os quais, em hipótese, podem estar relacionados com os efeitos bioativos observados para *S. zeamais*. De acordo com Rosselli et al. (2004), diterpenos clerodânicos isolados da parte aérea de *Scutellaria sieberi* (Lamiaceae) ocasionam potente efeito antialimentar para larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae).

Estudos sobre o efeito de substâncias extraídas de anonáceas no comportamento de insetos são bastante limitados na literatura. Ukeh; Arong e Ogben (2008) verificaram que a aplicação do pó das sementes de *Monodora myristica* em grãos de milho confere significativa deterrência de oviposição para *S. zeamais* e suprime totalmente a progênie F1, em doses superiores a 5% (p/p). Resultados mais promissores foram obtidos com o óleo essencial da anonácea *Mkilua fragrans*, que ocasionou atividade repelente de *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) mais pronunciada do que o DEET (N,N-diethyl-3-toluamide), ingrediente ativo de repelentes sintéticos comerciais (ODALO et al., 2005).

Assim, com base nos resultados obtidos, levantam-se perspectivas de estudos mais detalhados visando à utilização dos respectivos compostos com efeito atrativo e/ou estimulante em iscas alimentares em armadilhas de monitoramento, possibilitando a detecção mais eficiente e precoce das infestações. Por sua vez, compostos repelentes podem ser usados para manter os insetos fora de indústrias e armazéns, e longe de produtos a serem protegidos (LAZZARI; LAZZARI, 2009).

4.3.2.2 Curvas de concentração-resposta dos extratos vegetais mais promissores

Para os extratos considerados mais promissores no *screening* descrito anteriormente, ou seja, para aqueles que ocasionaram mortalidade superior a 50% dos gorgulhos expostos, foram realizadas curvas de concentração-resposta para estimar os limiares a serem utilizados nos bioensaios subsequentes.

Entre os extratos selecionados, destacaram-se os obtidos de sementes de *A. mucosa* em hexano e em diclorometano, que, após o décimo dia de exposição, apresentaram os menores valores de concentração letal média (CL₅₀), estimadas em 110,28 e 149,79 ppm, respectivamente (Tabela 10). Esses dois extratos, aliás, não diferiram entre si para nenhuma das concentrações estimadas (CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀), com base na comparação do intervalo de confiança obtido ($p \leq 0,05$). Entretanto, o valor da inclinação da curva de concentração-mortalidade foi maior para o extrato obtido com o solvente hexano, evidenciando que adultos de *S. zeamais* respondem de forma mais homogênea ao extrato obtido por meio desse solvente. Valores altos de inclinação da curva indicam que pequenas variações na concentração do extrato promovem grandes variações na mortalidade, resultando em resposta homogênea da população (ATKINS; GERYWOOD; MACDONALD, 1973).

Para os extratos de sementes de *A. montana*, houve diferença significativa entre os extratos obtidos com os diferentes solventes (hexano e diclorometano), sendo que as menores concentrações letais média (CL₅₀) foram observadas para o extrato em diclorometano (424,67 ppm x 534,75 ppm). Os valores de inclinação da curva, no entanto, foram muito próximos, o que evidencia paralelismo entre as curvas de suscetibilidade de *S. zeamais* aos dois extratos.

Por sua vez, para os extratos de folhas de *A. mucosa* e de *A. montana*, a CL₅₀ estimada foi de 657,75 e 837,70 ppm, respectivamente, contudo sem evidenciar diferença significativa entre as duas espécies com base na comparação do intervalo de confiança estimado.

Tabela 10 - Estimativa da CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀ (em ppm*) e intervalo de confiança de extratos orgânicos para adultos de *Sitophilus zeamais*, após 10 dias de exposição em amostras de milho (10 g) tratadas com os respectivos extratos brutos. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie (estrutura vegetal)	Solvente	n ¹	Coeficiente angular (± EP)	CL ₃₀ (IC) ²	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	χ ²⁽³⁾	g.l. ⁴
<i>Annona montana</i> (folhas)	Hexano	1200	4,24±0,33	630,31 (494,70 - 733,74)	837,70 (718,05 - 995,04)	1.678,72 (1.310,94 - 2.852,04)	7,73	3
<i>Annona montana</i> (sementes)	Hexano	1200	8,24±0,54	461,91 (412,52 - 498,33)	534,75 (495,30 - 575,40)	764,83 (690,03 - 912,15)	6,63	3
<i>Annona mucosa</i> (folhas)	Hexano	1200	6,34±0,42	543,79 (466,68 - 605,49)	657,75 (588,57 - 724,98)	1.047,15 (927,63 - 1.259,46)	5,19	3
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Hexano	1200	3,45±0,28	77,72 (29,88 - 108,36)	110,28 (62,91 - 146,79)	259,31 (187,95 - 635,61)	5,42	3
<i>Annona montana</i> (sementes)	Diclorometano	1200	8,08±0,47	365,73 (346,65 - 383,67)	424,67 (405,60 - 443,91)	611,83 (580,02 - 650,85)	0,18	2
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Diclorometano	1200	2,82±0,16	97,75 (80,04 - 115,86)	149,79 (126,39 - 182,25)	425,15 (317,76 - 669,72)	5,56	3

¹n: número de insetos testados.

² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro.

⁽³⁾χ²: valor de qui-quadrado calculado.

⁴ g.l.: graus de liberdade.

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

A partir da análise das curvas de concentração-mortalidade estimadas, verificou-se que os extratos de sementes de *A. mucosa* foram entre 2,83 e 4,85 vezes mais ativos do que os extratos de sementes de *A. montana*, configurando-se, entre essas duas espécies, como a mais promissora para o desenvolvimento de bioinseticidas. Assim, para a aplicação direta do extrato em hexano de sementes de *A. mucosa* no controle preventivo de *S. zeamais*, seria necessário, levando-se em consideração o volume de calda aplicado e a CL_{90} estimada, uma dose de 259,31 g de extrato bruto por tonelada de grãos de milho, sendo esta equivalente ou mesmo inferior às doses recomendadas de muitos inseticidas sintéticos (AGROFIT, 2010). Cabe salientar, no entanto, que em virtude de o rendimento do extrato em hexano de *A. montana* ter sido 2,5 vezes maior do que o de *A. mucosa*, as perspectivas de aplicação das duas espécies vegetais podem ser consideradas semelhantes.

O negligenciamento do volume de calda da solução aplicada ou mesmo da proporção de extrato empregado por volume de grãos tratados em boa parte dos estudos disponíveis na literatura configura-se um fator limitante para a comparação dos resultados obtidos. No entanto, é possível verificar diferenças na sensibilidade entre os insetos-modelo utilizados nos bioensaios com extratos e compostos isolados de diferentes estruturas e espécies de anonáceas, já que as concentrações letais obtidas são dependentes, além da espécie alvo, do estágio de desenvolvimento do inseto e do tempo de exposição.

Avaliando a bioatividade do extrato hexânico de sementes de *A. muricata* sobre adultos de *S. zeamais*, em bioensaios de ingestão, Llanos; Arango; Giraldo (2008) estimaram valores de CL_{50} de 4.009, 3.854 e 3.760 ppm após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. Os autores constataram ainda que, para o extrato em acetato de etila da mesma espécie e estrutura, a CL_{50} foi de 3.280, 2.667 e 2.542 ppm, para os mesmos tempos de avaliação. Desconsiderando-se o tempo de avaliação, os extratos das duas anonáceas avaliadas neste estudo mostram-se mais promissores em comparação aos extratos de *A. muricata*.

Leatemia e Isman (2004a) verificaram decréscimo da sensibilidade larval de *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) a extratos etanólicos de sementes de *A. squamosa*, incorporados em dieta artificial, com o aumento da idade das lagartas. Os

autores constataram, ainda, que os dois primeiros ínstaes são igualmente sensíveis (CL₅₀ de 192 e 202 ppm, respectivamente), enquanto que o terceiro e o quarto ínstaes de *S. litura* são menos sensíveis (CL₅₀ de 533 e 705 ppm, respectivamente) que os dois primeiros. Por sua vez, para lagartas de quinto ínstar, o extrato de *A. squamosa* foi ativo apenas em concentrações mais elevadas (CL₅₀ de 1.708 ppm). Para *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), os valores de CL₅₀ de emulsões aquosas do extrato metanólico de sementes de *A. squamosa* foram variáveis entre 0,02 e 0,67% entre os diferentes ínstaes larvais desse inseto-praga (LEATEMIA; ISMAN, 2004b),

Koona e Bouda (2006) observaram que a CL₅₀ do composto 2,4,5-trimethoxystyrene, extraído de *Pachypodanthium staudtii* (Annonaceae), é de 0,07 e 0,009 e 0,042 mg kg⁻¹, após 72 horas do contato de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) e do gorgulho *S. zeamais*, respectivamente, com grãos tratados com o referido composto, o que evidencia a alta atividade biológica de compostos isolados de anonáceas.

O modo de contaminação é outra variável que influencia nas concentrações letais. Assim, Seffrin et al. (2010) verificaram que extratos metanólicos de sementes de *A. squamosa* e de *A. atemoya* são tóxicos para larvas de terceiro ínstar de *Tricloplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) via ingestão e aplicação tópica, sendo que o extrato de *A. squamosa* foi mais tóxico por meio de ingestão (CL₅₀: 167,5 ppm x 382,4 ppm), enquanto que o extrato de *A. atemoya* exerceu maior atividade via aplicação tópica (CL₅₀: 167,5 ppm x 382,4 ppm).

4.3.2.3 Tempo letal médio dos extratos mais promissores

Houve pequena variação do tempo letal médio (TL₅₀) dos extratos selecionados para adultos de *S. zeamais*, em suas respectivas CL₉₀, sendo que estes oscilaram entre 4,14 e 6,10 dias (Tabela 11). Assim, em virtude do valor observado, rejeita-se a hipótese de ação neurotóxica dos compostos ativos presentes nos respectivos extratos.

Tabela 11 - Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀), em dias, e intervalo de confiança de extratos orgânicos, em suas respectivas CL₉₀^{*}, para adultos de *Sitophilus zeamais*. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie (estrutura vegetal)	Solvente	n ¹	Coefficiente angular (± EP)	TL ₅₀ (IC) ²	χ ²⁽³⁾	g.l.
<i>Annona montana</i> (folhas)	Hexano	200	4,46±0,20	4,90 (4,66 – 5,13)	8,02	7
<i>Annona montana</i> (sementes)	Hexano	200	3,55±0,18	6,10 (5,72 - 6,55)	10,45	7
<i>Annona mucosa</i> (folhas)	Hexano	200	7,05±0,34	4,14 (4,01 – 4,27)	5,92	6
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Hexano	200	5,98±0,28	4,49 (4,34 – 4,64)	2,79	6
<i>Annona montana</i> (sementes)	Diclorometano	200	3,69±0,17	5,03 (4,70 – 5,38)	12,12	7
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Diclorometano	200	6,75±0,31	4,51 (4,29 – 4,73)	9,69	6

¹ n: número de insetos testados.

² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro.

⁽³⁾ χ²: valor de qui-quadrado calculado; ⁴ g.l.: graus de liberdade.

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Os resultados deste estudo são similares ao obtidos por Ogendo et al. (2005), que observaram que os TL₅₀ de pós vegetais de *Lantana camara* L. (Verbenaceae) e *Tephrosia vogelii* Hook (Fabaceae) para adultos de *S. zeamais* são variáveis entre 5 e 6 dias, porém em concentrações compreendidas entre 75.000 e 100.000 ppm.

Para extratos de anonáceas, Llanos; Arango e Girardo (2008) obtiveram mortalidade total de adultos de *S. zeamais* após oito dias do tratamento de grãos de milho com extratos (5.000 ppm) em hexano e em acetato de etila de sementes de *A. muricata*, diferentemente de Asmanizar; Djamim e Idris (2008), que constataram que o extrato em acetona de sementes de *A. muricata*, aplicados em grãos de arroz na concentração de 0,5% (p/p), leva de 3 a 4 dias para ocasionar 100% de mortalidade de *S. zeamais*, enquanto que a 0,25% (p/p), a mortalidade total dos gorgulhos ocorre após o quinto dia. Segundo os autores, a rápida mortalidade observada pode ser decorrente da ação fagodeterrente e tóxica ao sistema digestivo dos insetos das acetogeninas presentes nos extratos das sementes de *A. muricata*.

As acetogeninas são potentes inibidores do complexo I (NADH: ubiquinona oxireductase) dos sistemas de transporte de elétrons da mitocôndria e da NADH: oxidase da membrana plasmática, que induzem apoptose celular (morte programada da célula), talvez como consequência da privação de ATP (TORMO et al., 1999), refletindo em potentes efeitos bioativos para várias espécies de insetos (COLOM et al., 2008).

No entanto, Blessing et al. (2010) investigaram a possível correlação entre a capacidade de inibição de NADH oxidase de acetogeninas isoladas de folhas de *A. montana* e os seus efeitos larvicidas para *S. frugiperda*, com base na comparação entre a DL₅₀ (dose letal média) para as larvas e a CI₅₀ (concentração inibitória média) para a referida enzima. No entanto, os autores não verificaram correlação entre a DL₅₀ e a CI₅₀ dos compostos, o que comprova que a inibição do complexo mitocondrial I não é o único mecanismo de ação de acetogeninas anonáceas sobre insetos. Ainda, de acordo com os autores, compostos isolados de folhas de *A. montana* aplicados em dieta artificial na concentração de 100 ppm podem produzir alterações morfológicas em larvas e pupas de *S. frugiperda*. Assim, os autores verificaram que as larvas expostas ao composto *cis-annonacin-10-one* retinham, após a ecdise, a parte da exúvia que recobria a cabeça, e que o composto *gigantetronenin* ocasiona alta frequência de retenção de exúvia em larvas e de deformação de pupas de *S. frugiperda*. Por conseguinte, tais constatações são características de compostos que interferem na atividade hormonal de Lepidoptera, fato já observado com extratos de meliáceas (KLOCKE, 1987; GOVINDACHARI, 1992; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993, ROEL et al., 2000; TORRECILLAS; VENDRAMIM, 2001; BOGORNI; VENDRAMIM, 2005).

Com base nos resultados, não é possível realizar inferências sobre os eventos fisiológicos de *S. zeamais* afetados pelos compostos bioativos dos extratos testados. Contudo, abrem-se perspectivas de futuros estudos para melhor elucidação do(s) possível (is) mecanismo(s) e modo(s) de ação dos compostos bioativos de anonáceas para este coleóptero-praga.

4.3.2.4 Efeito inseticida por ação de contato dos extratos promissores

Contato via aplicação tópica: Por meio da análise dos resultados, verificou-se que os extratos de sementes de *A. mucosa*, tanto em hexano como em diclorometano, apresentaram expressivo efeito de contato para *S. zeamais*, via aplicação tópica, diferindo do controle a partir do terceiro dia após a exposição (Tabela 12), sendo que os demais tratamentos não diferiram do controle. As diferenças observadas podem estar relacionadas com a composição química qualitativa dos extratos das diferentes espécies e/ou estruturas vegetais, das características de lipofilicidade dos compostos ativos ou mesmo devido a diferenças nos níveis quantitativos dos compostos bioativos de cada extrato.

Contato em superfície contaminada (papel filtro): Não se verificaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 12), constatando-se, dessa forma, que nenhum dos tratamentos ocasionou efeito inseticida via contato em superfície contaminada (papel filtro).

Com base nos resultados obtidos, é possível inferir que o grau do contato com os extratos, nas diferentes formas de contaminação, e as diferentes regiões do corpo dos insetos expostos pode ter influenciado os resultados observados. Em trabalho realizado com inseticidas, Roessler (1989) demonstrou que a espécie de mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) exposta, o inseticida e o local do corpo onde foi aplicado influenciam na determinação da CL₅₀. Por exemplo, o tórax foi a região mais sensível do corpo de *Bractocera cucurbitae* (Coquillett) e *Bractocera dorsalis* (Hendel), enquanto que, em *Ceratitis capitata* (Wied), a região mais sensível foi a abdominal médio-ventral. A morfologia da superfície da cutícula é extraordinariamente variada, apresentando descontinuidades, invaginações e variações ao longo do corpo do inseto. Assim, visto que a cutícula dos insetos é a primeira linha de defesa contra fungos, bactérias, predadores e parasitóides, e estresses químicos ambientais, incluindo pesticidas (CHAPMAN, 1998), tais variações podem explicar os resultados obtidos pelas diferentes formas de contaminação.

Llanos, Arango e Giraldo (2008) verificaram que extratos orgânicos de sementes de *A. muricata* apresentam efeito de contato e ingestão para *S. zeamais*, com maior

eficácia via ingestão. Assim, pode-se inferir que há diferentes vias de contaminação de *S. zeamais* por extratos de diferentes espécies de anonáceas, sendo que a constatação de compostos com efeito inseticida de contato para *S. zeamais* pode habilitá-los para uso no tratamento periódico das estruturas armazenadoras, possibilitando a eliminação de focos de infestação desse inseto-praga. Salienta-se, no entanto, a necessidade de estudos com a finalidade de verificar tal possibilidade.

Tabela 12 - Mortalidade diária acumulada (%) ($\pm$ erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* por meio da aplicação tópica de extratos orgânicos brutos. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie (estrutura vegetal)	Solvente	Dias após a exposição ¹				
		1	2	3	4	5
<i>Annona montana</i> (folhas)	Hexano	6,66 $\pm$ 2,10 a	6,66 $\pm$ 2,10 a	6,66 $\pm$ 2,10 b	6,66 $\pm$ 2,10 b	11,66 $\pm$ 4,01 bc
<i>Annona montana</i> (sementes)	Hexano	5,00 $\pm$ 3,41 a	15,00 $\pm$ 4,28 a	15,00 $\pm$ 4,28 ab	16,66 $\pm$ 4,94 b	20,00 $\pm$ 6,32 bc
<i>Annona mucosa</i> (folhas)	Hexano	5,00 $\pm$ 2,23 a	8,33 $\pm$ 3,07 a	8,33 $\pm$ 3,07 b	16,66 $\pm$ 5,57 b	31,66 $\pm$ 6,00 bc
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Hexano	3,33 $\pm$ 2,10 a	20,00 $\pm$ 2,58 a	20,00 $\pm$ 2,58 ab	45,00 $\pm$ 5,62 a	78,33 $\pm$ 7,03 a
<i>Annona montana</i> (sementes)	Diclorometano	6,66 $\pm$ 2,10 a	8,33 $\pm$ 3,07 a	8,33 $\pm$ 3,07 b	11,66 $\pm$ 4,01 b	13,33 $\pm$ 3,33 bc
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Diclorometano	6,66 $\pm$ 3,33 a	20,00 $\pm$ 4,47 a	35,00 $\pm$ 6,19 a	60,00 $\pm$ 7,74 a	75,00 $\pm$ 9,21 a
Testemunha (acetona)	-	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 a	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	1,66 $\pm$ 1,66 c

¹ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

Tabela 13 - Mortalidade diária acumulada (%) ($\pm$ erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos a superfícies contaminadas (papel filtro) com extratos orgânicos brutos. Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Espécie (estrutura vegetal)	Solvente	Dias após a exposição ¹				
		1	2	3	4	5
<i>Annona montana</i> (folhas)	Hexano	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,33 $\pm$ 1,66	14,16 $\pm$ 3,00
<i>Annona montana</i> (sementes)	Hexano	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,16 $\pm$ 1,53	17,5 $\pm$ 5,28
<i>Annona mucosa</i> (folhas)	Hexano	1,66 $\pm$ 1,05	1,66 $\pm$ 1,05	2,5 $\pm$ 1,11	10,00 $\pm$ 2,23	15,83 $\pm$ 3,51
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Hexano	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,66 $\pm$ 1,05	6,66 $\pm$ 1,66	10,83 $\pm$ 2,38
<i>Annona montana</i> (sementes)	Diclorometano	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,66 $\pm$ 1,05	5,00 $\pm$ 1,29	19,16 $\pm$ 2,71
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	Diclorometano	0,83 $\pm$ 0,83	0,83 $\pm$ 0,83	0,83 $\pm$ 0,83	5,00 $\pm$ 1,82	10,00 $\pm$ 2,23
Testemunha (acetona)	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,66 $\pm$ 1,05	10,83 $\pm$ 2,38

¹ Diferença não significativa entre os tratamentos, nas colunas, por meio da comparação dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

4.3.2.5 Efeito residual dos extratos vegetais selecionados

Com base nas equações de regressão ajustadas para as porcentagens de mortalidade de *S. zeamais* ao longo dos períodos de armazenamento (Figura 8), verificou-se que os extratos em hexano e em diclorometano de sementes de *A. mucosa* apresentaram pequena redução na atividade inseticida após 56 dias de armazenamento, sendo estes, portanto, considerados os extratos com maior efeito residual. Na comparação entre estes, verificou-se superioridade do extrato obtido com o solvente diclorometano, cujos dados se ajustaram a uma equação polinomial ($y = 0,0094x^2 - 0,6578x + 96,8$), o que reflete menores níveis de degradação do que o extrato obtido com o solvente hexano ($y = -0,4482x + 96,113$). Extratos em hexano e em diclorometano de *A. montana* apresentaram persistência intermediária entre os extratos testados, os quais ocasionaram um declínio mais acentuado da atividade inseticida a partir dos 28 dias de armazenamento. Para os extratos em hexano de folhas de *A. montana* e *A. mucosa* observou-se um rápido declínio da mortalidade no decorrer dos tempos de armazenamento, constituindo-se nos extratos menos promissores para utilização como protetores de grãos contra o ataque de *S. zeamais*.

Figura 8 - Porcentagens de mortalidade de *Sitophilus zeamais* em sementes de milho tratadas com diferentes extratos orgânicos, após a aplicação e aos 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento. Temp: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux. EHAMuc: Extrato em hexano de *Annona mucosa*; EHAmom: Extrato em hexano de *Annona montana*; EDAmuc: Extrato em diclorometano de *Annona mucosa*; EDAmom: Extrato em diclorometano de *Annona montana*

Os estudos até então desenvolvidos com milho armazenado tratados com compostos naturais e infestado com *S. zeamais* têm demonstrado que, na maioria dos casos, a mortalidade do inseto decresce com o período de armazenamento, ao mesmo tempo em que aumenta o número de insetos emergidos (progênie F1), em decorrência da redução da persistência da atividade inseticida (COITINHO et al., 2010). No presente estudo, entretanto, verificaram-se altos níveis de controle de *S. zeamais* com a aplicação de extratos em hexano e em diclorometano de sementes de *A. mucosa*, após

56 dias de armazenamento, o que demonstra a potencialidade do uso desses extratos como protetores de grãos.

Similarmente ao observado neste estudo, Sighamony et al. (1985) verificaram que a atividade biológica do óleo de *Piper nigrum* (Piperaceae) persiste ao longo de um período de 60 dias, enquanto que os óleos de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), *Pongumia glabra* (Fabaceae) e *Juniperus virginiana* (Cupressaceae) perdem sua eficácia no controle de *S. oryzae* e *R. dominica* após 30 dias de armazenamento. Ashamo e Odeyemi (2001) verificaram que extratos em éter de petróleo de sementes de *Arachis hypogaea* (Fabaceae) ocasionam alta atividade inseticida para *S. zeamais* e que esta persiste até 28 dias após o armazenamento. Por outro lado, os óleos fixos de *Helianthus annuus* (Asteraceae), *Zea mays* (Poaceae), *Olea europaea* (Oleaceae) e *Glycine max* (Fabaceae), na concentração de 5 mL kg⁻¹ de grãos de milho, ocasionaram, respectivamente, 53,2; 56,4; 58,8 e 67,7% de mortalidade dos adultos de *S. zeamais* após sete meses de armazenamento (DEMISSIE et al., 2008).

De acordo com Obeng-Ofori et al. (1997), a persistência da atividade inseticida de óleos e extratos vegetais está relacionada com a composição química e com a sensibilidade do inseto-praga alvo aos compostos ativos. No presente estudo, possivelmente as diferenças observadas entre os tratamentos estão relacionadas com as variações na composição qualitativa e quantitativa dos compostos ativos presentes nos respectivos extratos e de possíveis interações entre os compostos. Nesse sentido, alguns autores (HUANG; HO, 1998; REGNAULT-ROGER; PHILOGENE; VICENT, 2002) verificaram que óleos essenciais com altos teores de compostos hidrogenados perdem mais rapidamente sua atividade inseticida do que aqueles que contêm principalmente compostos oxigenados. Segundo Kim, Roh e Kim (2002), a velocidade da oxidação de monoterpenos hidrogenados é maior que para monoterpenos oxigenados, e que tal oxidação leva à redução da eficácia inseticida.

Para os extratos avaliados neste estudo, além da velocidade da oxidação das diferentes substâncias, variações nas características de foto e termoestabilidade dos compostos podem estar relacionadas com os resultados observados. Assim, Caboni et al. (2002) estudaram a degradação da azadiractina A por meio de testes de

evaporação, termodegradação e fotodegradação e verificaram que a fotodegradação é o principal fator responsável pela degradação desse composto natural.

Considerando-se os resultados obtidos, nas condições do presente estudo, pode-se concluir que os extratos de sementes de *A. mucosa* em hexano e diclorometano são promissores protetores de grãos contra *S. zeamais*, propiciando níveis satisfatórios de controle por pelos menos oito semanas após a sua aplicação em grãos de milho.

4.3.2.6 Avaliação da atividade inseticida de formulações à base de terra de diatomácea para adultos de *S. zeamais*

4.3.2.6.1 Curvas de concentração-resposta de duas formulações comerciais de terra de diatomácea

As CL_{30} , CL_{50} e CL_{90} estimadas para adultos de *S. zeamais* foram, respectivamente, de 213,78; 248,75 e 360,18 ppm para Keepdry[®], e de 153,93; 204,57 e 409,97 ppm para Insecto[®], sem, contudo, haver diferença significativa entre ambas as formulações quando comparados os parâmetros estimados com os seus respectivos intervalos de confiança ($p \leq 0,05$) (Tabela 14). Verificou-se, entretanto, um maior coeficiente angular (inclinação) da curva de concentração-mortalidade de *S. zeamais* quando exposto a Keepdry[®], o que pode conduzir em respostas populacionais mais homogêneas quando empregado tal produto no tratamento de grãos de milho.

Alguns estudos (KORUNIC, 1998; SUBRAMANYAN; ROESLI, 2000; KAVALLIERATOS et al.; 2005; VAYIAS et al., 2009) têm demonstrado que formulações de terra de diatomácea de diferentes origens apresentam variação em toxicidade e em características físicas que afetam sua eficácia. No entanto, no presente estudo não se verificaram diferenças significativas entre as duas formulações comerciais disponíveis no mercado brasileiro, o que pode estar vinculado ao fato de que as mesmas sejam oriundas das mesmas fontes ou de fontes com origens geológicas semelhantes (VAYIAS et al., 2009).

De um modo geral, as mortalidades de adultos de *S. zeamais* verificadas neste estudo são similares aos obtidos por Caneppele; Andrade e Santaella (2010), os quais avaliaram a eficácia de Insecto[®], em diferentes temperaturas. No entanto, nesta

pesquisa, a eficácia é superior à obtida em outros estudos, com as mesmas formulações (SMIDERLE; CICERO, 1999; MARSARO JÚNIOR et al. 2007; CERUTI et al., 2008; MARTINS; OLIVEIRA, 2008). Além da falta de padronizações metodológicas entre os estudos, tais diferenças são decorrentes, principalmente, de variações do teor de umidade dos grãos utilizados nos bioensaios, os quais influenciam na taxa de perda de água dos insetos e, conseqüentemente, afetam a eficiência de formulações de terra de diatomácea (BANKS; FIELDS, 1995).

Tabela 14 - Estimativa da CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀ (em ppm) e intervalo de confiança de duas formulações de terra de diatomácea para adultos de *Sitophilus zeamais*, após 10 dias de exposição. Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Formulações	n ¹	Coeficiente angular (± EP)	CL ₃₀ (IC) ²	CL ₅₀ (IC) ²	CL ₉₀ (IC) ²	$\chi^{2(3)}$	g.l. ⁴
Keepdry®	1250	7,97±1,35	213,78 (112,50 - 244,08)	248,75 (182,89 - 274, 95)	360,18 (314,38 - 701,69)	5,11	3
Insecto®	1250	4,24±0,26	153,93 (112,98 - 187,39)	204,57 (164,43 - 245,02)	409,97 (331,20 - 586,11)	3,33	3

¹n: número de insetos testados.

² IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro.

⁽³⁾ χ^2 : valor de qui-quadrado calculado.

⁴ g.l.: graus de liberdade.

4.3.2.6.2 Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀) de duas formulações comerciais de terra de diatomácea

A dinâmica da mortalidade de *S. zeamais* exposto às duas formulações de terra de diatomácea ao longo de 10 dias de exposição (Figura 9) evidencia, de modo geral, um incremento da mortalidade com o decorrer dos dias de exposição, sendo que este foi mais significativo a partir do segundo dia de exposição, nas três maiores concentrações. Assim, verifica-se efeito interativo entre concentração e período de exposição do inseto ao pó inerte, sendo que as concentrações mais elevadas proporcionaram melhor controle da população, em menores períodos de exposição.

Os tempos letais médios estimados (Tabela 15) também não evidenciaram diferença entre as duas formulações, em nenhuma das concentrações avaliadas. Nas duas maiores concentrações (1.000 e 2.000 ppm), o TL₅₀ oscilou entre 1,86 e 2,18 dias, sem, contudo, haver diferença entre as duas concentrações quando comparados os seus respectivos intervalos de confiança ($p \leq 0,05$). Diferença entre as concentrações estudadas, independentemente da formulação, foi observada a partir da concentração de 500 ppm, com valores de TL₅₀ de 2,66 e 2,83 dias para Keepdry® e Insecto®, respectivamente, os quais diferiram das maiores (1.000 e 2.000 ppm) e da menor concentração (250 ppm) estudada, a qual necessitou de um longo período de exposição (variável entre 7,65 e 9,21 dias) para ocasionar mortalidade de metade dos gorgulhos expostos.

A relação direta da mortalidade de *S. zeamais* com a concentração e o tempo de exposição à terra de diatomácea deve-se ao seu modo de ação. De acordo com Subramanyam e Roesli (2000), a morte dos insetos pela terra de diatomácea é atribuída à dessecação provocada pela adsorção e abrasividade desse pó inerte que rompe a camada de cera da epicutícula dos insetos, fazendo com que eles percam água do corpo até morrerem. Portanto, em altas concentrações, a adsorção e a abrasividade causadas pela terra de diatomácea ocorrem mais rapidamente, causando a morte num curto intervalo de tempo, quando comparado com as menores concentrações.

Marsaro Júnior et al. (2007) utilizaram um modelo não linear do tipo logístico para avaliar a interação entre a dosagem e o tempo de exposição à terra de diatomácea sobre a mortalidade de *S. zeamais*. Os autores observaram que o tempo necessário

para obter 80% de mortalidade é de 5 e 6 dias, respectivamente para as dosagens de 1.000 g t^{-1} (1.000 ppm) e de 750 g t^{-1} (750 ppm), enquanto nas dosagens de 500 e 250 g t^{-1} (500 e 250 ppm) foram necessários 9 e 17 dias, respectivamente. No entanto, Arthur (2001) observou que após sete dias de tratamento não havia insetos vivos da espécie *S. oryzae* em grãos de trigo tratados com terra de diatomácea (Protect-It®) na concentração de 500 ppm, mantidos a 30°C e 75% de U.R.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que as duas formulações comerciais à base de terra de diatomácea disponíveis no mercado brasileiro não apresentam diferenças entre si quando comparada a eficiência de controle de *S. zeamais*, podendo, dessa forma, ser empregadas em programas de manejo desse coleóptero-praga em cereais armazenados. Salienta-se, no entanto, que para a definição das concentrações a serem aplicadas na proteção de grãos deverão ser consideradas as possíveis infestações múltiplas dos grãos, visto haver diferença na suscetibilidade das diferentes espécies-praga (PINTO JÚNIOR et al., 2008). Para as etapas seguintes deste estudo, com base nos resultados observados, optou-se pelo uso de Keepdry® em virtude de esta ter apresentado uma tendência de resposta mais homogênea (maior coeficiente angular) no controle de *S. zeamais*.

A)

B)

Figura 9 - Mortalidade diária acumulada de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos de milho tratados com diferentes concentrações de duas formulações comerciais de terra de diatomácea: A) Insecto® e B) Keepdry®. Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Tabela 15 - Estimativa do TL_{50} (em dias) e intervalo de confiança de duas formulações de terra de diatomácea para adultos de *Sitophilus zeamais*, a partir de diferentes concentrações. Temp.: $25 \pm 2^\circ C$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Formulações	Concentração (ppm)	n ¹	Coefficiente angular ($\pm$ EP)	TL_{50} (IC) ²	$\chi^{2(3)}$	g.l. ⁴
Keepdry [®]	250	250	3,56 $\pm$ 0,19	9,21 (8,77 - 9,76)	7,99	8
	500	250	4,99 $\pm$ 0,19	2,66 (2,44 - 2,88)	9,55	8
	1000	250	5,73 $\pm$ 0,25	2,18 (2,09 - 2,27)	5,13	8
	2000	250	7,02 $\pm$ 0,36	2,00 (1,88 - 2,12)	12,19	8
Insecto [®]	250	250	3,84 $\pm$ 0,21	7,65 (6,49 - 10,26)	9,31	7
	500	250	3,87 $\pm$ 0,15	2,83 (2,19 - 3,58)	44,27 ^{ns}	8
	1000	250	7,78 $\pm$ 0,44	2,04 (1,94 - 2,14)	9,13	8
	2000	250	7,87 $\pm$ 0,44	1,86 (1,76 - 1,95)	9,94	8

¹n: número de insetos testados; ²IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro;
⁽³⁾ χ^2 : valor de qui-quadrado calculado; ⁴g.l.: graus de liberdade; ^{ns} não significativo.

4.3.2.7 Associação de extratos vegetais e formulações de terra de diatomácea no controle de *S. zeamais*

Houve incremento da mortalidade de *S. zeamais* com o aumento do período de exposição aos tratamentos, sendo que todos os tratamentos diferiram do controle (testemunha) já na primeira avaliação (Tabela 15). De um modo geral, o tratamento com terra de diatomácea (248,75 ppm) e a associação de combinações desta com extratos em hexano de sementes de *A. mucosa* (77,72 ppm) foram os tratamentos que ocasionaram as maiores mortalidades, porém sem haver diferença entre eles em nenhuma das datas de avaliação. Por sua vez, a utilização conjunta de terra de diatomácea e extratos de sementes de *A. mucosa* e de *A. montana*, independentemente da concentração utilizada, ocasionaram mortalidades equivalentes ou mesmo inferiores quando estes foram empregados isoladamente, o que demonstra efeito antagônico entre as duas técnicas.

Observou-se, ainda, tendência de menor eficiência relativa dos tratamentos empregados associadamente quanto maior a quantidade de extrato orgânico aplicado. Isto pode ter ocorrido em virtude de que uma fração do extrato vegetal tenha sido adsorvida pelas partículas de terra de diatomácea, reduzindo a capacidade de ligação desta com os lipídios epicuticulares do inseto, reduzindo sua eficiência, e/ou mesmo pela inativação dos compostos bioativos presentes no extrato orgânico. Similarmente, Islam et al. (2010) verificaram que a mistura dos monoterpenoides eugenol e cinamaldeído com terra de diatomácea resultam em efeitos antagônicos sobre a mortalidade de *C. maculatus*, assim como na combinação de cinamaldeído e terra de diatomácea no controle de *S. oryzae*. Os autores verificaram, entretanto, efeitos interativos variáveis, dependendo do monoterpenoide utilizado e da suscetibilidade do inseto-praga alvo.

Tais resultados, no entanto, divergem de Athanassiou, Korunic e Vayias (2009), que verificaram que uma formulação de terra de diatomácea associada com extratos de raízes de *Celastrus angulatus* (Celastraceae), denominada como DEBBM-P/WP, foi mais efetiva que a aplicação somente de terra de diatomácea, sugerindo a ocorrência de efeito sinérgico entre as duas técnicas. A natureza e a afinidade química dos compostos presentes nos diferentes extratos pode explicar tal diferença.

Alguns estudos têm demonstrado a possibilidade de associação de pós inertes e óleos essenciais, ocasionando aumento da persistência da atividade inseticida. Assim, Yang et al. (2010) verificaram que a combinação de óleo essencial de *Allium sativum* (Amaryllidaceae) com terra de diatomácea proporciona um forte efeito aditivo no controle de coleópteros-praga de grãos armazenados. Por sua vez, Nguemtchouin et al. (2010) utilizaram argila caulínica como suporte do óleo essencial de *X. aethiopica* no preparo de uma formulação inseticida visando à proteção de grãos de milho contra *S. zeamais*, sendo que os resultados obtidos com a formulação proposta foram comparáveis ao inseticida Poudrox[®] (inseticida sintético à base de malathion). Salienta-se, no entanto, que em virtude da composição predominante de compostos voláteis em óleos essenciais, a adsorção em pós inertes pode ter curta duração e não comprometer a ação inseticida de ambos os produtos. Assim, Nguemtchouin et al. (2010) verificaram, utilizando monitoramento por *headspace*, decréscimos de 91 para 17% do teor de óleo essencial de *X. aethiopica* adsorvido em argila caulínica após 24 horas, quando esta foi mantida em caixas abertas.

Embora se tenha verificado efeito antagônico na interação de terra de diatomácea com os respectivos extratos de anonáceas no controle de *S. zeamais*, a supressão da emergência de adultos F1 pode possibilitar o emprego associado na proteção de grãos. Nesse sentido, Ulrichs e Mewis (2000) testaram a combinação de terra de diatomácea e nim, que atua parcialmente como fagodeterrente para *S. oryzae* e *T. castaneum*, e verificaram efeito aditivo entre as duas técnicas quando considerada essa variável. Da mesma forma, outras possíveis vantagens como a redução da incidência de populações resistentes para ambas as técnicas de controle e o aumento do poder residual de substâncias naturais fotoinstáveis pode justificar o aumento das dosagens ou mesmo de modificações nas proporções de ambos os constituintes de modo a atenuar tais inconvenientes. Obviamente, futuros estudos serão necessários para elucidação de tais hipóteses.

Tabela 16 - Percentagem de mortalidade acumulada ($\pm$ erro padrão) de *Sitophilus zeamais* expostos a grãos tratados com extratos orgânicos das sementes de duas espécies de Annonaceae, em suas respectivas CL₃₀* e CL₅₀*; com terra de diatomácea, em sua respectiva CL₃₀ e CL₅₀ e com a combinação entre extratos vegetais e terra de diatomácea. Temp.: 25 $\pm$ 2°C; U.R.: 60 $\pm$ 10%; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux

Tratamentos**	Concentração (ppm)	Dias após o tratamento ¹				
		2	4	6	8	10
Testemunha	-	1,33 $\pm$ 0,66 c	2,00 $\pm$ 0,89 c	2,16 $\pm$ 1,04 e	2,16 $\pm$ 1,04 e	2,16 $\pm$ 1,04 e
EHA _{muc}	77,72 (= CL ₃₀)	7,33 $\pm$ 2,17 b	14,33 $\pm$ 3,24 b	17,33 $\pm$ 3,74 d	18,66 $\pm$ 3,71 d	21,66 $\pm$ 3,51 d
EHA _{muc}	110,28 (= CL ₅₀)	7,00 $\pm$ 2,17 b	17,33 $\pm$ 2,85 b	25,66 $\pm$ 3,15 cd	31,33 $\pm$ 3,92 c	38,33 $\pm$ 3,98 c
EDA _{mon}	461,91 (= CL ₃₀)	12,66 $\pm$ 1,97 ab	24,66 $\pm$ 2,71 ab	31,66 $\pm$ 3,98 bc	34,66 $\pm$ 4,21 c	35,66 $\pm$ 4,27 c
EDA _{mon}	534,75 (= CL ₅₀)	16,00 $\pm$ 3,05 ab	34,00 $\pm$ 5,46 a	41,33 $\pm$ 4,63 b	47,66 $\pm$ 4,33 b	47,66 $\pm$ 4,33 bc
TD	213,78 (= CL ₃₀)	9,33 $\pm$ 1,22 b	25,00 $\pm$ 1,77 ab	36,33 $\pm$ 2,27 bc	39,33 $\pm$ 2,71 bc	40,66 $\pm$ 2,56 bc
TD	248,75 (= CL ₅₀)	9,33 $\pm$ 1,33 b	27,00 $\pm$ 3,13 ab	51,00 $\pm$ 4,80 ab	58,00 $\pm$ 3,38 ab	60,16 $\pm$ 3,50 ab
TD+EHA _{muc}	213,78+110,28	13,00 $\pm$ 2,29 ab	26,66 $\pm$ 3,63 ab	42,00 $\pm$ 6,69 b	48,00 $\pm$ 6,92 b	49,83 $\pm$ 6,52 b
TD+EHA _{muc}	248,75+77,72	10,00 $\pm$ 1,46 ab	34,66 $\pm$ 2,66 a	56,33 $\pm$ 5,35 a	63,33 $\pm$ 5,20 a	67,66 $\pm$ 5,01 a
TD+EDA _{mon}	213,78+534,75	17,33 $\pm$ 3,16 a	31,66 $\pm$ 5,04 ab	34,66 $\pm$ 6,29 bc	35,66 $\pm$ 6,60 c	36,00 $\pm$ 6,85 c
TD+EDA _{mon}	248,75+461,91	11,00 $\pm$ 1,69 ab	26,00 $\pm$ 2,42 ab	27,33 $\pm$ 2,76 c	28,33 $\pm$ 3,07 cd	28,33 $\pm$ 3,07 cd

¹ Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$).

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

** EHA_{muc}: Extrato em hexano de *Annona mucosa*; EDA_{mon}: Extrato em diclorometano de *Annona montana*; TD: terra de diatomácea.

4.3.3 Fracionamentos biomonitorados dos extratos mais promissores

Com base nos resultados dos ensaios biológicos e na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos brutos (item 4.2), selecionaram-se os extratos em hexano de sementes de *A. mucosa* e de *A. montana* para realização de fracionamentos biomonitorados com a finalidade de se obterem os compostos responsáveis pela bioatividade observada.

4.3.3.1 Partição líquido-líquido dos extratos orgânicos selecionados

Os rendimentos das frações obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato em hexano de sementes de *A. montana* variaram de 7,82 a 76,85%, enquanto para as frações do extrato em hexano de sementes de *A. mucosa* as variações nos rendimentos foram de 6,70 a 72,25%. Para ambos os extratos, os maiores rendimentos foram obtidos nas frações em hexano, o qual concentrou a porção oleosa do extrato, fato ratificado pela consistência destas frações.

Tabela 17 - Rendimento na obtenção de frações, após partição líquido-líquido dos extratos em hexano das sementes de duas anonáceas

Espécie (estrutura vegetal)	Peso extrato bruto (g)	Solvente	Rendimento ¹	
			(g)	(%)
<i>Annona montana</i> (sementes)	12,01	Hexano	9,23	76,85
		Diclorometano	0,94	7,82
		Hidroálcool	0,98	8,16
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	4,47	Hexano	3,23	72,25
		Diclorometano	0,74	16,55
		Hidroálcool	0,30	6,70

¹ Obtido a partir da quantidade (g) do respectivo extrato bruto.

Após o décimo dia de exposição de adultos de *S. zeamais* a grãos de milho tratados com as respectivas frações, verificou-se mortalidade significativa dos gorgulhos expostos a grãos tratados com as frações em diclorometano e hidroálcool do extrato em hexano de ambas as espécies (Figuras 10 e 11), sem, contudo, evidenciar diferença entre ambas as frações de cada extrato. Em virtude de que as frações foram testadas na CL₅₀ do respectivo extrato bruto, verificou-se uma concentração dos compostos bioativos nas frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de

sementes de *A. mucosa*, as quais ocasionaram mortalidades muito superiores ao extrato bruto. Não se verificou, no entanto, a mesma tendência para as frações em diclorometano e hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *A. montana*, os quais apresentaram níveis de mortalidades próximas ao observado para o extrato bruto. Cabe salientar, no entanto, que alguns compostos, quando testados de forma isolada, apresentam baixa eficácia, sugerindo efeito sinérgico entre as substâncias presentes no extrato, indicando que a associação destas substâncias é a responsável pela mortalidade obtida nos testes realizados (SHAALAN et al., 2005).

Figura 10 - Percentagem de mortalidade ao 10º dia ($\pm$ erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com diferentes frações do extrato em hexano de sementes de *Annona montana*. Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$)

Figura 11 - Percentagem de mortalidade ao 10º dia ($\pm$ erro padrão) de adultos de *Sitophilus zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com frações do extrato em hexano de sementes de *Annona mucosa*. Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$; fotofase: 14 h; luminosidade média: 172 lux. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si a partir dos intervalos de confiança das médias obtidas pelo modelo binomial ($p \leq 0,05$)

De um modo geral, independentemente da espécie vegetal, verificou-se uma maior atividade inseticida nas frações obtidas por meio de solventes de polaridade intermediária, os quais possuem maior espectro de afinidade polar (CUNHA et al., 2005). Segundo Ferri (1996), considerações sobre a permeabilidade em membranas e metabolismo indicam que o balanceamento entre a hidrofiliabilidade e a lipofiliabilidade é importante para as substâncias apresentarem afinidade por receptores biológicos, e que extratos extremamente polares (aquosos) ou extremamente apolares (hexânico ou em éter de petróleo) apresentam menor atividade comparados a extratos de polaridade intermediária, como o etanólico, metanólico, clorofórmico e hidroalcoólico. No entanto, variações na bioatividade podem ser constatadas dependendo do inseto-alvo, da forma de contaminação destes e do modo de ação de compostos oriundos de uma mesma espécie vegetal. Assim, CUNHA (2004) verificou potencial ação inseticida da fração em acetato de etila do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* (Meliaceae)

para a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Por sua vez, Pitta (2010) verificou maior bioatividade sobre *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae) da fração hexânica do extrato em hexano da mesma espécie e estrutura vegetal.

4.3.3.2 Análises químicas das frações bioativas

4.3.3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD), das frações bioativas (em diclorometano e em hidroálcool) dos extratos em hexano de *A. montana* e de *A. mucosa*, em diferentes eluentes e reveladores, são apresentados na Figura 12.

O revelador reagente de Dragendorff (revelador C) é específico para alcaloides e produz manchas alaranjadas que configuram resultado positivo para essa classe de compostos nas amostras. A luz ultravioleta (revelador B) revelou apenas compostos que possuem grupos cromóforos. No entanto, algumas substâncias mesmo contendo tais grupos absorvem pouca radiação e a mancha se torna de difícil visualização. A solução ácida de vanilina (revelador A) é o mais universal dos três reveladores utilizados e mostrou resultados positivos para variadas classes de compostos nas amostras analisadas.

Uma análise geral das cromatoplasmas indica similaridades entre os perfis cromatográficos para as quatro amostras testadas, o que pode corroborar a análise dos resultados obtidos nos ensaios biológicos com *S. zeamais*.

Figura 12 - Perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD), das frações do extrato em hexano de *Annona montana* (4D: fração em diclorometano; 4H: fração em hidroálcool) e de *Annona mucosa* (7D: fração em diclorometano; 7H: fração em hidroálcool), em diferentes eluentes e reveladores (A: vanilina sulfúrica, B: luz ultravioleta (254 nm), C: solução de Dragendorff)

4.3.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os perfis cromatográficos das frações bioativas dos extratos em hexano de *A. montana* e *A. mucosa*, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são apresentados nas Figuras 13 e 14. Em todas as frações avaliadas de ambos os extratos, os compostos presentes apresentaram tempo de retenção variável entre 20 e 45 min. No entanto, observou-se nas frações em diclorometano um pico intenso no tempo próximo a 5 min, o qual é reflexo da presença de compostos mais apolares que não apresentaram afinidade com a coluna cromatográfica utilizada, indicando não ter havido uma boa otimização do método de análise.

De um modo geral, verificaram-se semelhanças nos perfis cromatográficos das duas frações bioativas de ambos os extratos selecionados, apresentando os mesmos picos dos compostos majoritários e abundância de substâncias presentes em cada fração, o que corrobora os resultados obtidos nos bioensaios com *S. zeamais*, o qual demonstrou não haver diferença significativa entre as frações em diclorometano e em hidroálcool de ambos os extratos selecionados.

Salienta-se, no entanto, que o objetivo dessa análise foi comparar o perfil cromatográfico das frações obtidas, subsidiando a tomada de decisão das etapas subsequentes do processo de fracionamento dos referidos extratos. Posteriormente, para identificação dos compostos presentes em cada fração, estas serão submetidas à análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM).

Figura 13 - Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), das frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *Annona montana*

Figura 14 - Cromatograma, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), das frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *Annona mucosa*

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

As análises por RMN de ^1H juntamente com os resultados obtidos em cromatografia em camada delgada (CCD) (item 4.3.3.2.1) permitem reconhecer, de forma geral, classes majoritárias nas amostras. Nessa perspectiva, foram analisadas as

frações bioativas (em diclorometano e em hidroálcool) dos extratos em hexano das sementes de *A. montana* e de *A. mucosa*.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de *A. montana* (Figura 16) revela que a classe dos triglicerídeos é majoritária na composição da amostra.

Figura 15 – Estrutura geral de triglicerídeos

Dada a estrutura geral mostrada na Figura 15, observou-se no espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de *A. montana* sinais que indicam que tal amostra contém triglicerídeos como componente principal (Figura 16). Analisando tal espectro, observam-se os seguintes sinais (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005):

- Sinal em δ 0,78-0,83 ppm característico de metilas (CH_3) terminais de cadeias alquílicas longas;
- Singleto largo em δ 1,23 ppm característico de grupos metilênicos (CH_2) de cadeias alquílicas longas;
- Sinais entre δ 1,91-1,99 ppm que indicam a presença de grupos CH_2 vizinhos a duplas ligações. A presença de duplas ligações na cadeia alquílica é evidenciada ainda ao se observar a presença de sinais em δ 5,18 - 5,30 ppm característicos de hidrogênios de duplas ligações;
- Sinais em δ 2,22 e 2,68 característicos de hidrogênios β - e α -carboxílicos, respectivamente;
- Sinais entre δ 4,04-4,25 que se referem aos hidrogênios dos carbonos oxigenados do glicerol.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de *Annona montana* (CDCl_3 , 400 MHz)

A presença dos triglicerídeos nessa amostra é consideravelmente majoritária, a tal ponto que não foi possível se observarem sinais de outras classes de compostos. No entanto, as cromatoplasmas reveladas em reagente de Dragendorff (revelador C, item 4.3.3.2.1) mostraram manchas alaranjadas que fornecem um resultado positivo para a presença de alcaloides, e cromatoplasmas reveladas em solução ácida de vanilina revelaram a presença de outros compostos diferentes. Dados de literatura acerca dessa espécie vegetal confirmam nela a presença de alcaloides, além da ocorrência de acetogeninas, uma classe de compostos encontrada somente em espécies da família Annonaceae (BERMEJO et al., 2005; COLOM et al., 2009; CORDELL ; QUINN-BEATTIE, 2001; DA ROCHA; LUZ; RODRIGUEZ, 1981; MOOTOO et al., 2000).

O espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de *A. mucosa* (Figura 17) apresentou os mesmos sinais que caracterizam a presença de triglicerídeos, descritos anteriormente. No entanto, ao analisar esse espectro, observou-se ainda a presença de sinais na região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos (δ 6,5-7,4 ppm) que podem ser atribuídos a alcaloides, uma vez que foram observados resultados positivos para a presença de alcaloides nas cromatoplasmas para essa amostra, reveladas por meio do reagente de Dragendorff. Novamente, a baixa intensidade desses sinais de hidrogênios aromáticos se deve à grande quantidade de triglicerídeos presentes. Pelas cromatoplasmas dessa fração, reveladas em solução ácida de vanilina, também foi possível supor a presença de acetogeninas, assim como observado para a fração em diclorometano do extrato em hexano de *A. montana*.

A presença dos triglicerídeos é observada nas cromatoplasmas pelas manchas azuis de pouca polaridade, as quais apresentaram maior R_f . Tendo-se em vista a pouca polaridade desses compostos, é plausível supor que, nas frações em hexano das duas espécies vegetais, há a presença majoritária desses compostos. Assim, em decorrência de que as frações em hexano das duas espécies vegetais não apresentaram bioatividade para adultos de *S. zeamais* (Figuras 10 e 11) e, considerando-se que estas são constituídas majoritariamente por triglicerídeos,

pode-se afirmar que a atividade das frações em diclorometano está relacionada aos demais compostos presentes nessas amostras (alcalóides e/ou acetogeninas).

Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H da fração em diclorometano do extrato em hexano de sementes de *Annona mucosa* (CDCl_3 , 400 MHz)

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração em hidroálcool de *A. montana* (Figura 20) revela sinais correspondentes às acetogeninas. De forma geral, as acetogeninas são um grupo de produtos naturais derivados de ácidos graxos que contêm entre 32 e 34 carbonos em sua estrutura, com as cadeias alquílicas terminando em unidades γ -lactônicas insaturadas ou não. Várias funções oxigenadas podem estar presentes ao longo da cadeia, como grupos hidroxilas, cetonas, epóxidos, tetrahydrofuranos e tetrahidropiranos, assim como ligações duplas e triplas (BERMEJO et al., 2005).

Figura 18 – Estrutura geral de acetogeninas

De acordo com a estrutura geral para acetogeninas mostrada na Figura 18 (BERMEJO et al., 2005) observa-se no RMN de ^1H (Figura 20) os seguintes sinais (LIAW et al., 2004; LIAW et al., 2005; 2005; MOOTOO et al., 2000; WANG et al., 2002):

- Hidrogênios da insaturação do anel lactônico em deslocamento químico δ 7,38 ppm;
- Diversos sinais em torno de δ 5,04-5,32 ppm característicos de hidrogênio do carbono saturado do anel lactônico, sendo que vários desses sinais indicam a presença de mais de uma acetogenina na amostra;
- Sinais em torno de δ 3,22-3,70 ppm característicos dos hidrogênios de grupos metínicos (CH) da cadeia alquílica ligados diretamente a grupos hidroxilas ou a grupos epóxido;
- Sinais na faixa δ 2,11-2,40 ppm característicos de hidrogênios α -lactônicos e/ou α -carbonílicos no caso de moléculas com grupos cetonas nas cadeias alquílicas;
- Sinais na faixa δ 1,2-1,8 ppm referentes aos diversos grupos CH_2 que ocorrem ao longo das cadeias alquílicas;

- Sinais em δ 0,8 ppm, característicos de metilas terminais de cadeias alquílicas longas.

Na comparação entre as frações em diclorometano e em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *A. montana*, observa-se um aumento na atividade inseticida da segunda em relação à primeira, apesar de não evidenciar diferença estatística. Assim, tal aumento pode estar diretamente relacionado com o aumento da concentração de acetogeninas na fração em hidroálcool, o que ratifica a ação inseticida desses compostos, fato já relatado na literatura. Além disso, a análise das cromatoplasmas de ambas as frações do extrato em hexano dessa espécie vegetal evidenciaram a presença de alcalóides, o que permite inferir, em hipótese, que tais compostos apresentam ação inseticida para adultos de *S. zeamais*.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *A. mucosa* (Figura 21) mostrou também sinais característicos de acetogeninas, como descrito anteriormente. No entanto, é possível notarem-se sinais intensos em torno de δ 3,64-3,76 ppm, os quais são indicativos de grupos N-metil (N-CH_3), característicos dos esqueletos de alcaloides (CHEN; CHANG; WU, 1996; KUO et al., 2001; KUO et al., 2004). Ainda, observaram-se sinais com baixa intensidade na região de hidrogênios de anéis aromáticos. Assim, propõe-se que esta fração apresenta acetogeninas e alcaloides que novamente, seriam os responsáveis pela alta atividade inseticida apresentada por essa fração para adultos de *S. zeamais*.

Figura 19 – Estrutura geral de alcalóides isoquinolínicos, comuns em plantas da família Annonaceae

Figura 20 – Espectro de RMN de ^1H da fração em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *Annona montana* (DMSO, 400 MHz)

Figura 21– Espectro de RMN de ^1H da fração em hidroálcool do extrato em hexano de sementes de *Annona mucosa* (DMSO, 400 MHz)

CONCLUSÕES

Com base nos resultados dos bioensaios realizados nas condições pré-estabelecidas, conclui-se que:

- Os extratos de sementes de *A. mucosa* e de *A. montana*, em hexano e diclorometano, seguido pelos extratos de folhas das mesmas espécies, em hexano, apresentam efeitos bioativos promissores sobre *S. zeamais*, configurando-se em excelentes fontes de moléculas-modelo para a síntese de novos inseticidas;

- Extratos de ramos de *C. sylvestris*, em hexano e em diclorometano, são os tratamentos que ocasionam os efeitos repelentes e/ou deterrentes de alimentação e/ou oviposição para adultos de *S. zeamais*;

- Entre os extratos testados, os obtidos de sementes de *A. mucosa* em hexano e em diclorometano são os que apresentam a menor concentração letal média (CL_{50} = 110,28 e 149,79 ppm, respectivamente);

- Os compostos ativos presentes nos extratos testados não apresentam ação neurotóxica para adultos de *S. zeamais*;

- Os extratos de sementes de *A. mucosa*, tanto em hexano como em diclorometano, apresentam efeito de contato para *S. zeamais*, via aplicação tópica;

- Nenhum dos extratos selecionados apresenta efeito inseticida via contato em superfície contaminada (papel filtro);

- Os extratos em hexano e em diclorometano de sementes de *A. mucosa* apresentam pequena redução na atividade inseticida após 56 dias de armazenamento, sendo estes, portanto, os extratos com a maior persistência da atividade inseticida;

- As duas formulações comerciais à base de terra de diatomácea (Keepdry® e Insecto®) disponíveis no mercado brasileiro não apresentam diferenças entre si quando comparada a eficiência de controle de *S. zeamais*, podendo, dessa forma, ser empregadas em programas de manejo desse coleóptero-praga em cereais armazenados;

- A utilização conjunta de terra de diatomácea e extratos de sementes de *A. mucosa*, em hexano, e de *A. montana*, em diclorometano, independentemente da concentração utilizada, ocasionam mortalidades equivalentes ou mesmo inferiores

quando estes são empregados isoladamente, o que demonstra efeito antagônico entre as duas técnicas;

- As frações em diclorometano e hidroálcool do extrato em hexano de *A. montana* e de *A. mucosa*, obtidas por partição líquido-líquido, apresentam efeito inseticida para *S. zeamais*, sem, contudo, haver diferença significativa entre ambas as frações de cada extrato;

- Há presença de alcalóides e acetogeninas nas frações bioativas de ambos os extratos fracionados. Assim, possivelmente, compostos de tais classes químicas podem estar relacionadas com a bioatividade observada.

REFERÊNCIAS

- ABULUDE, F.O.; OGUNKOYA, M.O.; OGUNLEYE, R.F.; AKINOLA, A.O.; ADEYEMI, A.O. Effect of palm oil in protecting stored grains from *Sitophilus zeamais* and *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Entomology**, London, v. 4, p. 393-396, 2007.
- ADAMS, J.M.; SCHULTEN, G.G.M. Losses caused by insects, mites and microorganisms. In: HARRIS, K.L; LINDBLAD, C.J. **Postharvest grain loss assessment methods**. Slough: England, 1976. p. 83-93.
- AGOSTINI, T.; CECCHI, H.; BARRERA-ARELLANO, D. Caracterização química da polpa e do óleo de marolo (*Annona coriaceae*). **Archives Latinoamericanas de Nutrición**, Caracas, v. 45, n. 3, p. 237-241, 1995.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: 02 ago. 2010.
- AKOB, C.A.; EWETE, F.K. Laboratory evaluation of bioactivity of ethanolic extracts of plants used for protection of stored maize against *Sitophilus zeamais* Motschulsky in Cameroon. **African Entomology**, Pretoria, v. 17, n. 1, p. 90-94, 2009.
- AKOB, C.A.; EWETE, F.K. The efficacy of four locally used plant materials against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in Cameroon. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 27, n. 1, p. 21-26, 2007.
- ALALI, F.Q.; XIAO-XI, L.; MCLAUGHLIN, J. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA, F.A.C.; PESSOA, E.B.; GOMES, J.P.; SILVA, A.S. Emprego de extratos vegetais no controle das fases imatura e adulta de *Sitophilus zeamais*. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 26, p. 46-53, 2005.
- ALVES FILHO, J.P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188 p.
- ALVES, L.F.A.; OLIVEIRA, D.G.P.; NEVES, P.M.O.J. Fatores que afetam a eficiência da terra de diatomácea no controle de adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 6, p. 716-722, 2008.
- AMADOR, M.C.P.; ESQUINCA, A.G.; ARGAEZ, A.G.; BRATOEFF, E.; LABASTIDA, C. Oil composition and flavonoid profiles of the seeds of three *Annona* species. **Phyton – International Journal of Experimental Botany**, Buenos Aires, v. 61, n. 1/2, p. 77-80, 1997.

ARANNILEWA, S.T.; EKRAKENE, T.; AKIINNEYE, J.O. Laboratory evaluation of four medicinal plants as protectants against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Mots). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 5, n. 21, p. 2032-2036, 2006.

ARTHUR, F.H. Immediate and delayed mortality of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) exposed on wheat treated with diatomaceous earth: effects of temperature, relative humidity, and exposure interval. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 37, p. 13-21, 2001.

ARTHUR, F.H.; THRONE, J.E. Efficacy of diatomaceous earth to control internal infestations of rice weevil and maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 510-518, 2003.

ASAWALAM, E.F.; HASSANALI, A. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucután, v. 6, p. 95-102, 2006.

ASHAMO, M.O.; ODEYEMI, O.O. Protection of maize against *Sitophilus zeamais* Motsch. using seed extracts from some indigenous plants. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berlin, v. 108, n. 3, p. 320-327, 2001.

ASMANIZAR, A.; DJAMIN, A.; IDRIS, A.B. Effect of selected plant extract on mortality of adult *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), a pest of stored rice grains. **Malaysia Applied Biology**, Bangi, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2008.

ATHANASSIOU, C.G.; KORUNIC, Z.; VAYIAS, B.J. Diatomaceous earths enhance the insecticidal effect of bitterbarkomycin against stored-grain insects. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 123-127, 2009.

ATKINS, E.L.; GERYWOOD, E.; MACDONALD, R.L. **Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees**. Laboratory studies. Davis: University of California, 1976. 36p.

ATUI, M.B.; LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N. Avaliação de metodologia para detecção de resíduos de terra de diatomáceas em grãos de trigo e farinha. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 11-16, 2003.

BANKS, H.J.; FIELDS, P.G. Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems. In: JAYAS, D.S., WHITE, N.D.G., MUIR, W.E. (Ed.). **Stored-Grain ecosystems**. Marcel Dekker: New York, 1994. p. 353-409.

BARNEY, R.J.; PRICE, B.D.; SEDLACEK, J.D.; SIDDIQUI, M. Fungal species composition a stored corn as influenced by several management practices and maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 14, n. 2, p. 159-164, 1995.

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.

BASKAR, K.; SASIKUMAR, S.; MUTHU, C.; KINGSLEV, S.; IGNACIMUTHU, S. Bioefficacy of *Aristolochia tagala* Cham. against *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, 2010. In press.

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

BLESSING, L.T.; CÔLOM, O.A.; POPICH, S.; NESKE, A.; BARDÓN, A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 83, p. 307-310, 2010.

BOGORNÍ, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 311-317, 2005.

BORELLA, J.C.; DUARTE, D.P.; NOVARETTI, A.A.G.; MENEZES JR, A.; FRANÇA, S.C.; RUFATO, C.B.; SANTOS, P.A.S.; VENEZIANI, R.C.S.; LOPES, N.P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.

BOTTON, M.; LORINI, I.; AFONSO, A.P.S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) danificando a cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 355-356, 2005.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society of London - Series B**, London, v. 26, p. 211-252, 1964.

BRANCO, P.C.; CASTILHO, P.C.; ROSA, M.F.; FERREIRA, J. Characterization of *Annona cherimola* Mill. seed oil from Madeira Island: a possible biodiesel feedstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 87, p. 429-436, 2010.

CABONI, P.; CABRAS, M.; ANGIONI, A.; RUSSO, M.; CABRAS, P. Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 50, p. 3491-3494, 2002.

CANEPELLE, M.A.B.; CANEPPELE, C.; LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 625-630, 2003.

CANEPELE, M.A.B.; ANDRADE, P.J.; SANTAELLA, A.G. Diferentes dosagens de pó inerte e temperaturas em milho armazenado para controle de gorgulho-do-milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 4, p. 343-347, 2010.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

CARVALHO, T. **Avaliação de extratos vegetais no controle de *Brevipalpus phoenicis* e *Olygonychus ilicis* (Acari: Tenuipalpidae: Tetranychidae) em cafeeiro**. 2008. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; DELGADO-HERRERA, M.A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucután, v. 12, p. 445-462, 2010.

CERUTI, F.C. **Rastreabilidade de grãos: conceito, desenvolvimento de software e estudos de casos de manejo de insetos no armazenamento**. 2007. 268 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CERUTI, F.C.; LAZZARI, S.M.N. Combination of diatomaceous earth and powder deltamethrin for insect control in stored corn. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 580-583, 2005.

CERUTI, F.C.; LAZZARI, S.M.N.; LAZZARI, F.A.; PINTO JÚNIOR, A.R. Eficácia de terra de diatomácea e temperatura para o controle do gorgulho-do-milho em milho armazenado. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2008.

CHANBANG, Y.; ARTHUR, F.H.; WILDE, G.E.; THRONE, J.E. Control of *Rhyzopertha dominica* in stored rough rice through a combination of diatomaceous earth and varietal resistance. **Insect Science**, Singapore, v. 15, n. 5, p. 455-460, 2008.

CHANG, F.R.; YANG, P.Y.; LIN, J.Y.; LEE, K.H.; WU, Y.C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, p. 437- 439, 1998.

CHAPMAN, R.F. **The Insects: Structure and function**. 4th .ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770 p.

CHEN, Y.Y.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, p. 904-906, 1996.

CLOYD, R.A. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? **Illinois Pesticide Review**, Illinois, v. 17, n. 3, p. 1-3, 2004.

COITINHO, R.L.B.C.; OLIVEIRA, J.V.; GONDIM JÚNIOR, M.G.C.; CÂMARA, C.A.G. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1492-1496, 2010.

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

CÓLOM, O.A.; NESKE, A.; CHAHBOUNE, N.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARDÓN, A. Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona montana*, as potent inhibitor of mitochondrial complex I. **Chemistry and Biodiversity**, Dallas, v. 6, p. 335-340, 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2009/2010 – Décimo Primeiro Levantamento (Agosto/2010)**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/8218897d1eb5849906fc53856bd4c894..pdf> > . Acesso em: 05 set. 2010.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drugs discovery. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 183-205, 2001.

CORREA, J.E.; BERNAL, H.Y. **Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello**. Bogotá: Guadalupe. 1989. v.1. 500 p.

COSIMI, S.; ROSSI, E.; CIONI, P.L.; CANALE, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 45, p. 125-132, 2009.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

COTTON, R.T.; WILBUR, D.A. Insects. In: CHRISTENSEN, C.M. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. 3rd ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1982. p. 281-318.

COVALLINO, M.; PELICANO, A.; GIMÉNEZ, R. Actividad inseticida de *Ricinus communis* L. sobre *Plodia interpunctella* Hbn. (Lepidoptera: Phycitinae). **Revista FCA UNCuyo**, Mendoza, v. 38, n. 1, p. 13-18, 2006.

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

CUNHA, U.S.; 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.

DA ROCHA, A.I.; LUZ, A.I.R.; RODRIGUES, W.A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. III – Annonaceae. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 11, p. 537-546, 1981.

DANHO, M.; GASPAR, C.; HAUBRUGE. The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 259-266, 2002.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7, p. 21-25, 1998.

DEMISSIE, G.; TESHOME, A.; ABAKEMAL, D.; TADESSE, A. Cooking oils and “Triplex” in the control of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 173-178, 2008.

DIX, D.E.; ALL, J.N. Interactions between maize weevil (Coleoptera: Curculionidae) infestations and infection by *Aspergillus flavus* and other fungi in stored corn. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 22, p. 108-118, 1987.

DIXON, R.A.; STRACK, D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. **Phytochemistry**, New York, v. 62, p. 815-816, 2003.

DUNKEL, F.V. The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 227-244, 1988.

DUPCHAK, L.M.; LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N. Efeito de diferentes dosagens de pós inertes no controle de *Sitophilus* spp. (Col.: Curculionidae) e *Rhizopertha dominica* (Col.: Bostrichidae) em sementes de milho armazenadas. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., 1996, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1996. p.284.

EPIDI, T.T.; NWANI, C.D.; UDOH, S. Efficacy of some plant species for the control of cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, p. 588-590, 2008.

ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 217-222, 2006.

EVANS, D.E. The biology of stored product Coleoptera. In: AUSTRALIAN DEVELOPMENT ASSISTANCE COURSE ON THE PRESERVATION OF STORED CEREALS, 1., 1981, Canberra. **Proceedings...** Canberra: CSIRO, 1981. p. 149-185.

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2007. Disponível em: <www.fao.org.br/organicag>. Acesso em: 15 jul. 2008.

FARONI, L.R.D'A. Manejo das pragas dos grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 17, n. 1/2, p. 36-43, 1992.

FAZOLIN, M.; COSTA, C.R.; DAMACENO, J.E.O.; ALBUQUERQUE, E.S.; CAVALCANTE, A.S.S.; ESTRELA, J.L.V. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 1-6, 2010.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Atividade inseticida do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 4, p. 599-603, 2007.

FERRI, P.H. Química de produtos naturais: Métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1996. p. 129-156.

FIELDS, P.G. Diatomaceous earth: Advantages and limitations. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTION, 7., 1998. Beijing. **Proceedings...** Beijing, China, 1998.p. 25-28.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 23, p. 213-226, 2008.

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

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ALVES, S.B.; ZUCCHI, R.A.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2 ed. São Paulo: Ed. Agrônômica Ceres, 2002. 649 p.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M.E.; CROTEAU, R.B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, p. 205-214, 2000.

GNOATTO, S.C.B.; BASSAN, V.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil., Aquifoliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GOLOB, P. Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored product insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 33, p. 69–79, 1997.

GOLOB, P.; KILMINSTER, A. The biology and control of *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 95-101, 1982.

GOMEZ, L.A.; RODRIGUEZ, J.G.; PONELEIT, C.G.; BLAKE, D.F.; SMITH JUNIOR, C.R. Relationship between some characteristics of the corn kernel pericarp and resistance to the rice weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 76, p. 797-800, 1983.

GOVINDACHARI, T.R. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). **Current Science**, Bangalore, v. 63, p. 117-122, 1992.

GUEDES, N.M.P.; GUEDES, R.C.; CAMPBELL, J.F.; THRONE, J.E. Contest behaviour of maize weevil larvae when competing within seeds. **Animal Behaviour**, London, v. 79, n. 2, p. 281-289, 2010.

GUEDES, R.N.C.; LIMA, J.O.G.; SANTOS, J.P.; CRUZ, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Product Research**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 145-150, 1995.

HALSTEAD, D.G.H. The separation of *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera Curculionidae), with a summary of their distribution. **Entomologist's Monthly Magazine**, Oxford, v. 99, p. 72-74, 1963.

HILL, D.S. **Pest of stored products and their control**. Boca Raton: CRC, 1990. 274 p.

HOWLADER, A.J.; MATIN, A.S.M.A. Observations on the pre-harvest infestation of paddy by stored grain pests in Bangladesh. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.24, n.4, p.229-231, 1988.

HUANG, Y.; HO, S.H. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldhyde against grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 34, p. 11-17, 1998.

HUANG, Y.; TAN, J.M.W.; KINI, R.M.; HO, S.H. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, p. 289-298, 1997.

ISLAM, M.F.; HASAN, M.M.; LEI, C.; MUCHA-PELZER, T.; MEWIS, I.; ULRICH, C. Direct and admixture toxicity of diatomaceous earth and monoterpenoids against the storage pests *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Sitophilus oryzae* (L.). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 83, n. 2, p. 105-112, 2010.

ISMAN, M.B. 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.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 25, p. 339-44, 1997.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASAN, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, 1989. p.1-10.

JBILLOU, R.; ENNABILI, A.; SAVAH, F. Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 5, n. 10, p. 936-940, 2006.

JOHNSON, H.A.; OBERLIES, N.H.; ALALI, F.Q.; MCLAUGHLIN, J.L. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: CUTLER, S.J.; CUTLER, H.G. (Ed.). **Biologically active natural products: pharmaceuticals**. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000. p. 173-184.

KAVALLIERATOS, N.G.; ATHANASSIOU, C.G.; PASHALIDOU, F.G.; ANDRIS, N.S.; TOMANOVIC, Z. Influence of grain type on the insecticidal efficacy of two diatomaceous earth formulations against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera:Bostrychidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, p. 660-666, 2005.

KIM, S.I.; ROH, J.Y.; KIM, D.H. Insecticidal activities of aromatic plant extract and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, p.102-107, 2002.

KLOKE, J.A. Natural plant compounds useful in insect control. In: WALTER, G.R.(Ed.). **Allelochemicals: Role in agriculture and forestry**. Washington: American Chemical Society 1987. p. 396-415. (American Chemical Society Symposium Series, 330).

KOONA, P.; BOUDA, B. Activity of 2,4,5-trimethoxystyrene from *Pachypodanthium staudtii* against two stored product pests. **Tropical Science**, London, v. 44, n. 3, p. 120-123, 2004.

KORUNIC, Z. Diatomaceous earth: a group of natural insecticides. **Journal of Stored Product Research**, Oxford, v. 34, p. 87-98, 1998.

KOTKAR, H.M.; PRASHANT, S.M.; SANGEETHA, V.G.S.S.; SHIPRA, R.J.; SHRIPAD, M.U.; MAHESHWARI, V.L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 58, p. 33-37, 2001.

KOUNINKI, H.; HANCE, T.; NOUDJOU, F.A.; LOGNAY, G.; MALAISSE, F.; NGASSOUM, M.B.; MAPONGMETSEM, P.M.; NGAMO, L.S.T.; HAUBRUGE, E. Toxicity of some terpenoids of essential oils of *Xylopi aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, p. 269-274, 2007.

KUO, R.Y.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; TENG, C.M.; YEN, H.F.; WU, Y.C. Antiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, New York, v. 57, p. 421-425, 2001.

KUO, R.Y.; CHEN, C.Y.; LIN, A.S.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. A new phenanthrene alkaloid, romucosine I, from *Rollinia mucosa* Baill. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 59, p. 334-336, 2004.

LADISCH, R.K.; SUTER, H.; FROIO, G.H. Sweat gland carcinoma produced in mice by insect quinines. **The Journal of Pennsylvania Academy of Science**, Easton, v. 42, p. 87-89, 1968.

LAGUNES, A. **Extractos de polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia**. México: Colegio de Postgraduados/USAID/CONACYT/BORUCONSA, 1994. 35p.

LAJIDE, L.; ESCOUBAS, P.; MIZUTANI, J. Antifeedant activity of metabolites of *Aristolochia albida* against the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 41, p. 669-673, 1993.

LAZZARI, S.M.N.; LAZZARI, F.A. Insetos-praga de grãos armazenados. In: PANIZZU, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p.667-732.

LEATEMIA, J.A.; ISMAN, M.B. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 31, n. 1, p. 30-37, 2004a.

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, New York, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.

LeORA SOFTWARE. **Poloplus 1.0**: probit and logit analysis. Berkeley, 2003. 1 CD-ROM.

LIAW, C.C.; CHANG, F.R.; WU, Y.C.; WANG, H.K.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K. F.; LEE, K.H. Montacin and *cis*-montacin, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, p. 1804-1008, 2004.

LIAW, C.C.; CHANG, F.R.; CHEN, S.L.; WU, C.C.; LEE, K.H.; WU, Y.C.; Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 13, p. 4767-4776, 2005.

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, Z.L.; GOH, S.H.; HO, S.H. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 43, p. 290-296, 2007.

LLANOS, C.A.H.; ARANGO, D.L.; GIRALDO, M.C. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Annonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Santafe de Bogota, v. 34, n. 1, p. 76-82, 2008.

LOECK, A.E. **Pragas de produtos armazenados**. Pelotas: EGUFPEL, 2002. 113p.

LONGSTAFF, B.C. The manipulation of the population growth of a pest species: an analytical approach. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 727-736, 1981.

LOPES, D.C.; FONTES, R.A.; DONZELE, J.L.; ALVARENGA, J.C. Perda de peso e mudanças na composição química do milho (*Zea mays*, L.) devido ao carunchamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 17, n. 4, p. 367-371, 1988.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo: EMBRAPA/CNPQ, 1998. 52p.

LORINI, I. **Pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 60p.

LORINI, I. **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 80p.

LORINI, I. **Produto natural à base de terra de diatomáceas para o controle das pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 8p.

LORINI, I.; FERREIRA FILHO, A.; BARBIERI, I.; DEMAMAN, N.A.; MARTINS, R.R.D. Terra de diatomáceas como alternativa no controle de pragas de milho armazenado em propriedade familiar. **Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Porto Alegre,

v. 2, n. 4, p. 32-36, 2001.

LORINI, I.; MÓRAS, A.; BECKEL, H. **Efeito de pós inertes no controle de pragas de grãos de trigo armazenado**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 30p.

LORINI, I.; SCHENEIDER, S. **Pragas dos grãos armazenados**: resultados de pesquisa. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1994. 47p.

LUO, X.; MA, Y.; WU, S.; WU, D. Two novel azadirachtin derivatives from *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, n. 7, p. 1022-1024, 1999.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; AMÓRA, S.S.A. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010.

MAIRESSE, L.A.S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005. 326 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 15 jul 2008.

MAREDIA, K.M.; SEGURA, O.L.; MIHM, J.A. Effects of neem, *Azadirachta indica* on six species of maize insect pests. **Tropical Pest Management**, Basingstoke, v. 38, p. 190-195, 1992.

MARSARO JÚNIOR, A.L.; MOURÃO JÚNIOR, M.; PAIVA, W.R.S.C.; BARRETO, H.C.S. Eficiência da terra de diatomácea no controle de *Sitophilus zeamais* em milho armazenado. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2007.

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

MARTINEZ, S.S.; VAN EMDEN, H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 113-125, 2001.

MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola – revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 20-32, 2002.

MARTINS, T.Z.; OLIVEIRA, N.C. Controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) no milho pipoca (*Zea mays* L.) tratado com terra de diatomácea. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 1, n. 2, p. 79-85, 2008.

MAZZONETTO, F. **Efeito de genótipos de feijoeiro e de pós de origem vegetal sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) e *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Col.: Bruchidae)**. 2002. 134 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MAZZUFERI, V.E.; GONÇALVEZ, M.; TABLADA, M.; GARCÍA, D. Efectividad e persistencia de la tierra de diatomeas en el control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) en semillas de maíz y su incidencia sobre la calidad. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, Madrid, v. 32, p. 363-371, 2006.

MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205).

MESSIANO, G.B.; VIEIRA, L.; MACHADO, M.B.; LOPES, L.M.X.; DE BORTOLI, S.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatilis*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 56, p. 2655-2659, 2008.

MEWIS, I.; ULRICH, C. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 153-164, 2001.

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

MOOTOO, B.S.; ALI, A.; KHAN, A.; REYNOLDS, W.F.; MCLEAN, S. Three novel monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, p. 807-811, 2000.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 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 Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; BARBOSA, L.C.A.; GUEDES, R.N.C.; CAMPOS, M.R.; SILVA, G.A.; MARTINS, J.C. Plant compounds insecticide activity against Coleoptera pests of stored products. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 909-915, 2007.

MORENO-MARTINEZ, E.; JIMENÉZ, S.; VÁZQUEZ, M.E. Effect of *Sitophilus zeamais* and *Aspergillus chevalieri* on the oxygen level in maize stored hermetically. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 25-36, 2000.

MOUND, L. **Common insect pests of stored food products**. 7th ed. London: British Museum Natural History, 1989. 68p. (Economic Series, 15)

MULLA, M.S.; TIANYUN, S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 15, n. 2, p. 133-152, 1999.

MURATA, M.; IMAMURA, T.; MIYANOSHITA, A. Infestation and development of *Sitophilus* spp. in pouch-packaged spaghetti in Japan. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 101, n. 3, p. 1006-1010, 2008.

NARDON, C.; NARDON, P. New characters to distinguish larvae and adults of the two sibling species: *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Mots. (Coleoptera, Dryophthoridae). **Annales de la Société Entomologique de France**, Paris, v. 38, n. 3, p. 239-246, 2002.

NASCIMENTO, I.R.; MURATA, A.T.; DE BORTOLI, S.; LOPES, L.M.X. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatilis* larvae. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, p. 413-416, 2003.

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

NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 45, p. 212-214, 2009.

NGUEMTCHOUIN, M.M.G.; NGASSOUM, M.B.; NGAMO, L.S.T.; GAUDU, X.; CRETIN, M. Insecticidal formulation based on *Xylopi aethiopica* essential oil and kaolinite clay for maize protection. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 985-991, 2010.

OBENG-OFORI, D.; ALMITEYE, S. Efficacy of mixing vegetable oil with pirimiphos-methyl against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Mostchulsky in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41, p. 57-66, 2005.

OBENG-OFORI, D.; REICHMUTH, C.; BEKELE, J.; HASSANALI, A. Biological activity of 1,8-cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored products beetles. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 121, p. 237-243, 1997.

OCAMPO, D.; OCAMPO, R. Bioactividad de la familia Annonaceae. **Revista Universidad de Caldas**, Caldas, p. 135-155, 2006.

ODALO, J.O.; OMOLO, M.O.; MALEBO, H.; ANGIRA, J.; NJERU, P.M.; NDIEGE, I.O.; HASSANALI, A. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. **Acta Tropica**, Basel, v. 95, p. 210-218, 2005.

ODEYEMI, O.O.; MASIKA, P.; AFOLAYAN, A.J. Insecticidal activities of essential oil from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). **African Entomology**, Pretoria, v. 16, n. 2, p. 220-225, 2008.

OGENDO, J.O.; BELMAIN, S.R.; DENG, A.L.; WALKER, D.J. Efficacy of *Lantana camara* L. and *Tephrosia vogelii* Hook against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in stored maize grains. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 679, p. 137-143, 2005.

OGUNLEYE, R.F.; ADEFEMI, S.O. Evaluation of the dust and methanol extracts of *Garcinia kolae* for the control of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Sitophilus zeamais* (Mots). **Journal of Zhejiang University Science B**, Munique, v. 8, n. 12, p. 912-916, 2007.

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

OJI, O. Use of *Piper guineense* in the protection of stored *Zea mays* against the maize weevil. **Fitoterapia**, Milano, v. 62, p. 179-182, 1991.

OKELANA, F.A.; OSUJI, F.N.C. Influence of relative humidity at 30°C on the oviposition, development, and mortality of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) in maize kernels. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 3-9, 1985.

OLIVEIRA, B.H.; SANT'ANA, A.E.; BASTOS, D.Z. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochemical Anal**, Lisboa, v. 13, p. 368-371, 2002.

OLIVEIRA, E.E. **Competição entre populações de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera:Curculionidae) resistente e suscetível a piretróides**. 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

OLIVEIRA, T.A.; NUNEZ, C.V.; OLIVEIRA, R.B.; FONSECA, C.R.V. Avaliação do efeito agudo de solventes orgânicos sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Motschulski, 1855 (Coleoptera: Curculionidade). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010, Natal. **Anais ...Natal: SBE**, 2010. 1 CD-ROM.

PENG, W.K.; LIN, H.C.; WANG, C.H. DNA identification of two laboratory colonies of the weevils, *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in Taiwan. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 225-235, 2003.

PEREIRA, P.R.V.S.; ALMEIDA, L.M. Chaves para a identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados com produtos armazenados. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 271-283, 2001.

PETERSON, C.; COATS, J. Insect repellents – past, present and future. **Pesticide Outlook**, Lisboa, p. 154-158, 2001.

PICANÇO, M.C.P.; SEMEÃO, A.A.; GALVÃO, J.C.C.; SILVA, E.M. Fatores de perdas em cultivares de milho safrinha. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 161-167, 2004.

PINTO JÚNIOR, A.R.; LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N.; CERUTI, F.C. Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2103-2108, 2008.

PINTO JUNIOR, A.R.; PEREIRA, P.R.V.S.; LAZZARI, F.A. Avaliação de pós inertes na manutenção da qualidade de grãos de milho armazenado por 270 dias. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., 1996. Londrina, **Resumos...**Londrina: IAPAR, 1996. p.302.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, N.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61, 2002.

PINTO, C.F.; TRONCOSO, A.J.; URZÚA, A.; NIEMEYER, H. Aristolochic acids affect the feeding behaviour and development of *Battus polydamas archidamas* larvae (Lepidoptera: Papilionidae: Troidini). **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 106, p. 357-361, 2009.

PITTA, R.M. **Bioatividade de extratos orgânicos de meliáceas e óleos essenciais de piperáceas sobre *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae)**. 2010. 101 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

POTENZA, M.R.; JUSTI JÚNIOR, J.; ALVES, J.N. Evaluation of contact activities of plant extracts against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, 2006, Campinas. **Proceedings...**Campinas: Abrapos, 2006. p. 811-815.

PRIMO YUFERA, E. Los métodos no contaminantes de la lucha contra las plagas van a provocar un cambio en los tratamientos. **Phytoma España**, Madrid, v. 5, p. 4, 1989.

PROCTOR, D.L. An additional aedeagal character for distinguishing *Sitophilus zeamais* Motsch. from *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 6, p. 351-352, 1971.

RAO, N.S.; SHARMA, K.; SHARMA, R.K. Antifeedant and growth inhibitory effects of seed extracts of custard apple, *Annona squamosa* against khapra beetle, *Trogoderma granarium*. **Journal of Agricultural Technology**, New Delhi, v. 1, p. 43-54, 2005.

REES, D.P. Coleoptera. In: SUBRAMANYAN, B.; HAGSTRUM, D.W. **Integrated management of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-39.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGENE, B.J.; VICENT, C. **Biopesticides d'origines végétales**. Paris: Tec & Doc (Ed.), 2002. 337 p.

RIBEIRO, B.M.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, E.E.; SANTOS, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Product Research**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 21-31, 2003.

RIBEIRO, L.P.; COSTA, E.C.; KARLEC, F.; BIDINOTO, V.M. Avaliação da eficácia de pós inertes minerais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 2, p. 19-27, 2008.

RODRÍGUEZ, D.A.; SÁNCHEZ, S. Polvos vegetales para el combate de *Sitophilus zeamais* Motsch. y *Zabrotes subfasciatus* Boh. en maíz y frijol. **Turrialba (Costa Rica)**, San Jose, v. 44, n. 3, p. 160-167, 1994.

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

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).

ROSSELLI, S.; MAGGIO, A.; PIOZZI, F.; SIMMONDS, M.S.J.; BRUNO, M. Extremely potent antifeedant neo-clerodane derivatives of scutecyprol A. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 52, p. 7867-7871, 2004.

ROSSETTO, C.J. O complexo de *Sitophilus* spp. no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 28, p. 127-148, 1969.

SALAMANCA, C.; JARAMILLO, M. C.; ARANGO, G. J.; LONDOÑO, M. E.; TOBÓN, J. A.; HENAO, A. Evaluación de la actividad biológica de extractos vegetales sobre *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (Col: Melolonthidae). **Actualidades Biológicas** 23, Medellin, v. 75, p. 5-11, 2001.

SANTOS, A.K.; FARONI, L.R.D.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, J.P.; ROZAZDO, A.F. Nível de dano econômico de *Sitophilus zeamais* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 273-279, 2002.

SANTOS, J.P. Perdas causadas por insetos em grãos armazenados. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1., 1993, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa/CNPT, 1993. p. 9-22.

SANTOS, J.P. Recomendação para o controle de pragas de grãos e sementes armazenadas. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993b. p. 197-233.

SANTOS, J.P.; FONTES, R.A. Armazenamento e controle de insetos no milho estocado na propriedade agrícola. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, p. 40-45, 1990.

SANTOS, J.P.; CRUZ, I.; FONTES, R.A. **Armazenamento e controle de pragas**. Brasília: EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas. 1984. 30 p. (Documentos, 1).

SANTOS, J.P.; FONTES, R.A.; CAJUEIRO, I.V.M.; BIANCO, R.; SEPULCRI, O.; LAZZARINI, F.; BEDANI, J.L. Determinação de perdas por insetos no milho armazenado em pequenas propriedades do estado do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16., 1986. Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1988. p.254-267.

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

SECOY, D.M.; SMITH, A.E. Use of plants in control of agricultural and domestic pests. **Economic Botany**, Bronx, v. 37, n. 1, p. 28-57, 1983.

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

SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.F.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A.H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, Lanhan, v. 31, n. 8, p.1149 -1166, 2005.

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

SIGHAMONY, S.; ANEES, I.; CHANDRAKALA, T.; OSMANI, Z. Efficacy of certain indigenous plant products as grain protectants against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopherta dominica* (F.). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 21-23, 1985.

SILVA, G.; LAGUNES, A.; RODRÍGUEZ, J. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago de Chile, v. 30, p. 153-160, 2003.

SILVA, G.; ORREGO, O.; HEPP, R.; TAPIA, M. Search for plants with insecticidal properties for *Sitophilus zeamais* control in stored corn. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 1, p. 11-17, 2005.

SILVA, M.A.S.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F.; MING, L.C. Composição e teor de óleo essencial de duas variedades botânicas de guaçatonga do cerrado e mata. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 44., 2004, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: Editora UNIDERP, 2004.

SILVA-AGUAYO, G.; GALLO, R.H.; VARGAS, M.T.; RUIZ, F.O.; BUSTOS, P.C.; FIGUEIROA, G.B. Evaluación de boldo (*Peumus boldus* Molina) y cal para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Agrociencia**, Chapingo, v. 40, p. 219-228, 2006.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 7. ed., Wiley, 2005. 326p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 173p.

SIMÕES, R.O.; TEIXEIRA, M.M.; FARONI, L.R.D. Determinação da uniformidade de distribuição de agroquímicos em grãos de trigo utilizando a técnica da espectrofotometria do UV/Visível. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 130-134, 2009.

SINHA, R.N. Effects of stored-product beetle infestation on fat acidity, seed germination, and microflora of wheat. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 76, p. 813-817, 1983.

SMIDERLE, O.J.; CICERO, S.M. Tratamento inseticida e qualidade de sementes de milho durante o armazenamento. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1245-1254, 1999.

SMIDERLE, O.J.; SANTOS FILHO, B.G.; SANTOS, D.S.B.; LOECK, A.E.; SILVA, J.B. Qualidade física e fisiológica de sementes de arroz irrigado, submetidas ao ataque de insetos durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 1-8, 1997.

SOUZA, A.P.; MARQUES, M.R.; MAHMOUD, T.S.; CAPUTO, B.A.; CANHETE, G.M.; LEITE, C.B.; LIMA, D.P. Bioprospecting insecticidal compounds from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 22, n. 4, p. 1136-1140, 2008.

STATHERS, T.E.; DENNIFF, M.; GOLOB, P. The efficacy and persistence of diatomaceous earths admixed with commodity against four tropical stored product beetle pests. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 40, p. 113-143, 2004.

STEFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E.L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia oblecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *oblecta*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

SUBRAMANYAM, B.; ROESLI, R. Inert dusts. In: SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. (Eds.). **Alternatives to pesticides in stored-product IPM**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000, p.321-380.

SUKUMAR, K.; PERICH, J.M.; BOOBAR, R.L. Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 7, p. 210-237, 1991.

TAKEMATSU, A.P. **Suscetibilidade de *Sitophilus zeamais* Mots, 1855 (Coleoptera-Curculionidae) de diferentes regiões do Estado de São Paulo, a inseticidas fosforados e piretróides em condições de laboratório**. 1983. 77 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Piracicaba, Piracicaba, 1983.

TAPONDJOU, A.L.; ADLER, C.; FONTEM, D.A.; BOUDA, H.; REICHMUTH, C. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* Du Val. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41, p. 91-102, 2005.

TATSADJIEU, N.L.; YAOUBA, A.; NUKENINE, E.N.; NGASSOUM, M.B.; MBOFUNG, C.M.F. Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 186-190, 2010.

TAVARES, M.A.G.C. **Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Col: Curculionidae).** 2002. 59 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.

TAVARES, M.A.G.C. **Busca de compostos em *Chenopodium* spp. (Chenopodiaceae) com bioatividade em relação a pragas de grãos armazenados.** 2006. 112 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

TAVARES, M.A.G.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 319-323, 2005.

TIGAR, B.J.; OSBORNE, P.E.; KEY, G.E.; FLORES, M.E.; VASQUEZ, A. Insect pests associated with rural maize stores in Mexico with particular reference to *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 267-281, 1994.

TORMO, J.R.; GALLARDO, T.; GONZÁLEZ, M.C.; BERMEJO, A.; CABEDO, N.; ANDREU, I.; ESTORNELL, E. Annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Current Topics in Phytochemistry**, Trivandrum, v. 2, p. 69-90, 1999.

TORRECILLAS, S.M.; VENDRAMIM, J.D. Extratos aquosos de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 27-31, 2001.

TREMATERRA, P. Preferences of *Sitophilus zeamais* to different types of Italian commercial rice and cereal pasta. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 62, n. 1, p. 103-106, 2009.

UKEH, D.A.; ARONG, G.A.; OGBAN, E.I. Toxicity and oviposition deterrence of *Piper guineense* (Piperaceae) and *Monodora myristica* (Annonaceae) against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) on stored maize. **Journal of Entomology**, London, v. 5, n. 4, p. 295-299, 2008.

ULRICHS, C.; MEWIS, I. Controlling the stored product pests *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum* by contaminating rice with neem and diatomaceous earth. **Anzeiger für Schädlingskunde**, Berlin, v. 73, p. 37-40, 2000.

VAN BEEK, T.A.; BRETELIER, H. **Phytochemistry and agriculture**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 245p.

VAYIAS, B.J.; ATHANASSIOU, C.G.; KORUNIC, Z.; ROZMAN, V. Evaluation of natural diatomaceous earth deposits from south-eastern Europe for stored-grain protection: the effect of particle size. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, p. 1118-1123, 2009.

VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. (Org.) **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: Pallotti, 2000. 234p. p.113-128.

VENDRAMIM, J.D.; BOGORNÍ, P.C. Atividade inseticida em plantas da família Meliaceae. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., 2002. Manaus. **Palestras...** Manaus: SEB, 2002. 1 CD-ROM.

VENDRAMIM, J.D.; NAKANO, O.; PARRA, J.R.P. **Pragas dos produtos armazenados**. Curso de Entomologia aplicado à agricultura. Manual de curso à distância. Piracicaba: FEALQ, 1992. 760p.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIEIRA, L.; DE PASCOLI, I.; DE BORTOLI, S.A.; LOPES, L.M.X. Efeito de extratos de *Aristolochia lagesiana* (Aristolochiaceae) sobre a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 245-250, 2009.

VILEGAS, W.; FELICIO, J.D.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, H.E. Diterpenic adducts from *Xylopi* species. **Phytochemistry**, New York, v. 30, p. 1869-1872, 1991.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X.C.; SMILLIE, T.A.; GUO, D.A.; KHAN, I.A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, p. 404-407, 2009.

YANG, F.L.; LIANG, G.W.; XU, Y.J.; LU, Y.Y.; ZENG, L. Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 46, p. 118-123, 2010.