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

**Perspectiva do emprego de limonoides do nim (*Azadirachta indica*) no
controle comportamental de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**

Márcio Alves Silva

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

Márcio Alves Silva
Engenheiro Agrônomo

Perspectiva do emprego de limonoides do nim (*Azadirachta indica*) no controle comportamental de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

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

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Silva, Márcio Alves

Perspectiva do emprego de limonoides do nim (*Azadirachta indica*) no controle comportamental de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) / Márcio Alves Silva. - - Piracicaba, 2014.

96 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Fruticultura 2. Agroecologia 3. Produtos naturais 4. Aleloquímicos
5. Manipulação comportamental 6. Moscas-das-frutas I. Título

CDD 632.774
S586p

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

À família Silva:

José (Pai), Jacy (Mãe), Márcia (Mana), Antonio Carlos (cunhado), Delmacio (primo), Melissa e Carlos (sobrinhos), por acreditarem em mim incondicionalmente.

Agradeço e ofereço.

À Gerane Celly Dias Bezerra Silva e Laís Bezerra Silva.

Vocês fazem o meu sonho virar verdade.

Dedico.

Toda grande história tem mais de um protagonista (Ricardinho).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e guiar meu caminho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Universidade de São Paulo), pela oportunidade propiciada e pelas condições oferecidas. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos, orientações e, sobretudo pelo exemplo de profissionalismo.

A maior prova do apreço e gratidão que eu tenho pelo Prof. Dr. José Djair Vendramim se resume na minha insistência em tê-lo como orientador. A escolha de um orientador competente é um aspecto vital para a formação de um jovem cientista. Prof. Djair, cabe aqui ressaltar que na minha perspectiva o termo ex-orientador não se aplica e que um orientador deve ser levado por toda uma carreira. Obrigado pela oportunidade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas da ESALQ/USP: Ana Paula, Angelina, Cia, Cristina, Eliane, Elton, Fátima, Gabriel, Kaira, João, Leandro, Marcos, Mônica, Paulo, Rafael, Sheila e Thiago, pela amizade e experiências compartilhadas.

Aos amigos e colegas do vibrante grupo de pesquisa do Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP, onde considero que fui agregado. A todos os demais amigos e colegas da ESALQ/USP, principalmente aqueles com quem fiz disciplinas ou simplesmente sorrimos juntos.

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

Ao Prof. Dr. Moacir Forim e ao doutorando Israel Gil de Sá, do Departamento de Química da UFSCAR, pela colaboração na execução desse trabalho.

Aos companheiros da Biofábrica Moscamed Brasil, com especial referência para o amigo Erivaldo Alves dos Santos.

À Fazenda Santana, especialmente ao sócio-proprietário Gabriel Santana, pela amizade e por acreditar e oportunizar a realização dos experimentos em campo.

Aos amigos que dividiram em muitas ocasiões os finais de semana conosco auxiliando na execução e redação deste projeto: Mariana, Carla, Thiago, Mônica e Javier.

À UESPI – Universidade Estadual do Piauí, por me conceder a oportunidade de realizar meu doutorado e, sobretudo, por me conceder o espaço físico para execução deste trabalho.

Aos colegas da UESPI, discentes, professores e funcionários, que direta ou indiretamente me acompanharam nesta importante etapa da minha vida.

Aos orientados, Kinno, Evandro, Domingas, Antonio Francisco, José Francisco, Jhonny, Lidia, Masciela, Helena, Daniela, Wemerson, Jardson, Francisco, Pedro, Glaucia, João, Euclides e Amanda, pelo convívio, dedicação, auxílio e companheirismo. Definitivamente a ajuda dessas pessoas foi de fundamental importância.

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

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

A todos os profissionais que dedicaram seu tempo para me ensinar, apoiar e orientar ao longo da minha trajetória.

Finalmente agradeço aos membros da minha família e aos amigos da vida que hoje formam minha grande família. Na verdade, o mais importante é saber que posso contar com vocês sempre.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos e um abraço.

Uma boa parte da ciência mais instigante acontece quando um cientista simplesmente escolhe um organismo e começa a se instruir sobre ele (Freeman; Herron, 2007).

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	18
 2 LIMIAR DE LIMONOIDES (AZAMAX [®]) CAPAZ DE EVITAR A INFESTAÇÃO POR <i>Ceratitis capitata</i> (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE).....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2. Material e Métodos.....	23
2.2.1. Criação dos insetos.....	23
2.2.2 Limonoides: azadiractina e o 3-tigloilazadiractol (AzaMax [®]).....	24
2.2.3 Etapa 1: limiar de limonoides (AzaMax [®]) em ensaios sem chance de escolha.....	26
2.2.4 Etapa 2: Limiar de limonoides (AzaMax [®]) em ensaio com chance de escolha.....	26
2.2.5 Análise dos dados.....	27
2.3 Resultados.....	28
2.4 Discussão.....	38
Referências.....	41
 3 LIMONOIDES (AZAMAX [®]) POSSUEM AÇÃO REPELENTE DE CONTATO SOBRE INSETOS: O CASO DE <i>Ceratitis capitata</i> (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE).....	47
Resumo.....	47
Abstract.....	47
3.1 Introdução.....	48
3.2. Material e Métodos.....	49
3.2.1. Insetos e limonoides.....	49
3.2.2 Etapa 1: observação visual da resposta comportamental de <i>Ceratitis capitata</i> aos limonoides (AzaMax [®]).....	50
3.2.3 Etapa 2: percepção dos limonoides (AzaMax [®]) na superfície do hospedeiro por <i>Ceratitis capitata</i>	50
3.2.4 Etapa 3: resposta comportamental de <i>Ceratitis capitata</i> após exposição dos quimiorreceptores aos limonoides (AzaMax [®]).....	51
3.2.5 Análise dos dados.....	52
3.3 Resultados.....	54
3.4 Discussão.....	63
Referências.....	67
 4 TESTE DE CAMPO DOS LIMONOIDES (AZAMAX [®]) CONTRA A INFESTAÇÃO DA MOSCAMED NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	71
4.1 Introdução.....	72
4.2 Material e Métodos.....	74
4.2.1 Insetos e limonoides.....	74
4.2.2 Caracterização da área de estudo.....	74
4.2.3 Teste de campo 1: proteção do parreiral de uva com limonoides (AzaMax [®]).....	76

4.2.4 Teste de campo 2: persistência da atividade biológica dos limonoides (AzaMax [®]) sobre <i>Ceratitis capitata</i>	78
4.2.5 Análise dos dados	78
4.3 Resultados.....	80
4.4 Discussão.....	90
Referências.....	93

RESUMO

Perspectiva do emprego de limonoides do nim (*Azadirachta indica*) no controle comportamental de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Visando contribuir para o manejo de moscas-das-frutas em parreirais de uva, inicialmente determinou-se, neste estudo, a concentração limiar dos limonoides azadiractina e 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) capaz de inibir completamente a oviposição de *Ceratitis capitata* em frutos de uva. Em seguida, foram averiguados os estímulos envolvidos na inibição da oviposição da praga pelos referidos limonoides. Posteriormente, avaliou-se a proteção do parreiral de uva pelos limonoides contra *C. capitata* no polo de produção de Petrolina/PE, Brasil. Finalmente, foi avaliada a atividade biológica residual dos limonoides sobre a praga em parreiral de uva no polo de produção de Petrolina. A concentração limiar para a completa inibição da oviposição de *C. capitata* se dá com 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) na superfície de frutos de uva. A inibição da oviposição é drástica a partir de 50 ppm de azadiractina (+ 14,3 ppm de 3-tigloilazadiractol) em situação de chance de escolha do hospedeiro. A seleção hospedeira de *C. capitata* não é afetada por concentração igual ou inferior a 7,5 ppm de azadiractina (+ 2,14 ppm de 3-tigloilazadiractol) na superfície de frutos de uva. A concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) impede que o hospedeiro seja reconhecido pela praga em função dos estímulos que promovem a inquietação (irritação), locomoção e consequente dispersão da praga. Assim, os limonoides (AzaMax[®]) podem ser qualificados como repelentes com baixa capacidade de difusão. Os limonoides em alta concentração ocasionam mortalidade sobre *C. capitata*, porém não evitam que os cachos ou frutos de uva sejam injuriados e ou infestados por *C. capitata* numa condição de baixa população natural ou artificial em campo. As conclusões registradas corroboram a hipótese de que são necessárias mais investigações pormenorizadas para avaliação do efeito de limonoides do nim sobre *C. capitata* em campo. A perspectiva de controle comportamental de moscas-das-frutas utilizando limonoides do nim foi discutida, com especial referência para *C. capitata* em parreirais de uva.

Palavras-chave: Fruticultura; Agroecologia; Produtos naturais; Aleloquímicos, Manipulação comportamental; Moscas-das-frutas

ABSTRACT

Employment outlook of neem limonoids (*Azadirachta indica*) in the behavioral control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Aiming to contribute to the management of fruit flies in the vineyards, this research initially determined the concentration threshold of limonoids azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol (AzaMax[®]) able to completely inhibit oviposition of *Ceratitis capitata* in grape fruits. Then the stimuli involved in the inhibition of oviposition of *C. capitata* by these limonoids were investigated. Subsequently, we evaluated the vineyard protection by limonoids against fruit flies in the production pole of Petrolina - PE, Brazil. Finally, we evaluated the residual biological activity of limonoids on *C. capitata* in vineyard in the production pole of Petrolina. The threshold concentration for complete inhibition of oviposition of *C. capitata* is 100 ppm of azadirachtin (+ 28.5 ppm of 3-tigloylazadirachtol) on the surface of grape fruits. The inhibition of oviposition is drastic from 50 ppm of azadirachtin (+ 14.3 ppm of 3-tigloylazadirachtol) with free choice of the host. The host selection by *C. capitata* is not affected by concentration equal to or less than 7.5 ppm of azadirachtin (2.14 ppm of 3-tigloylazadirachtol) on the fruits surface. The threshold concentration of 100 ppm of azadirachtin (+ 28.5 ppm of 3-tigloylazadirachtol) prevents the host to be recognized by *C. capitata* depending of the stimuli that promote caring (irritation), locomotion and consequent dispersion of insect. Thus, the limonoids (AzaMax[®]) can be qualified as repellents with low diffusion capacity. The limonoids in high concentration (AzaMax[®]) cause mortality of *C. capitata*, but do not prevent the injury and or infestation on grape clusters by *C. capitata* in a condition of low natural or artificial population in the field. The findings reported support the hypothesis that more detailed assessment for the effect of neem limonoids on *C. capitata* in field investigations are necessary. The perspective of behavioral control of fruit flies using neem limonoids was discussed, with special reference to *C. capitata* in vineyards.

Keywords: Fruit growing; Agroecology; Natural products; Allelochemicals; Behavioral manipulation; Fruit flies

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura moderna possui como característica principal o uso de técnicas sofisticadas de produção, que periodicamente são renovadas objetivando a obtenção de produtos adequados ao mercado consumidor (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Entre os fatores que influem diretamente na produção e comercialização e que, se não forem devidamente considerados, irão reduzir a competitividade da fruticultura destaca-se o controle fitossanitário do pomar e a qualidade e segurança do produto (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Nesse contexto, o manejo de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) representa um fator crítico para o sucesso. As moscas-das-frutas atacam diretamente o produto final, reduzindo ou inviabilizando a comercialização da fruta para mesa e ou processamento. Os insumos utilizados para o manejo de moscas-das-frutas podem representar o componente mais significativo do custo de produção. A presença de moscas-das-frutas e seus respectivos métodos de controle são objeto de rigorosas normas internacionais impostas pelos países importadores. A aplicação de agrotóxicos visando ao manejo de moscas-das-frutas, quando não é realizado de forma racional, pode provocar desequilíbrios biológicos no ecossistema local e outros danos ambientais.

As moscas-das-frutas constituem um complexo de insetos que infestam um grande número de plantas, cultivadas ou silvestres, em várias regiões do mundo (CLARKE et al., 2005). A mosca-do-mediterrâneo (moscamed), *Ceratitis capitata* (Wied.), apresenta *status* de principal obstáculo à livre comercialização de frutas em escala mundial, tanto pelo risco de introdução da praga, como pela qualidade do alimento (ALUJA; MANGAN, 2008). No Brasil, a moscamed introduzida no país há cerca de 100 anos, é a espécie que possui maior notoriedade, sendo considerada a mais prejudicial, cosmopolita e invasora entre todos os tefritídeos (MALAVASI et al., 2000). A moscamed ocorria em baixa frequência no Nordeste brasileiro (MALAVASI et al., 1980), sendo inicialmente restrita às áreas urbanas (HAJI et al., 1991). Contudo, com o surgimento de plantações extensas de hospedeiros, houve um aumento expressivo da população de moscamed em áreas de produção do polo de fruticultura de Petrolina e Juazeiro (HAJI et al., 2005). O polo de Petrolina e Juazeiro é atualmente o maior produtor nacional de uvas finas de mesa, *Vitis vinifera* (L.), contribuindo com praticamente 100 % das exportações brasileiras dessa fruta. O controle da moscamed em áreas cultivadas com uvas finas de mesa atualmente é uma incógnita nessa região. A utilização de inseticidas sintéticos em iscas tóxicas não é possível devido ao fato de os atrativos registrados no país mancharem as bagas de uva. A aplicação de inseticidas em cobertura total representa um risco

para os trabalhadores. Além disso, os inseticidas podem causar a proliferação de pragas secundárias, eliminação de inimigos naturais e finalmente resultar na presença de resíduos no fruto, com possível perda de mercado internacional. No referido polo, *C. capitata* utiliza hospedeiros primários, tais como acerola (*Malpighia glabra* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.), cultivados no perímetro de irrigação próximo de áreas com uva. Após amadurecerem sexualmente, os adultos se dispersam pelos pomares e as fêmeas ovipositam nos frutos de uva, o que explica a concentração do dano e das capturas em armadilhas nas bordaduras dos pomares. Algumas evidências sugerem que a moscamed é capaz de colonizar diferentes cultivares de uva no polo Petrolina e Juazeiro (GÓMEZ et al., 2008). Apesar disso, ainda se acredita que nos parreirais de uva não existem populações de moscas residentes, devido à baixa adequação destas como hospedeiras e em função do manejo da videira em agroecossistemas tropicais, como no Brasil, onde os parreirais de uva são podados drasticamente duas ou três vezes por ano. A população registrada nos parreirais de uva provavelmente seja resultante da presença do inseto em pomares de outras espécies vegetais na circunvizinhança.

Nesse cenário, seria ideal a utilização de substâncias repelentes, estimulantes de locomoção, supressantes e ou deterrentes de oviposição, principalmente nas bordas do pomar. Alguns estudos com nim (*Azadirachta indica* A. Juss) têm demonstrado inibição da oviposição para tefritídeos (CHEN et al., 1996; SINGH; SINGH, 1998; SILVA et al., 2012), o que seria útil para essa cultura. O nim pertence à ordem Sapindales, subordem Rutinae, família Meliaceae, subfamília Melioideae, tribo Melieae (PENNINGTON; STYLES, 1975). A ordem Sapindales inclui plantas que são uma das fontes mais ricas e diversas de metabólitos secundários em Angiospermas (WATERMAN, 1993). Dentro de um amplo universo de classes de compostos com potencial inseticida encontrados em plantas dessa ordem, destacam-se os limonoides, substâncias amargas conhecidas como meliacinas ou tetranortriterpenoides. De diferentes partes da planta de nim já foram isolados vários compostos, dos quais cerca de 130 são limonoides (KANOKMEDHAKUL et al., 2005). O nim tem sido muito estudado quanto ao seu emprego no manejo integrado de pragas - MIP - e seus derivados têm se revelado tão potentes quanto os inseticidas comerciais (MORGAN, 2009). Os derivados são empregados na forma de pós, extratos, óleo ou torta, uma vez que a síntese dos limonoides para o MIP é inviável economicamente em função da complexidade dessas moléculas. Por exemplo, a síntese da azadiractina, o limonoide com maior potencial para o MIP, foi realizada por meio de 71 passos e rendimento de 0,00015% (VEITCH et al., 2007).

Do ponto de vista de sua utilização, algumas características específicas do nim o tornam bastante promissor para uso no controle de pragas: a planta não precisa ser destruída para se obterem os derivados; possui uma multiplicidade de compostos; a concentração dos compostos ativos é alta; os compostos são solúveis em água, são fáceis de extrair e com baixo custo; os compostos são, de modo geral, mais tóxicos às pragas do que aos inimigos naturais; os produtos são praticamente inócuos ao ambiente e ao homem e são totalmente biodegradáveis (MARTINEZ, 2011). Porém, a baixa persistência dos derivados do nim no ambiente é hoje um grande entrave para sua utilização em larga escala. Essa é uma característica inerente a todos os compostos naturais, por sofrerem rápida biodegradação, motivo pelo qual os inseticidas vegetais foram substituídos pelos sintéticos no passado (ISMAN; GRIENEISEN, 2013). Assim, há duas grandes barreiras ao setor de inseticidas botânicos, como o nim, que precisam ser vencidas. Primeiramente, há necessidade de pesquisa e desenvolvimento de produtos estáveis e padronizados, com tempo de ação prolongado em campo e mantendo sua baixa toxicidade ao homem e aos organismos não alvo (FORIM et al., 2010; MIRESMAILLI; ISMAN, 2014). Em segundo, há necessidade de técnicas de enriquecimento e controle de qualidade nos produtos a serem disponibilizados no comércio assegurando a reprodutibilidade de sua eficácia inseticida (FORIM et al., 2010; MIRESMAILLI; ISMAN, 2014). Diante do exposto, propõem-se:

1. Estabelecer uma concentração limiar do AzaMax[®] capaz de inibir completamente a oviposição das moscas-das-frutas, utilizando a azadiractina e o 3-tigloilazadiractol como limonoides marcadores;
2. Caracterizar o efeito comportamental da azadiractina e do 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) sobre *C. capitata*;
3. Averiguar a proteção do parreiral por azadiractina e 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) contra *C. capitata* abordando a estratégia de manipulação comportamental.
4. Avaliar a atividade biológica residual da azadiractina e do 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) sobre *C. capitata* numa condição de campo.

Referências

- ALUJA, M.; MANGAN, R.L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual and methodological considerations. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 449-472, 2008.
- BUAINAIN, A.M.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva de frutas**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, Brasília, 2007. 102p.
- CHEN, C.; DONG, Y.; CHENG, L.; HOU, R.F. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in guava. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 462-466, 1996.
- CLARKE, A.R.; ARMSTRONG, K.F.; CARMICHAEL, A.E.; MILNE, J.R.; RODERICK, G.K.; YEATES, D.K. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation : The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 293-319, 2005.
- FORIM, M.R.; DA SILVA, M.F.G.F.; CASS, Q.B.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. **Analytical Methods**, London, v. 2, p. 860-869, 2010.
- GÓMEZ, M.; PARANHOS, B.A.J.; DAMASCENO, I.; CASTRO, R.; CAMPOS, D.; ANDRADE, K.; SILVA, M.A.; NASCIMENTO, A.S.; MALAVASI, A. Biología de la mosca del mediterráneo, *Ceratitidis capitata* Wiedemann (Díptera: Tephritidae) en dos variedades de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) en el nordeste brasileño. **Revista CitriFrut**, Havana, v. 25, p. 18-23, 2008.
- HAJI, F.N.P.; NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S.; COUTINHO, C.C. Ocorrência e índice de infestação de moscas-das-frutas (Tephritidae) na região do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, p. 205-209, 1991.
- HAJI, F.N.P.; PARANHOS, B.A.J.; MIRANDA, I.G.; BARBOSA, F.R.; SOUZA, A.M. Monitoramento de moscas-das-frutas no Submédio do Vale do São Francisco. In: MENEZES, E.A.; BARBOSA, F.R. (Ed.). **Pragas da mangueira**: monitoramento, nível de ação e controle. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2005. p. 85-86.
- ISMAN, M.B.; GRIENEISEN, M.L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 1, p. 1-6, 2013.
- KANOKMEDHAKUL, S.; KANIKMEDHAKUL, K.; PRAJUABSUK, T.; PANICHAJAKUL, S.; PANYAMEE, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, n. 7, p. 1047-1050, 2005.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J.S.; ZUCCHI, R.A. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). I. Lista de hospedeiros e ocorrência. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 9-16, 1980.

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

MARTINEZ, S.S. **O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2011. 205p.

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 19, p. 29-35, 2014.

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

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

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T. Inhibition of oviposition by neem extract: A behavioral perspective for the control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 333-337, 2012.

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

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

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

2 LIMIAR DE LIMONOIDES (AZAMAX[®]) CAPAZ DE EVITAR A INFESTAÇÃO POR *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)¹

Resumo

Neste estudo determinou-se a concentração limiar de limonoides capaz de inibir completamente a oviposição de *Ceratitis capitata* em frutos de uva cv. Itália. Para isso, foram realizados bioensaios sem e com chance de escolha pela praga. Os bioensaios sem chance de escolha (em número de três) foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado com 18 tratamentos [três densidades de insetos (uma, duas ou três fêmeas) x cinco concentrações de limonoides e um controle] e 20 repetições. A concentração de azadiractina variou de 1 a 1000 ppm (+ 0,3 a 285 ppm de 3-tigloilazadiractol). No bioensaio com chance de escolha foram expostos dois frutos por gaiola, um tratamento e um controle. Foram utilizadas três densidades de insetos (uma, duas ou três fêmeas) e 15 repetições. A concentração de azadiractina variou de 1 a 100 ppm (+ 0,3 a 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). Os bioensaios foram conduzidos a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. A inibição da oviposição de *C. capitata* foi concentração-dependente, com infestação presente nos menores níveis de azadiractina e 3-tigloilazadiractol, atingindo total inibição com concentrações a partir de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol), mantendo a proteção mesmo na maior densidade populacional (três fêmeas por fruto). Quando a praga tem chance de escolha, a inibição é severa a partir de 50 ppm de azadiractina (+ 14,3 ppm de 3-tigloilazadiractol), do que se pode concluir que a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) é capaz de evitar a infestação de frutos de uva. Essa concentração propicia uma proteção segura uma vez que em campo a densidade populacional de três fêmeas por fruto normalmente não ocorre e as moscas normalmente possuem grande chance de escolha.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas; Produtos naturais; Nim; Azadiractina; 3-tigloilazadiractol

¹Artigo aceito para publicação na revista Journal of Economic Entomology.

Abstract

This study identified the threshold concentration of limonoids for the complete inhibition of oviposition of *Ceratitis capitata* in grapes cv. Itália. Choice and no-choice experiments with the insect were performed. The three no-choice bioassays were conducted following a completely randomized design with 18 treatments [three densities of insects (one, two or three females) x five concentrations of limonoids and control] and 20 replicates. In a free choice bioassay, two fruits per cage (a treatment grape and a control) were provided for ovipositing. Three densities of insects (one, two or three females) were used, with 15 replicates. Bioassays were conducted at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity and a photoperiod of 14 h. The inhibition of oviposition of *C. capitata* was concentration-dependent, with infestation occurring at lower concentrations of azadirachtin (+ 3-tigloylazadirachtol) and complete inhibition occurring at concentrations at or exceeding 100 (+ 28.5) ppm, maintaining protective effects even at the most densely populated treatment (three females per fruit). When the pest had a free choice of host grapes (treatment vs. control), severe inhibition was observed at concentrations equal to or greater than 50 ppm of azadirachtin (+ 14.3 ppm of 3-tigloylazadirachtol). We conclude that the threshold concentration of 100 ppm of azadirachtin

(+ 28.5 ppm of 3-tigloylazadirachtol) is capable of preventing grape infestation. This concentration is likely to provide a reliable level of protection, as the experimental population density of three females per fruit usually does not occur in the field and wild flies usually have more host options.

Keywords: Fruit fly; Natural products; Neem; Azadirachtin; 3-tigloylazadirachtol

2.1 Introdução

A utilização de produtos obtidos da árvore de nim *Azadirachta indica* A. Juss (Sapindales: Meliaceae) começou a ter impacto comercial recentemente (KHATER et al., 2012). A segurança do meio ambiente é considerada o fator primordial para o emprego de limonoides do nim em campo. Os limonoides apresentam seletividade para vários predadores e parasitoides (MOMANYI et al., 2012), efeito reduzido sobre organismos polinizadores (AKCA et al., 2009) e mamíferos (RAIZADA et al., 2001; BOEKE et al., 2004). Estudos com limonoides do nim têm revelado efeitos sobre a metamorfose, reprodução, longevidade, capacidade de voo e oviposição das moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) (STEFFENS; SCHMUTTERER, 1983; STARK et al., 1990; ADÁN et al., 1998; van RANDEN; ROITBERG, 1998ab; DI ILIO et al., 1999; SINGH, 2003; KHAN et al., 2007; MAHMOUD, 2007; SILVA et al., 2011, 2012, 2013ab; ALVARENGA et al., 2012). Embora os limonoides do nim tenham baixo efeito tóxico letal sobre adultos (BARRY et al., 2005; EFROM et al., 2011; SILVA et al., 2013ab; SÁNCHEZ-RAMOS et al., 2013), eles reduzem a oviposição das fêmeas em frutos tratados, como demonstrado para *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (SINGH; SRIVASTAVA, 1983), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (SINGH; SRIVASTAVA, 1983; CHEN et al., 1996), *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (HIDAYAT et al., 2013) e *Anastrepha ludens* (Loew) (VALENCIA-BOTÍN et al., 2004). Além disso, o contato com limonoides não predispõe os tefritídeos à aprendizagem ou à habituação (CHEN et al., 1996; SILVA et al., 2012). Contudo, para o manejo de moscas-das-frutas a redução da oviposição não é suficiente para evitar a injúria e o presumível dano econômico (SILVA et al., 2012). Os tefritídeos ocasionam injúria com uma simples punctura e um único ovo viável colocado inviabiliza o fruto para processamento e, principalmente, para comercialização *in natura*. Como elemento de sustentação da eficácia agrônômica é preciso conhecer a concentração limiar de limonoides capaz de insensibilizar os frutos do ataque e infestação pelas moscas-das-frutas.

Nos estudos previamente referidos a concentração de limonoides dos derivados de nim não foi descrita (ver SINGH; SRIVASTAVA, 1983; CHEN et al., 1996; VALENCIA-BOTÍN et al., 2004; HIDAYAT et al., 2013). Somente recentemente foi demonstrado que o extrato

metanólico de folhas de nim com baixa concentração de azadiractina (0,01 a 0,03 ppm) também é capaz de reduzir a oviposição da mosca-do-mediterrâneo (moscamed) *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (SILVA et al., 2012). A eficácia agronômica dos derivados de nim é associada à presença de limonoides. A concentração dos limonoides depende da variabilidade genética de *A. indica*, da sazonalidade da produção de substâncias secundárias, da estrutura da planta utilizada (ex: sementes, ramos ou folhas) e do tipo de extração adotado. Em adição, a purificação do produto comercial usualmente prioriza a presença da azadiractina (FORIM et al. 2010, 2011). Atualmente existem duas barreiras principais para a indústria de biopesticidas à base de nim: baixa persistência no ambiente e ausência de padronização em relação à reprodutibilidade da eficácia agronômica (FORIM et al. 2010, 2011; MIRESMAILLI; ISMAN, 2014). Assim, há necessidade de pesquisa e desenvolvimento de produtos estáveis e padronizados, com tempo de ação prolongado em campo e baixa toxicidade ao homem e aos organismos não alvos (FORIM et al. 2010, 2011; MIRESMAILLI; ISMAN, 2014). No presente estudo, a azadiractina e o 3-tigloilazadiractol foram utilizados como limonoides marcadores para assegurar a eficácia agronômica do derivado de nim. A azadiractina e o 3-tigloilazadiractol são os principais limonoides com atividade biológica sobre insetos. Os dois limonoides são qualificados como os mais importantes princípios ativos para comercialização de subprodutos da planta como inseticida. No presente estudo foi ampliado o conhecimento atual revelando a concentração limiar dos derivados de nim capaz de inibir completamente a oviposição das moscas-das-frutas, utilizando a azadiractina e o 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) como limonoides marcadores.

2.2 Material e Métodos

2.2.1. Criação dos insetos

A população de *C. capitata* em estudo representa uma população obtida na colônia mantida no Instituto Biológico em Campinas, SP, Brasil desde 1993 (RAGA; SATO, 2006), cujo trabalho de reintrodução de insetos selvagens é realizado anualmente. Os insetos utilizados no estudo foram coletados no intervalo entre a segunda (F2) e a décima (F10) geração após a obtenção da colônia. Para início da criação, pupas de *C. capitata* foram acondicionadas no interior de uma gaiola para posterior emergência do adulto. Nessa gaiola foi fornecida *ad libitum* para os adultos dieta artificial [açúcar refinado, germe de trigo cru e hidrolisado de levedura de cerveja (Bionis YE MF[®], da Biorigin), na proporção 3:1:1] e água deionizada. Os adultos foram mantidos à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de

60 ± 10 % e fotofase de 14 h. A gaiola de criação de adultos possuía as partes superior e anterior de acrílico e as partes posterior e laterais teladas. A parte posterior, que recebeu uma iluminação artificial para estimular a oviposição na tela, apresentava uma inclinação de cerca de 10 % o que permitia a coleta de ovos em uma bandeja com água deionizada, mantida externamente, logo abaixo da gaiola (Figura 2.1).

Diariamente, os ovos eram coletados e peneirados em tecido *voil* e, com auxílio de um pincel, eram distribuídos em bandejas plásticas contendo dieta artificial para a alimentação das larvas. A fase larval foi mantida em BOD (25 ± 1°C, umidade relativa do ar de 60 ± 5 % e fotofase de 14 h) em uma dieta composta por água deionizada, farelo (soja e trigo), açúcar, levedo de cerveja, metilparahidroxibenzoato (nipagin), benzoato de sódio e ácido cítrico. As larvas no final do 3º ínstar (pré-pupa), com cerca de 8 dias após a inoculação dos ovos, foram retiradas da dieta artificial e acondicionadas em vidros contendo vermiculita para pupação, sendo estes fechados com tecido *voil*. Posteriormente, os adultos emergiram reiniciando uma nova geração.

2.2.2 Limonoides: azadiractina e o 3-tigloilazadiractol (AzaMax®)

Os limonoides são aleloquímicos presentes no produto concentrado emulsionável AzaMax® (MAPA Nº 014807) fabricado pela E.I.D. Parry (Índia) Limited e importado para o Brasil pela DVA Especialidades – Comércio, Importação e Exportação de Insumos Agropecuários Ltda. Anteriormente aos bioensaios, as quantidades de azadiractina e de 3-tigloilazadiractol presente no produto AzaMax® foram determinadas conforme o procedimento proposto por Forim et al. (2010) e utilizadas como referência (marcadores) para fins de padronização da concentração. O produto AzaMax® foi testado nas concentrações variando de 0 a 0,1 % de azadiractina mais 0 a 0,0285 % de 3-tigloilazadiractol (isto é, 0 a 1000 ppm de azadiractina mais 0 a 285 ppm de 3-tigloilazadiractol) diluído em água destilada. A azadiractina e o 3-tigloilazadiractol são um exemplo bem documentado de limonoides com efeito fagoderrente e regulador de crescimento em várias espécies de insetos (MORGAN, 2009). Para comercialização de subprodutos da planta como inseticida os dois limonoides são considerados os mais importantes. A porcentagem de 3-tigloilazadiractol em relação à azadiractina é de 1 a 5 %, valor bem maior em comparação a outros limonoides correlacionados à azadiractina (KLENK et al., 1986; REMBOLD, 1990).

Figura 2.1 - Esquema de criação dos adultos de *Ceratitis capitata* em gaiolas. As fotos 1A a 1E ilustram a oviposição das moscas na tela da gaiola. As fotos 2A e 2B ilustram a oferta de dieta artificial e água *ad libitum* na gaiola. As fotos 3A e 3B ilustram o comportamento sexual com a liberação de feromônio pelo macho e a cópula das moscas na gaiola. As fotos 4A a 4C ilustram uma visão geral da gaiola de criação

2.2.3. Etapa 1: limiar de limonoides (AzaMax[®]) em ensaios sem chance de escolha

Para avaliação da inibição da oviposição causada pelos limonoides (AzaMax[®]) foi realizada uma série de bioensaios sem chance de escolha pela praga. Para tanto, frutos de uva (*Vitis vinifera* L. cv. Itália) foram individualizados, amarrados em pedaços de barbante e presos numa estrutura metálica para aplicação dos tratamentos (Figura 2.2). Em seguida, os frutos foram mergulhados individualmente por 15 segundos em um béquer contendo 60 ml de calda com diferentes concentrações de limonoides ou em água deionizada (controle). Após serem tratados, os frutos ficaram em repouso por 90 minutos para retirada do excesso de umidade. Posteriormente, um único fruto foi pendurado na parte superior de cada gaiola. As gaiolas, de plástico transparente, com 16 cm de altura e 13 cm de diâmetro, com tampa e fundo plástico, tinham na tampa um orifício de 6 cm de diâmetro, coberto com tela anti-afídeo para permitir a aeração. Um orifício lateral da gaiola permitia a liberação das fêmeas férteis com cinco a 10 dias de idade. Passadas 24 h, os frutos foram retirados e foi registrado o número de ovos por fruto, o número de puncturas por fruto, o número de ovos por punctura e a porcentagem de frutos infestados. Três bioensaios foram instalados adotando esse procedimento. Cada bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 18 tratamentos [três densidades de insetos (uma, duas ou três fêmeas) x cinco concentrações de limonoides e um controle] e 20 repetições. A concentração de azadiractina variou de 1 a 1000 ppm (+ 0,29 a 285 ppm de 3-tigloilazadiractol). Os bioensaios foram conduzidos à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

2.2.4 Etapa 2: limiar de limonoides (AzaMax[®]) em ensaio com chance de escolha

O bioensaio com chance de escolha foi similar aos bioensaios descritos no item anterior, com a diferença de que, neste bioensaio, foram expostos dois frutos por gaiola, um tratamento e um controle (Figura 2.2). Foram utilizadas três densidades de insetos (uma, duas ou três fêmeas). A concentração de azadiractina variou de 1 a 100 ppm (+ 0,3 a 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). O bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com seis tratamentos e 15 repetições, em laboratório à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Figura 2.2 - Esquema dos procedimentos adotados nos bioensaios

2.2.5 Análise dos dados

No ensaio sem chance de escolha os frutos infestados (%), o número de ovos, o número de puncturas e o número de ovos por punctura em cada fruto foram submetidos à análise de variância pelo teste F e pelo teste de Tukey, sob esquema fatorial 3 x 6, sendo os fatores constituídos pelas três populações de insetos (uma, duas ou três fêmeas) e os tratamentos (cinco concentrações de limonoides e um controle). No ensaio com chance de escolha os

frutos infestados (%), o número de ovos e o número de puncturas em cada fruto foram submetidos ao teste t de Student comparando as médias (tratamento e controle). Os testes de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) foram aplicados para avaliar as pressuposições de homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e a normalidade dos resíduos, respectivamente. Na ausência desses pressupostos, os dados foram transformados pelo Método Potência Ótima de Box-Cox (BOX; COX, 1964). Neste estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa SAS 9.1 de computação estatística (PROC GLM, SAS Institute 2003).

2.3 Resultados

2.3.1 Etapa 1: limiar de limonoides (AzaMax[®]) em ensaios sem chance de escolha

No bioensaio com baixa concentração de limonoides (intervalo de 0 a 10 ppm de azadiractina + 0 a 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) não foi constatada interação significativa (densidade versus concentração) quando o parâmetro porcentagem de frutos infestados foi avaliado (Tabela 2.1). A variação nessas concentrações também não resultou em diferença significativa em relação às porcentagens de frutos infestados nas três densidades de moscas. Todavia, uma maior densidade populacional resultou numa maior porcentagem de frutos infestados. Assim, na concentração com 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) a porcentagem de frutos infestados utilizando duas ou três fêmeas foi superior ao registrado na presença de uma única fêmea. Essa diferença também foi constatada na presença de 2,5 ppm de azadiractina (+ 0,71 ppm de 3-tigloilazadiractol) e 5,0 ppm de azadiractina (+ 1,43 ppm de 3-tigloilazadiractol), onde a densidade populacional com três fêmeas foi maior que no grupo com uma fêmea. Cabe ressaltar que no controle a porcentagem de frutos infestados utilizando duas fêmeas também foi superior ao registrado na presença de uma única fêmea. Por outro lado, nas concentrações com 1,0 ppm de azadiractina (+ 0,29 ppm de 3-tigloilazadiractol) e 7,5 ppm de azadiractina (+ 2,14 de 3-tigloilazadiractol) não foi constatada diferença significativa nas três densidades de insetos (Tabela 2.1).

Não foi constatada interação significativa (densidade versus concentração) quando o número de puncturas por fruto foi avaliado no bioensaio com 0 a 10 ppm de azadiractina + 0 a 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol (Tabela 2.1). Entretanto, a variação nas concentrações de limonoides resultou em diferença significativa em relação ao número de puncturas por fruto com uma, duas ou três fêmeas. A proteção dos limonoides com até 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) em relação às puncturas apresentou maior efetividade na

menor densidade populacional (1♀) uma vez que uma maior densidade (3♀) resultou em maior número de puncturas por fruto nas concentrações com 1,0 ppm de azadiractina (+ 0,29 ppm de 3-tigloilazadiractol), 2,5 ppm de azadiractina (+ 0,71 ppm de 3-tigloilazadiractol), 5,0 ppm de azadiractina (+ 1,43 ppm de 3-tigloilazadiractol) e 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol). Adicionalmente, com 2,5 ppm de azadiractina (+ 0,71 ppm de 3-tigloilazadiractol) e 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) os resultados com a densidade populacional intermediária (2♀) também superaram os obtidos com a menor densidade (1♀). No controle e na concentração com 7,5 ppm de azadiractina (+ 2,14 ppm de 3-tigloilazadiractol) não foi constatada diferença significativa (Tabela 2.1). A redução do número de puncturas por fruto em função do uso dos limonoides foi caracterizada com uma fêmea, situação em que a referida injúria no tratamento com 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) foi menor do que no controle. Com duas fêmeas também foi observado menor número de puncturas por fruto no tratamento com 5,0 ppm de azadiractina (+ 1,43 ppm de 3-tigloilazadiractol) quando comparado ao controle.

Na concentração de limonoides utilizada neste ensaio, também não foi constatada interação significativa (densidade versus concentração) quando o parâmetro número de ovos por fruto foi avaliado (Tabela 2.1). Entretanto, quando apenas uma fêmea foi exposta poucos ovos por fruto foram observados na presença de 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) em comparação com o controle, porém, com o aumento da densidade esse efeito não foi mantido. As uvas controle expostas para uma, duas ou três fêmeas apresentaram um número similar de ovos por fruto. Em contraste, na presença dos limonoides a resposta diferiu significativamente conforme a densidade da praga. Em todas as concentrações testadas um maior número de ovos por fruto foi observado quando este foi exposto a três fêmeas em comparação com a exposição a uma única fêmea. Uma maior oviposição foi observada na presença de três fêmeas comparado a duas fêmeas em uvas com 1,0 ppm de azadiractina (+ 0,29 ppm de 3-tigloilazadiractol) e 5,0 ppm de azadiractina (+ 1,43 ppm de 3-tigloilazadiractol) (Tabela 2.1).

Com o aumento das concentrações (10 a 100 ppm de azadiractina e 2,9 a 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) foi detectada interação significativa para os parâmetros número de puncturas por fruto e número de ovos por fruto, porém em relação à porcentagem de frutos infestados não foi registrada interação (Tabela 2.2). Como esperado, a inibição da oviposição foi mais acentuada com o uso de concentrações maiores. Assim, a porcentagem de frutos infestados foi reduzida com o tratamento com limonoides nas três densidades de fêmeas, estando as diferenças encontradas em cada densidade expostas na Tabela 2.2. Na menor

concentração, 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol), a porcentagem de frutos infestados foi maior na presença de duas ou três fêmeas comparado a uma única fêmea, porém a densidade populacional não alterou a resposta nas demais concentrações (Tabela 2.2).

O número de puncturas por fruto, que já era baixo em 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol), caiu acentuadamente com o aumento da concentração de limonoides. No tratamento controle e no tratamento com 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) o aumento da densidade das fêmeas resultou em aumento na quantidade de injúrias causadas pelas moscas, ao passo que nas concentrações superiores, as respostas foram as mesmas, independentemente do número de fêmeas: não mais do que uma punctura por fruto foi observada em qualquer um desses tratamentos.

O número de ovos por fruto foi drasticamente reduzido em todas as concentrações e densidades em estudo. Especialmente no controle e com 10 ppm de azadiractina (+ 2,85 ppm de 3-tigloilazadiractol) o número de ovos por fruto aumentou com o aumento das fêmeas. Nas outras concentrações o número de ovos por fruto não variou com o número de fêmeas utilizadas (Tabela 2.2).

Os resultados obtidos no terceiro bioensaio demonstraram que em concentrações igual ou a partir de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) não ocorre oviposição da praga.

Tabela 2.1 Oviposição de *Ceratitidis capitata* em uva com baixa concentração de limonoides (AzaMax®).

Azadiractina 3-tigloilazadiractol		1 ♀	2 ♀	3 ♀	F	CV	P
(ppm)	(ppm)	-----Frutos infestados (%)-----					
0,00	0,00	60 ± 11,2 aB	95 ± 5,0 aA	85 ± 8,2 aAB	4,46	21,20	0,0158
1,00	0,29	55 ± 11,4 aA	75 ± 9,9 aA	85 ± 8,2 aA	2,36	25,88	0,1032
2,50	0,71	45 ± 11,4 aB	65 ± 10,9 aAB	85 ± 8,2 aA	3,78	27,87	0,0286
5,00	1,43	45 ± 11,4 aB	65 ± 10,9 aAB	95 ± 5,0 aA	6,91	25,44	0,0021
7,50	2,14	45 ± 11,4 aA	65 ± 10,9 aA	80 ± 9,2 aA	2,77	28,90	0,0713
10,00	2,90	20 ± 9,2 aB	70 ± 10,5 aA	80 ± 9,2 aA	11,11	27,53	<0,0001
	F	1,56	1,39	0,46			
	CV	34,06	25,78	19,61			
	P	0,1775	0,2332	0,8082			
	Fator	GL	F	P			
	Densidade (D)	2	26,30	<0,0001			
	Concentração (C)	5	1,98	0,0810			
	D x C	10	0,88	0,5513			
		-----Puncturas por fruto-----					
0,00	0,00	4,4 ± 1,1 aA	7,8 ± 1,3 aA	8,0 ± 1,3 abA	2,95	23,71	0,0605
1,00	0,29	3,3 ± 1,0 abB	4,8 ± 1,1 abAB	9,1 ± 1,8 abA	4,92	26,32	0,0107
2,50	0,71	1,6 ± 0,6 abB	5,5 ± 1,4 abA	7,3 ± 1,2 abA	7,85	23,98	0,0010
5,00	1,43	2,1 ± 0,8 abB	3,3 ± 0,8 bB	9,4 ± 1,5 aA	15,14	22,18	<0,0001
7,50	2,14	2,1 ± 0,7 abA	3,9 ± 0,8 abA	3,9 ± 0,9 bA	1,77	20,60	0,1795
10,00	2,90	0,8 ± 0,6 bB	4,0 ± 1,0 abA	4,3 ± 1,1 abA	5,61	22,69	0,0060
	F	2,68	2,33	3,39			
	CV	21,87	23,27	24,38			
	P	0,0248	0,0473	0,0068			
	Fator	GL	F	P			
	Densidade (D)	2	29,65	<0,0001			
	Concentração (C)	5	5,37	<0,0001			
	D x C	10	1,63	0,0963			
		-----Ovos por fruto-----					
0,00	0,00	12,8 ± 3,1 aA	19,2 ± 3,3 aA	22,2 ± 4,1 aA	1,88	29,37	0,1612
1,00	0,29	8,8 ± 3,1 abB	11,5 ± 2,9 aB	28,8 ± 6,4 aA	5,94	34,71	0,0045
2,50	0,71	4,7 ± 2,3 abB	15,5 ± 4,4 aB	24,3 ± 4,5 aA	7,67	32,83	0,0011
5,00	1,43	5,0 ± 2,2 abB	8,2 ± 2,0 aB	20,4 ± 4,2 aA	8,28	28,35	0,0007
7,50	2,14	4,0 ± 1,7 abB	10,9 ± 2,3 aA	10,9 ± 2,2 aA	4,06	24,32	0,0224
10,00	2,90	3,2 ± 2,2 bB	9,4 ± 2,3 aAB	16,4 ± 4,5 aA	5,41	30,85	0,0071
	F	2,43	1,87	1,81			
	CV	29,13	28,32	32,39			
	P	0,0395	0,1056	0,1168			
	Fator	GL	F	P			
	Densidade (D)	2	28,81	<0,0001			
	Concentração (C)	5	4,00	0,0015			
	D x C	10	0,94	0,4972			

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P < 0,05).

Tabela 2.2 Oviposição de *Ceratitis capitata* em uva com média concentração de limonoides (AzaMax®).

Azadiractina (ppm)	3-tigloilazadiractol (ppm)	1 ♀	2 ♀	3 ♀	F	CV	P
----- Frutos infestados (%)-----							
0,00	0,00	50 ± 11,5 aA	65 ± 10,9 aA	75 ± 9,9 aA	1,36	29,57	0,2656
10,00	2,90	20 ± 9,2 abB	55 ± 11,4 abA	75 ± 9,9 aA	7,42	30,46	0,0014
25,00	7,10	5 ± 5,0 bA	35 ± 10,9 abcA	30 ± 10,5 bA	3,04	33,45	0,0559
50,00	14,30	15 ± 8,2 bA	25 ± 9,9 abcA	10 ± 6,9 bA	0,82	32,31	0,4451
75,00	21,40	20 ± 9,2 abA	15 ± 8,2 bcA	15 ± 8,2 bA	0,11	32,71	0,8921
100,00	28,50	0 ± 0,0 bA	10 ± 6,9 cA	10 ± 6,9 bA	1,06	23,56	0,3547
	F	4,69	4,98	12,44			
	CV	30,55	32,85	29,13			
	P	0,0006	0,0004	<0,0001			
	Fator	GL	F	P			
	Densidade (D)	2	6,97	0,0011			
	Concentração (C)	5	18,34	<0,0001			
	D x C	10	1,82	0,0554			
----- Puncturas por fruto-----							
0,00	0,00	1,8 ± 0,6 aB	5,8 ± 1,5 aAB	10,4 ± 2,6 aA	8,25	41,55	0,0007
10,00	2,90	0,2 ± 0,1 bB	1,4 ± 0,3 bAB	2,0 ± 0,6 bA	6,18	23,61	0,0037
25,00	7,10	0,1 ± 0,1 bA	0,7 ± 0,3 bA	1,0 ± 0,3 bA	3,04	19,48	0,0556
50,00	14,30	0,3 ± 0,2 bA	0,5 ± 0,3 bA	0,4 ± 0,2 bA	0,10	17,61	0,9086
75,00	21,40	0,2 ± 0,1 bA	0,2 ± 0,2 bA	0,4 ± 0,2 bA	0,30	13,47	0,7391
100,00	28,50	0,0 ± 0,0 bA	0,1 ± 0,1 bA	0,1 ± 0,1 bA	0,96	8,23	0,3884
	F	6,80	14,86	21,64			
	CV	18,64	28,87	34,56			
	P	<0,0001	<0,0001	<0,0001			
	Fator	GL	F	P			
	Densidade (D)	2	15,26	<0,0001			
	Concentração (C)	5	42,61	<0,0001			
	D x C	10	5,39	<0,0001			
----- Ovos por fruto -----							
0,00	0,00	2,7 ± 0,8 aB	12,2 ± 3,9 aAB	21,4 ± 4,9 aA	6,53	44,78	0,0028
10,00	2,90	0,6 ± 0,3 bB	4,1 ± 1,1 abAB	6,4 ± 1,6 bA	6,97	26,26	0,0020
25,00	7,10	0,4 ± 0,4 bA	2,8 ± 1,1 bA	1,9 ± 0,9 bA	2,21	23,88	0,1195
50,00	14,30	0,6 ± 0,3 bA	1,7 ± 0,8 bA	0,8 ± 0,7 bA	0,83	19,66	0,4401
75,00	21,40	0,4 ± 0,2 bA	0,6 ± 0,4 bA	0,7 ± 0,4 bA	0,37	11,39	0,6919
100,00	28,50	0,0 ± 0,0 bA	0,5 ± 0,4 bA	0,8 ± 0,6 bA	0,87	10,55	0,4263
	F	5,12	6,88	15,37			
	CV	13,91	33,26	35,24			
	P	0,0003	<0,0001	<0,0001			
	Fator	GL	F	P			
	Densidade (D)	2	13,02	<0,0001			
	Concentração (C)	5	25,27	<0,0001			
	D x C	10	4,22	<0,0001			

¹Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P <0,05).

2.3.2 Etapa 2: limiar de limonoides (AzaMax[®]) em ensaio com chance de escolha

Em linhas gerais *C. capitata* prefere ovipositar em frutos sem limonoides, embora estes, nas mais baixas concentrações testadas, não tenham influenciado a seleção hospedeira pelos insetos (Figuras 2.3, 2.4 e 2.5). Assim, independentemente da densidade de fêmeas (uma a três por gaiola), a concentração de 1 ppm de azadiractina (+ 0,29 ppm de 3-tigloilazadiractol) não reduziu a porcentagem de frutos infestados, o número de puncturas por fruto e o número de ovos por fruto. Já na concentração de 10 ppm de azadiractina (+ 2,85 ppm de 3-tigloilazadiractol) os limonoides não afetaram a porcentagem de frutos infestados nas três densidades de fêmeas e tampouco afetaram, no caso de uma e três fêmeas por gaiola, o número de puncturas por fruto e o número de ovos por fruto. Com duas fêmeas por gaiola, no entanto, a referida concentração provocou redução no número de puncturas por fruto e no número de ovos por fruto (Figuras 2.3, 2.4 e 2.5).

A partir de 25 ppm de azadiractina (+ 7,10 ppm de 3-tigloilazadiractol) os limonoides afetaram a seleção hospedeira do inseto, o que acarretou numa redução na porcentagem de frutos infestados e no número de puncturas por fruto, com exceção, para esses dois parâmetros, da concentração de 50 ppm de azadiractina (+ 14,3 ppm de 3-tigloilazadiractol), com o uso de 1 fêmea. Por outro lado, ainda partir de 25 ppm de azadiractina (+ 7,10 ppm de 3-tigloilazadiractol), houve redução no número de ovos por fruto nas densidades de 2 e 3 fêmeas por gaiola, enquanto que com o emprego de apenas 1 fêmea, essa redução só ocorreu na concentração de 75 ppm de azadiractina (+ 21,4 ppm de 3-tigloilazadiractol)

2.3.3 Limiar de limonoides (AzaMax[®]) capaz de inibir a oviposição de *Ceratitis capitata*

Durante a seleção hospedeira de *C. capitata* a presença de azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) em concentrações de 1 (+ 0,29) a 7,5 (+ 2,14) ppm na superfície de frutos de uva não afeta a sua oviposição (puncturas) (Figura 2.3). Em contrapartida, concentrações de 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) a 75 ppm de azadiractina (+ 21,4 ppm de 3-tigloilazadiractol) reduzem a oviposição de *C. capitata* atingindo completa inibição da oviposição em concentrações a partir de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 de ppm de 3-tigloilazadiractol) (Figura 2.6).

Figura 2.3 - Seleção hospedeira por *Ceratitis capitata* na presença de limonoides (AzaMax®) em bioensaio com chance de escolha (n = 15). As barras representam os dados de frutos de uva infestados com ovos (%). Para análise, os dados foram transformados por SQRT (x + 30). Os valores ao lado das barras indicam a concentração (ppm) de azadiractina (3-tigloilazadiractol, entre parêntesis)

Figura 2.4 - Seleção hospedeira por *Ceratitis capitata* na presença de limonoides (AzaMax®) em experimento com chance de escolha (n = 15). As barras representam o número de puncturas por fruto. Para análise, os dados foram transformados por SQRT (x + 1). Os valores ao lado das barras indicam a concentração (ppm) de azadiractina (3-tigloilazadiractol, entre parêntesis)

Figura 2.5 - Seleção hospedeira por *Ceratitis capitata* na presença de limonoides (AzaMax®) em experimento com chance de escolha (n = 15). As barras representam o número de ovos colocados por fruto. Para análise, os dados foram transformados por SQRT (x + 10). Os valores ao lado das barras indicam a concentração (ppm) de azadiractina (3-tigloilazadiractol, entre parêntesis)

Figura 2.6 - Limiar de limonoides (AzaMax[®]) capaz de inibir a oviposição de *Ceratitis capitata* durante a seleção hospedeira

2.4 Discussão

Os vários mecanismos de ação dos limonoides sobre insetos os tornam muito úteis para a produção industrial de inseticidas botânicos. Neste estudo, foram utilizados os limonoides (AzaMax[®]) visando avaliar a eventual alteração do comportamento de *C. capitata*. A fêmea da moscada é capaz de depositar de 300 a 1000 ovos durante o seu ciclo de vida (YUVAL; HENDRICH, 2000). Dependendo do fruto (forma, tamanho e propriedades da casca), a praga pode colocar de 1 a 10 ovos por oviposição (SOUZA et al., 1983). A inibição da oviposição é uma ferramenta importante para o manejo de *C. capitata*. Os resultados mais promissores para a utilização de limonoides do nim no manejo de moscas-das-frutas envolvem a inibição da oviposição (CHEN et al., 1996; SINGH; SINGH, 1998; SILVA et al., 2012; BOCKMANN et al., 2014) e o tratamento da pré-pupa e pupa para evitar ou reduzir a emergência de adultos, isto é, regulando o desenvolvimento (STARK et al., 1990; SILVA et al., 2011). No presente estudo foi ampliado o conhecimento atual revelando a concentração limiar de azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]) que inibe completamente a oviposição de *C. capitata* (Figura 2.6). Uma clara redução da oviposição ocorre com concentrações a partir de 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol). Nessa concentração a infestação não é evitada, porém a população da praga pode ser afetada uma vez que o número de ovos por fruto é reduzido. Com a presença de maior quantidade de limonoides sobre a superfície do fruto a redução da oviposição também aumentou proporcionalmente atingindo níveis de completa inibição a partir de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]). Nessa concentração as injúrias com puncturas (Figura 2.7) e a infestação por *C. capitata* são evitadas. Adicionalmente, no presente estudo foi constatado que numa situação de escolha, concentrações a partir de 50 ppm de azadiractina (+ 14,3 ppm de 3-tigloilazadiractol) são indicadas para o manejo (AzaMax[®]).

O emprego da concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]) em campo é fortemente recomendada. A segurança da conclusão é amparada pelas seguintes considerações: (1) O principal critério de avaliação é baseado na completa inibição da infestação dos frutos de uva por *C. capitata*. A concentração limiar garante a proteção dos frutos contra a infestação das moscas-das-frutas. Por outro lado, a simples redução do número de puncturas ou ovos colocados como reportado anteriormente (SINGH; SRIVASTAVA, 1983, CHEN et al., 1996, VALENCIA-BOTÍN et al., 2004; SILVA et al., 2012; HIDAYAT et al., 2013) não é conclusivo para a indicação do emprego

em campo. (2) No presente estudo foi simulada uma condição de alta pressão populacional (uma a três fêmeas por fruto), enquanto em agroecossistemas tropicais como no Brasil os parreirais de uva são podados drasticamente duas ou três vezes por ano, impedindo a manutenção e aumento das populações de *C. capitata*. A população registrada nos parreirais de uva provavelmente seja resultante da presença do inseto em pomares de outras espécies vegetais na circuvizinhança. Portanto, essa concentração propicia uma proteção segura uma vez que em campo a densidade populacional em estudo normalmente não ocorre. (3) Legitimando a hipótese aqui formulada, numa situação de escolha, o fruto não foi infestado em concentrações menores de limonoides. Logicamente, essa situação de escolha de hospedeiros é um fato recorrente em países tropicais. No campo, *C. capitata* possui alta capacidade de voo e, dessa forma, utiliza uma grande gama de frutas como hospedeiros.

A eficácia agrônômica dos derivados de nim é associada à presença de limonoides. A concentração dos limonoides depende da variabilidade genética da árvore *A. indica*, da sazonalidade da produção de substâncias secundárias, da estrutura da planta utilizada (sementes, ramos ou folhas), do tipo de extração adotado e também da purificação do produto comercial que normalmente prioriza a presença da azadiractina (FORIM et al. 2010, 2011). Os resultados sugerem que os derivados do nim obtidos em qualquer período, de diferentes estruturas da planta (folhas, ramos ou sementes), com diferentes solventes e tipos de extração, são capazes de evitar a infestação de moscas-das-frutas, desde que a calda de aplicação tenha, no mínimo, 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). Em função da atividade biológica é possível inferir que a utilização dos 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) como marcadores é uma garantia que outros compostos com propriedades semelhantes também estão presentes no derivado de nim. Estudos anteriores sugerem que outros limonoides contidos em derivados do nim, tais como nimbina, 6-desacetilnimbina, salanina, 6-acetilnimbandiol e nimbandiol, bem como outras substâncias químicas polares não identificadas, podem aumentar a eficiência de produtos naturais à base de azadiractina (STARK; WALTER, 1995). Adicionalmente, Saxena e Basit (1982) e Naumann e Isman (1995) defendem o papel dos compostos organossulfurados voláteis, incluindo dissulfureto de dipropilo presentes em sementes de nim, como prováveis compostos responsáveis pela inibição da oviposição de insetos. Estudos anteriores demonstraram que o óleo comercial de amêndoas de nim (Margosan-O[®]) causou inibição significativa da oviposição de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) e, por outro lado, que a azadiractina, o triterpenoide com maior atividade inseticida encontrado em

Margosan-O[®], foi inativo em relação à oviposição da praga, mesmo utilizando o composto puro na mesma concentração encontrada em Margosan-O[®] (5 %) (QIU et al., 1998).

Figura 2.7 - Injúrias com puncturas de *Ceratitis capitata* em frutos de uva. (A) Visão das puncturas sobre a superfície do hospedeiro. (B, C e D) Detalhe das puncturas

O ponto central do estudo evidencia como conclusão primária que a concentração limiar de completa inibição da oviposição se dá com 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]). Concentrações superiores mantêm a inibição observada; por outro lado, a redução gradativa dos limonoides na superfície do fruto também reduz o poder de inibição. A porcentagem de frutos infestados, a oviposição e os danos por puncturas são reduzidos na presença de concentrações entre 25 ppm de azadiractina (+ 7,1 ppm de 3-tigloilazadiractol) e 75 ppm de azadiractina (+ 21,4 ppm de 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]) na superfície de frutos de uva. A oviposição e os danos por punctura são reduzidos na presença de 10 ppm de azadiractina (+ 2,9 ppm de 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]) na superfície de frutos de uva. A seleção hospedeira de *C. capitata* não é afetada por concentração igual ou inferior a 7,5 ppm de azadiractina (+ 2,14 ppm de 3-tigloilazadiractol)

(AzaMax[®]) na superfície de frutos de uva. A inibição da oviposição é fortemente influenciada pela disponibilidade hospedeira, sendo que, em situações de chance de escolha, o efeito é mais pronunciado. A inibição da oviposição é drástica a partir de 50 ppm de azadiractina (+ 14,3 ppm de 3-tigloilazadiractol) (AzaMax[®]) em situação de chance de escolha do hospedeiro. As futuras pesquisas devem explicar como os limonoides inibem a oviposição de moscas-das-frutas e, além disso, é necessário conhecer o período residual dos limonoides para estabelecer o intervalo entre as aplicações e validar os resultados em campo.

Referências

- ADÁN, A.; SORIA, J.; DEL ESTAL, P.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; VIÑUELA, E. Acción diferencial de dos formulaciones de azadiractina sobre los estados de desarrollo de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas**, Madrid, v.24, p. 1009-1018, 1998.
- AKCA, I.; TUNCER, C.; GULER, A.; SARUHAN, I. Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Islamabad, v. 8, p. 436-440, 2009.
- ALVARENGA, C.D.; FRANÇA, W. M.; GIUSTOLIN, T.A.; PARANHOS, B.A.J.; LOPES, G.N.; CRUZ, P.L.; BARBOSA, P. R.R. Toxicity of neem (*Azadirachta indica*) seed cake to larvae of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid, *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 57-62, 2012.
- BARRY, J.D.; SCIARAPPA, W.J.; TEIXEIRA, L.A.F.; POLAVARAPU, S. Comparative effectiveness of different insecticides for organic management of blueberry maggot (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, p.1236-1241, 2005.
- 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.
- BOCKMANN, E.; KOPPLER, K.; HUMMEL, E.; VOGT, H. Bait spray for control of European cherry fruit fly: an appraisal based on semi-field and field studies. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, p. 502-509, 2014.
- BOEKE, S. J.; BOERSMA, M.G.; ALINK, G.M.; VAN LOON, J.J.A.; VAN HUIS, A.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M.C.M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, p. 25–41, 2004.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.

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

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

EFROM, C.F.S.; REDAELLI, L.R.; MEIRELLES, R.N.; OURIQUE, C.B. Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, in organic farming. **Crop Protection**, Kidlington, v.30, p.1162-1167, 2011.

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

FORIM, M.R.; DA SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B. Secondary metabolism as a measurement of efficacy of botanical extracts: the use of *Azadirachta indica* (Neem) as a model. In: PERVEEN, F. (Org.). **Insecticides** / Book 3. Rijeka: InTech - Open Access Publisher, p. 1-24, 2011.

HIDAYAT, Y.; HEATHER, N.; HASSAN, E. Repellency and oviposition deterrence effects of plant essential and vegetable oils against female Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). **Australian Journal of Entomology**, Brisbane, v. 52, p. 379-386, 2013.

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

KHATER, H.F. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. **Pharmacologia**, London, v. 3, p. 641-656, 2012.

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

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

MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M.B. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 19, p. 29-35, 2014.

- MOMANYI, G.; MARANGA, R.; SITHANANTHAM, S.; AGONG, S.; MATOKA C. M.; HASSAN, S. A. Evaluation of persistence and relative toxicity of some pest control products to adults of two native trichogrammatid species in Kenya. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, p. 591–601, 2012.
- MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, p. 4096–4105, 2009.
- NAUMANN, K.; ISMAN, M.B. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed extracts and oils as oviposition deterrents to noctuid moths. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 76, p. 115–120, 1995.
- QIU, Y.T.; Van LOON, J.J.A.; ROESSINGH, P. Chemoreception of oviposition deterring terpenoids in the diamondback moth *Plutella xylostella*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, Dordrecht, v. 87, p. 143–155, 1998.
- RAGA, A.; SATO, M.E. Time-mortality for fruit flies (Diptera: Tephritidae) exposed to insecticides in laboratory. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 73, p. 73–77, 2006.
- RAIZADA, R.B.; SRIVASTAVA, M.K.; KAUSHAL, R.A.; SINGH, R.P. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 39, p. 477–483, 2001.
- REMBOLD, H. Isomeric azadirachtins and their mode of action. In: JACOBSON, M. **The neem tree**. London: CRC Press, 1990. p. 47–67.
- SANCHEZ-RAMOS, I.; FERNÁNDEZ, C.E.; GONZÁLEZ-NÚÑEZ, M.; PASCUAL, S. Laboratory tests of insect growth regulators as bait sprays for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 520–526, 2013.
- SAS INSTITUTE. 2003. Statistical Analysis System, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.
- SAXENA, K.N.; BASIT, A. Inhibition of oviposition by volatile of certain plants and chemicals in the leafhopper, *Amrasca devetans* (Distant). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 8, p. 329–338, 1982.
- SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591–611, 1965.
- SILVA, M.A.; ALVARENGA, C.D.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; MASTRANGELO, T.; LOPES-MIELEZRSKI, G.N.; GIUSTOLIN, T. Toxic effects of neem seed cake on the larval-pupal (prepupal) stage of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Fruits**, Paris, v. 66, p. 363–369, 2011.
- SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T. Inhibition of oviposition by neem extract: a behavioral perspective for the control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 333–337, 2012.

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T. Sublethal effect of neem extract on Mediterranean fruit fly adults. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, p. 093-101, 2013a.

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T.; FORIM, M.R. Neem derivatives are not effective as toxic bait for Tephritid fruit flies. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 106, n. 4, p. 1772-1779, 2013b.

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

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

SINGH, R.P.; SRIVASTAVA, B.G. Alcohol extract of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil as oviposition deterrent for *Dacus cucurbitae* (Coq.). **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 45, p. 497-498, 1983.

SOUZA, H.M.L.; CYTRYNOWICZ, M.; MORGANTE, J.S.; PAVAN, O.H. Occurrence of *A. fraterculus* (Wied.), *C. capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) and *Silba* sp. (Diptera: Lonchaeidae). Eggs in oviposition bores on three host fruits. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 27, p. 191-195, 1983.

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

STARK, J.D.; WALTER, J.F. Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 507-512, 1995.

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

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

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

Van RANDEN, E.J.; ROITBERG, B.D. The effect of a neem (*Azadirachta indica*) based insecticide on survival and development of juvenile western cherry fruit fly (*Rhagoletis indifferens*) (Diptera: Tephritidae). **The Canadian Entomologist**, Vancouver, v. 130, p. 869-876, 1998b.

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

3 LIMONOIDES (AZAMAX[®]) POSSUEM AÇÃO REPELENTE DE CONTATO SOBRE INSETOS: O CASO DE *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE).

Resumo

A explicação de como os limonoides inibem a oviposição de insetos é pouco documentada. Neste estudo propõe-se averiguar os estímulos envolvidos na inibição da oviposição de *Ceratitis capitata*. Para isso o estudo foi conduzido em três etapas: 1. Observação visual da resposta comportamental de *C. capitata* aos limonoides (AzaMax[®]). 2. Percepção dos limonoides (AzaMax[®]) por *C. capitata* na superfície do hospedeiro. 3. Resposta comportamental de *C. capitata* após exposição dos quimiorreceptores aos limonoides (AzaMax[®]). Nas gaiolas com uva tratada as moscas percebem o odor, aumentam os movimentos triviais antes do contato e voam em direção à fonte de odor com a finalidade de reconhecer o hospedeiro, contudo evitam o pouso. Finalmente, as moscas realizam o pouso e permanecem sobre o fruto com limonoides por um tempo insignificante. No entanto, em um período de 24 h (fotofase de 14 h) os resultados observados na etapa 2 demonstram que as moscas são capazes de pousar na fonte de odor e além disso são capazes de discriminar com alta nitidez a presença dos limonoides (AzaMax[®]) na superfície do fruto hospedeiro. Adicionalmente, foi constatado que a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) não impede a oviposição quando as diferentes partes do corpo do inseto com quimiorreceptores são expostas aos limonoides (AzaMax[®]). Em suma, é possível caracterizar que a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) impede que o hospedeiro seja reconhecido pela praga em função dos estímulos que promovem a inquietação (irritação), locomoção e consequente dispersão da praga.

Palavras-chave: Moscas-das-frutas; Comportamento; Azadiractina; 3-tigloilazadiractol

¹Artigo aceito para publicação na revista Journal of Economic Entomology.

3 CONTACT REPELLENT OF NEEM LIMONOIDS (AZAMAX[®]) ON INSECTS: THE CASE OF *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE).

Abstract

The mechanisms of inhibit oviposition by insects using limonoids is poorly documented. This study proposed to investigate the stimuli involved in the inhibition of oviposition of *Ceratitis capitata*. This study was conducted in three steps: 1. Visual observation of the behavioral response of *C. capitata* to limonoids (AzaMax[®]). 2. Perception of limonoids (AzaMax[®]) for *C. capitata* on the surface of the host fruit. 3. Behavioral response of *C. capitata* after exposure of chemoreceptors to the limonoids (AzaMax[®]). In the cages with grape treated, the medflies perceive the odor, increase the trivial movements before contact and flew toward the odor source in order to recognize the host, but avoid landing. Finally, the flies land and remain with limonoids on the fruit by a negligible time. However, over a period of 24 h (14 h photoperiod) the results observed in step 2 demonstrate that flies are able to land on the odor source and, are able to discriminate with sharply the presence of limonoids

(AzaMax[®]) on the surface of the host fruit. Additionally, it was found that the threshold level of 100 ppm of azadirachtin (+ 28.5 ppm of 3-tigloylazadirachtol) does not prevent oviposition when different body parts with insect chemoreceptors are exposed to limonoids (AzaMax[®]). In short, it is possible to characterize the threshold concentration of 100 ppm of azadirachtin (+ 28.5 ppm of 3-tigloylazadirachtol) prevents the host to be recognized by *C. capitata* depending on the stimuli that promote caring (irritation), locomotion and consequent dispersion of insect.

Keywords: Fruit fly; Behavior; Azadirachtin; 3-tigloylazadirachtol.

3.1 Introdução

A localização de um hospedeiro nutricionalmente adequado e sem a presença de competidores requer um sofisticado mecanismo de detecção dos sinais presentes no ambiente, incluindo estímulos visuais, sonoros, táteis e olfativos (FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013; STAM et al., 2014). Estudos iniciais dos mecanismos de oviposição deram ênfase às características físicas ou morfológicas das plantas, mas após a descoberta dos aleloquímicos os estudos de seleção hospedeira passaram a investigar os sinais químicos envolvidos (FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013). Os aleloquímicos podem agir como alomônios, cairomônios, sinomônios ou antimônios (VENDRAMIM; GUZZO, 2012). Inicialmente, esforços de pesquisa foram concentrados no estudo dos alomônios e cairomônios, buscando substâncias repelentes ou atraentes de insetos, respectivamente. Recentemente, muitas expectativas foram geradas para o uso de sinomônios na agricultura, muito embora ainda sejam necessários muitos estudos para estabelecer uma estratégia de manejo de pragas em campo. Os alomônios podem interferir nas diferentes etapas da seleção hospedeira por insetos. Neste estudo foi investigada a resposta comportamental das moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) aos terpenoides, aleloquímicos presentes nos derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (Meliaceae).

Os terpenoides constituem um grupo de substâncias secundárias de plantas que desempenham um papel importante na defesa das plantas contra insetos fitófagos (RATTAN, 2010; FÜRSTENBERG-HÄGG et al., 2013). A azadiractina e o 3-tigloylazadiractol, limonoides que ocorrem em *A. indica*, são um exemplo bem documentado de terpenoides com efeito fagodeterrente e regulador de crescimento em várias espécies de insetos (KLENK; BOKEL; KRAUS, 1986; MORDUE et al., 1998; GAHUKAR, 2014). Os derivados de *A. indica* têm sido qualificados recorrentemente como repelentes e ou inibidores de oviposição de insetos fitófagos (JOSHI; SITARAMAIAH, 1979). Investigações com essa abordagem já foram realizadas para as principais ordens de insetos fitófagos (JOSHI; SITARAMAIAH, 1979; SINGH; SINGH, 1998; SHOWLER; GREENBERG; ARNASON, 2004; KUMAR;

POEHLING; BORGEMEISTER, 2005). Contudo, a atuação dos limonoides alterando o comportamento de seleção hospedeira de insetos fitófagos apresenta incongruências.

O efeito biológico dos limonoides sobre a oviposição dos tefritídeos já foi referido para as espécies de maior importância econômica, *Anastrepha ludens* (Loew) (VALENCIA-BOTÍN et al., 2004), *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (SINGH; SRIVASTAVA, 1983; KHATTAK et al., 2009), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (SINGH; SRIVASTAVA, 1983; CHEN et al., 1996), *Bactrocera zonata* (Saunders) (MAHMOUD; SHOEIB, 2008), *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (SILVA et al., 2012a), *Rhagoletis indifferens* Curran (van RANDEN; ROITBERG, 1998) e *Rhagoletis mendax* Curran (BARRY et al., 2005). Entretanto, falhas dos limonoides do nim em evitar a oviposição das moscas-das-frutas também já foram reportadas em prévios estudos, como para *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (MACHOTA JUNIOR et al., 2013), *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (HIDAYAT et al., 2013), *Rhagoletis indifferens* Curran (van RANDEN; ROITBERG, 1998) e *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (PROKOPY; POWERS, 1995). Esse contraste pode ser resultante das diferenças na composição química dos derivados de nim que são afetados pela origem da planta (variabilidade genética e época de colheita da matéria prima), método de extração, formulação e tempo de prateleira (FORIM et al., 2010; GAHUKAR, 2014; MIRESMAILLI; ISMAN, 2014).

Neste trabalho os estímulos envolvidos na inibição da oviposição de *C. capitata* foram avaliados utilizando a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) determinada em um estudo prévio (capítulo 2). Os mecanismos de inibição da oviposição por insetos utilizando limonoides são pobremente documentados e os estímulos envolvidos na inibição da oviposição de tefritídeos por limonoides ainda não são conhecidos. No presente estudo procurou-se responder quais são os efeitos comportamentais ocasionados pelos limonoides (AzaMax[®]) durante a seleção hospedeira de *C. capitata*. Em primeira instância procurou-se conhecer essa interação para explicar os mecanismos envolvidos na inibição da oviposição dos insetos fitófagos. Adicionalmente, investigou-se a resposta comportamental para subsidiar a adoção de estratégias comportamentais de manejo de moscas-das-frutas em campo.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Insetos e limonoides

A população de *C. capitata* em estudo representa uma população obtida do cruzamento de uma colônia mantida no Instituto Biológico em Campinas, SP, Brasil, desde 1993 (RAGA; SATO, 2006) com uma população coletada em frutos de acerola em um pomar localizado em Petrolina, PE, Brasil (9° 35' S - 40° 67' W), no período de novembro a dezembro de 2012. A moscada *C. capitata* foi criada conforme descrito no item 2.2.1 (Capítulo 2) e os insetos utilizados no estudo foram coletados no intervalo entre a segunda (F2) e a sexta (F6) geração após o cruzamento das populações. Os limonoides, aleloquímicos presentes no produto concentrado emulsionável AzaMax[®], estão detalhados no item 2.2.2 (Capítulo 2).

3.2.2 Etapa 1: observação visual da resposta comportamental de *Ceratitidis capitata* aos limonoides (AzaMax[®])

Nesta etapa foram averiguados os estímulos envolvidos na inibição da oviposição de *C. capitata* pela concentração limiar [100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol)]. O bioensaio foi conduzido em ambiente controlado à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. A parcela foi constituída por uma gaiola (gaiola modelo capítulo 2.2) com três fêmeas férteis (cinco a oito dias de idade) de *C. capitata* e uma uva (*Vitis vinifera* L. cv. Itália) com ou sem limonoides. O bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 15 repetições. Para instalação do experimento os frutos de uva foram individualizados, amarrados em pedaços de barbante e presos numa estrutura metálica para aplicação dos tratamentos. Em seguida, os frutos foram mergulhados individualmente por 15 segundos em um béquer contendo 60 ml de calda com a concentração limiar ou água deionizada. Após serem tratados, os frutos ficaram em repouso por 90 minutos para retirada do excesso de umidade. Posteriormente, um único fruto foi pendurado na parte superior de cada gaiola. Durante 4 h de observação foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: tempo para os insetos iniciarem os movimentos, deslocamento trivial, deslocamento em direção ao hospedeiro, tempo para a primeira visita, número de visitas (pousos), tempo pousado no hospedeiro e execução do comportamento de reconhecimento do hospedeiro (número e tempo de procura no fruto).

3.2.3 Etapa 2: percepção dos limonoides (AzaMax[®]) na superfície do hospedeiro por *Ceratitidis capitata*

Para realização do bioensaio inicialmente as uvas foram divididas (marcadas) em duas partes (metades ou lados) por meio de um pincel marcador permanente. As uvas foram divididas (marcadas) na vertical e na horizontal (Figura 3.2). Nas uvas marcadas na vertical a

concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) foi aplicada em um dos lados por meio de um pincel de pintura. Nas uvas marcadas na horizontal a concentração limiar foi aplicada na metade inferior do fruto (Figura 3.2). A parcela experimental foi constituída por uma uva, tratada verticalmente em um dos lados, tratada horizontalmente na parte inferior ou sem tratamento (controle), e três fêmeas acondicionadas numa gaiola (Figura 3.2). Em cada uva foi avaliado o número de puncturas e de ovos na parte tratada e na parte sem tratamento após 24 h de exposição. O bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 15 repetições.

Figura 3.2 - Esquema do tratamento das uvas para avaliação da percepção dos limonoides (AzaMax[®]) por *Ceratitidis capitata*

3.2.4 Etapa 3: resposta comportamental de *Ceratitidis capitata* após exposição dos quimiorreceptores aos limonoides (AzaMax[®]).

As moscas foram anestesiadas com CO₂ durante 20 segundos e imediatamente imobilizadas com auxílio de uma bomba de vácuo e um suporte para facilitar a aplicação dos tratamentos, sob uma lupa (Figura 3.3). A concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) foi pincelada em diferentes partes do corpo de *C. capitata*: antenas, ovipositor, aparelho bucal, tarso (primeiro par de pernas), tarso (segundo par de pernas), tarso (terceiro par de pernas), todos os tarsos, todas as estruturas e o controle (insetos apenas anestesiados com CO₂). Posteriormente, grupos de três fêmeas tratadas foram expostas a um fruto de uva em gaiolas por 24 h. Foi avaliada a porcentagem de frutos infestados, o número de puncturas por fruto, o número de ovos por fruto e o número de ovos por punctura. O bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 10 repetições.

3.2.5 Análise dos dados

Na etapa 1 os dados foram analisados comparando as médias (tratamento e controle) utilizando o teste t de Student. Na etapa 2 inicialmente as médias referentes aos parâmetros número de puncturas e de ovos por fruto e a porcentagem de bagas infestadas foram submetidos à análise de variância pelo teste F e pelo teste de Tukey. Posteriormente em cada uva a média do número de puncturas e de ovos por fruto e a porcentagem de bagas infestadas foram comparadas utilizando o teste t de Student, conforme os resultados obtidos na metade tratada ou metade controle para as uvas tratadas verticalmente em um dos lados ou tratada horizontalmente na parte inferior. Na etapa 3 os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e pelo teste de Tukey. Os testes de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) foram aplicados para avaliar as pressuposições de homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e normalidade dos resíduos, respectivamente. Na ausência desses pressupostos, os dados foram transformados pelo Método Potência Ótima de Box-Cox (BOX; COX, 1964). Nesse estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa SAS 9.1 de computação estatística (PROC GLM, SAS Institute 2003).

Figura 3.3 - Esquema da imobilização e tratamento de *Ceratitidis capitata* com limonoides (AzaMax[®]). (A) Sistema de imobilização e tratamento das moscas; (B) Suporte de imobilização e fixação das moscas para aplicação dos tratamentos

3.3 Resultados

3.3.1 Etapa 1: observação visual da resposta comportamental de *Ceratitis capitata* aos limonoides (AzaMax[®]).

A resposta comportamental de *C. capitata* está registrada nas Figuras 3.4 a 3.7. Nas gaiolas com uva tratada as moscas iniciaram seus movimentos de forma similar ao controle, ou seja, o tempo para realização do primeiro deslocamento na presença do odor foi semelhante à gaiola com uva sem limonoide, cerca de 60 minutos após o início da observação ($F = 0,98$; $CV = 22,71$; $P = 0,3301$); além disso, não apresentou alteração no deslocamento total, o que resultou em um número semelhante de voos na comparação entre gaiolas com uvas tratadas e uvas controle ($F = 0,28$; $CV = 27,57$; $P = 0,6012$) (Figura 3.4). Contudo, na presença dos limonoides, o deslocamento antes do contato com tais compostos foi significativamente superior às moscas do controle ($F = 5,18$; $CV = 23,99$; $P = 0,0307$), o que se reduziu após o contato de tal forma que os voos apresentaram o mesmo padrão do controle ($F = 0,53$; $CV = 39,98$; $P = 0,4724$) (Figura 3.4).

Os limonoides não influenciaram o número de voos direcionados para o hospedeiro ($F = 0,42$; $CV = 34,85$; $P = 0,5242$). Em contrapartida, a frequência de voos direcionados sem a realização do pouso foi maior na presença dos limonoides que no controle ($F = 12,30$; $CV = 32,24$; $P = 0,0015$), não ocorrendo, todavia, diferença no número de voos direcionados seguidos de pouso ($F = 3,33$; $CV = 31,50$; $P = 0,0789$) (Figura 3.5).

O tempo para realização do primeiro pouso pelas fêmeas foi semelhante independentemente da presença de limonoides ($F = 0,57$; $CV = 28,88$; $P = 0,4584$), mas o tempo que o inseto ficou pousado sobre o hospedeiro apresentou diferença altamente significativa ($F = 35,38$; $CV = 13,11$; $P < 0,0001$), já que as moscas permaneceram 14 minutos na uva controle e apenas um segundo na presença de limonoides (Figura 3.6). Neste estudo essa resposta comportamental foi o principal efeito dos limonoides (AzaMax[®]) sobre *C. capitata*.

A moscamed apresentou o comportamento de procura para reconhecimento do hospedeiro somente na uva controle uma vez que o tempo pousado sobre a fruta com limonoides foi insuficiente para realização dessa etapa da seleção hospedeira, o que acarretou, portanto, maior número de atividades de procura ($F = 13,42$; $CV = 27,16$; $P = 0,0010$) e maior tempo realizando o comportamento de procura ($F = 24,59$; $CV = 31,16$; $P < 0,0001$) nas gaiolas com uvas controle em relação àquelas com limonoides (Figura 3.7).

Figura 3.4 - Comportamento de *Ceratitis capitata* na presença de limonoides (AzaMax[®]) (n = 15). Os frutos foram tratados com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). As barras representam os voos triviais das fêmeas na gaiola. Para análise, os dados do primeiro deslocamento, deslocamento e deslocamento antes do contato com limonoides foram transformados usando $\log_{10}(X)$. Asteriscos indicam diferenças entre barras, Teste t, $**P < 0,05$; enquanto n.s. indica que não houve diferença

Figura 3.5. - Comportamento de *Ceratitidis capitata* na presença de limonoides (AzaMax[®]) (n = 15). Os frutos foram tratados com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). As barras representam os voos das fêmeas direcionados para a fruta hospedeira na gaiola. Asteriscos indicam diferenças entre barras, Teste t, $**P < 0,05$; enquanto n.s. indica que não houve diferença

Figura 3.6. - Comportamento de *Ceratitidis capitata* na presença de limonoides (AzaMax[®]) (n = 15). Os frutos foram tratados com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). (A) As barras representam o tempo gasto para realização do primeiro pouso. (B) As barras representam o tempo pousado sobre a fruta. Os dados de tempo pousado foram transformados usando $\log_{10}(X + 10)$. Asteriscos indicam diferenças entre barras, Teste t, **** $P < 0,0001$; enquanto n.s. indica que não houve diferença

Figura 3.7 - Comportamento de *Ceratitis capitata* na presença de limonoides (AzaMax[®]) (n = 15). Os frutos foram tratados com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). (A) As barras representam o número de comportamentos de procura. (B) As barras representam o tempo gasto no comportamento de procura. Os dados de execução do comportamento de reconhecimento do hospedeiro foram transformados usando SQRT + 100 para o tempo gasto na procura. Asteriscos indicam diferenças entre barras, Teste t, **** $P < 0,0001$

3.2.2 Etapa 2: percepção dos limonoides (AzaMax[®]) por *Ceratitis capitata* na superfície do hospedeiro

Nesta etapa foi registrado com segurança que o período de 24 h é suficiente para que as moscas pousem na fonte de odor e discriminem em relação à presença de limonoides sobre a superfície do fruto hospedeiro. Embora o tratamento de apenas metade da fruta de uva no sentido horizontal ou vertical com a concentração limiar não tenha afetado o número de puncturas realizadas pelas fêmeas ($F = 1,94$; $CV = 19,79$; $P = 0,5250$) e nem o total de frutos infestados ($F = 1,24$; $CV = 37,23$; $P = 0,2973$), verificou-se que o número total de ovos colocados por fruta foi significativamente maior nas frutas sem limonoides ($F = 5,31$; $CV = 104,87$; $P = 0,0077$) (Figura 3.8).

Quando comparadas as duas partes (tratada e não tratada) dos frutos, observa-se uma redução altamente significativa no número de puncturas em frutos tratados tanto no sentido horizontal ($F = 34,61$; $CV = 36,18$; $P < 0,0001$), como no sentido vertical ($F = 33,22$; $CV = 35,63$; $P < 0,0001$). Do mesmo modo, o número de ovos colocados na área tratada também foi drasticamente reduzido tanto no sentido horizontal ($F = 27,80$; $CV = 34,64$; $P < 0,0001$) como no vertical ($F = 20,04$; $CV = 36,22$; $P < 0,0001$). Adicionalmente, considerando as partes tratadas e não tratadas foi verificado que a porcentagem de frutos infestados foi inferior na presença dos limonoides, tanto no tratamento no sentido horizontal ($F = 20,45$; $CV = 35,46$; $P < 0,0001$) como no vertical ($F = 27,92$; $CV = 37,39$; $P < 0,0001$) (Figura 3.9).

Figura 3.8 - Seleção hospedeira por *Ceratitidis capitata* na presença de limonoides (AzaMax[®]) (n = 20). As partes (metade ou lado) dos frutos foram tratadas com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) em sentido vertical (◐) e horizontal (◑). As barras representam o total de puncturas por fruto, ovos por fruto ou frutos infestados independentemente da parte tratada. Para análise, os dados que representam o total de puncturas por fruto, ovos por fruto ou frutos infestados foram transformados usando $\sqrt{x+5}$. Médias seguidas por letras diferentes nas barras são significativamente diferentes (P < 0,05), enquanto n.s. indica que não houve diferença

Figura 3.9. - Seleção hospedeira por *Ceratitis capitata* na presença de limonoides (AzaMax[®]) em experimento com chance de escolha (n = 20). As partes (metade ou lado) dos frutos foram tratadas com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) em sentido vertical (◐) e horizontal (☐). As barras representam o número de puncturas por fruto, de ovos por fruto ou frutos infestados em porcentagem. Para análise, os dados de puncturas por fruto tratado na horizontal e na vertical foram transformados usando $\sqrt{x+1}$. Os dados de ovos por fruto tratado no sentido vertical foram transformados usando $\sqrt{x+5}$. Os dados de ovos por fruto tratado no sentido horizontal foram transformados usando $\sqrt{x+3}$. Os dados de frutos infestados tratados na horizontal e vertical foram transformados usando $\sqrt{x+20}$. Asteriscos indicam diferenças entre barras, Teste t, ** $P < 0,0001$

3.2.3 Etapa 3: resposta comportamental de *Ceratitis capitata* ao efeito dos limonoides (AzaMax[®]) sobre os quimiorreceptores.

Ao contrário da expectativa, o contato das fêmeas com os limonoides anteriormente à seleção hospedeira não alterou a reposta das fêmeas. Assim, não foi observada diferença significativa em relação aos frutos infestados ($F = 1,76$; $CV = 32,43$; $P = 0,0970$), número de puncturas por fruto ($F = 0,77$; $CV = 30,00$; $P = 0,6343$), número de ovos por fruto ($F = 0,32$; $CV = 36,76$; $P = 0,9559$) e o número de ovos por punctura ($F = 1,41$; $CV = 11,68$; $P = 0,2068$), independentemente da forma de contato (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Efeito do contato com os limonoides (AzaMax[®]) sobre a seleção hospedeira de *Ceratitis capitata*.

Estruturas (quimiorreceptores)	Frutos infestados ¹	Punctura/fruto ¹	Ovos/fruto ¹	Ovos/punctura ¹
Antenas	100,0 ± 0,0	8,2 ± 1,8	19,2 ± 4,6	2,4 ± 0,4
Ovipositor	70,0 ± 15,3	5,1 ± 1,6	16,3 ± 4,9	3,5 ± 0,3
Aparelho bucal	100,0 ± 0,0	7,0 ± 1,5	17,2 ± 4,8	2,8 ± 0,5
Tarso (1º par de pernas)	90,0 ± 10,0	7,9 ± 2,5	15,6 ± 3,8	2,8 ± 0,6
Tarso (2º par de pernas)	90,0 ± 10,0	5,9 ± 1,2	17,5 ± 4,7	3,0 ± 0,4
Tarso (3º par de pernas)	100,0 ± 0,0	4,9 ± 0,9	14,9 ± 3,2	3,1 ± 0,7
Todos os tarsos	90,0 ± 10,0	7,1 ± 1,6	12,1 ± 3,0	1,9 ± 0,2
Todas as estruturas	70,0 ± 15,3	4,6 ± 1,2	12,8 ± 4,4	2,3 ± 0,4
Controle (somente anestesiado)	100,0 ± 0,0	7,5 ± 1,3	13,7 ± 3,2	1,9 ± 0,4

¹Não significativo

3.4 Discussão

Os resultados mais promissores para utilização de limonoides do nim no manejo de moscas-das-frutas são relacionados ao tratamento da fase de pré-pupa e pupa reduzindo a emergência dos adultos (STARK et al., 1990; SILVA et al., 2011; ALVARENGA et al., 2012) e a inibição da oviposição (CHEN et al., 1996; SINGH; SINGH, 1998; SILVA et al., 2012a). O efeito de limonoides do nim na seleção hospedeira por insetos fitófagos tem sido reportado principalmente em quatro ordens de insetos: Coleoptera (SHOWLER; GREENBERG; ARNASON, 2004), Diptera (SINGH; SINGH, 1998), Hemiptera (KUMAR; POEHLING; BORGEMEISTER, 2005) e Lepidoptera (JOSHI; SITARAMAIAH, 1979). Até o momento o que pode ser inferido é que os limonoides do nim afetam a seleção hospedeira por insetos fitófagos. Neste estudo foi realizada uma investigação pormenorizada no intuito de averiguar o(s) mecanismo(s) envolvido(s). Compreender a interação envolvendo os limonoides sobre a superfície do fruto hospedeiro e o comportamento de oviposição de *C. capitata* pode fornecer elementos importantes para a adoção de práticas de manejo adequadas destinadas a prevenir ou reduzir os danos às culturas.

A habilidade das fêmeas de *C. capitata* em localizar um hospedeiro satisfatório envolve uma sequência de comportamentos, decisões hierárquicas, em que cada etapa facilita a etapa seguinte (PROKOPY; ROITBERG, 1989; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000; SILVA et al., 2012b). Após a cópula e estando na planta hospedeira, as fêmeas de *C. capitata* exibem uma sequência de comportamentos que são interpretados em termos de “decisões”, que são tomadas à medida que elas acumulam informações sobre o hospedeiro potencial (PROKOPY; ROITBERG, 1989; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000; SILVA et al., 2012b). O comportamento de oviposição de *C. capitata* ocorre em quatro etapas: chegada ao fruto, procura, punctura e arrasto (PROKOPY; ROITBERG, 1989). Neste trabalho foi evidenciado que as moscas perceberam o odor dos limonoides (AzaMax[®]) e aumentaram os movimentos triviais, movimentos aleatórios ou sem direção, antes do contato. O aumento dos movimentos triviais aparenta ser uma nítida inquietação (hiperatividade) em função da irritabilidade ocasionada pelo odor dos limonoides (AzaMax[®]) na pequena gaiola experimental. Em um ambiente aberto isso pode induzir a perda de capacidade de resposta a pistas olfativas e propiciar a dispersão do organismo.

No presente estudo também foi observado que as moscas voam em direção à fonte de odor com a finalidade de reconhecer o hospedeiro, contudo evitam o pouso (primeira etapa da seleção hospedeira: chegada ao fruto). Os resultados da primeira etapa reforçam a teoria que os limonoides são capazes de exercer algum grau de repelência sobre insetos fitófagos. Os

repelentes de insetos funcionam como uma barreira de vapor dissuadindo o contato dos artrópodes com a superfície do hospedeiro (BROWN; HEBERT, 1997). A partir de uma definição rigorosa em que a repelência induz o organismo receptor a movimentar-se em direção oposta à fonte de odor (DETHIER, 1960), imediatamente surgiu o questionamento: Terpenos de alto peso molecular, estruturas complexas e de baixa pressão de vapor são capazes de provocar repelência? Nesse caso o mecanismo de ação é fundamentado com a argumentação de que os limonoides (AzaMax[®]) são capazes de ocasionar repelência quando o organismo receptor está muito próximo da fonte de odor, ou seja, repelência com a detecção do odor a uma curta distância ou mesmo após o contato. Neste estudo foi observado que as moscas voam em direção ao fruto, porém a uma distância de até um centímetro as moscas desviam a rota evitando o pouso, apresentando uma espécie de voo em meia lua como ilustrado na Figura 3.4. Nos casos em que houve o pouso, *C. capitata* permaneceu 14 minutos na uva controle e apenas um segundo na presença de limonoides (AzaMax[®]) (Figura 3.5). Isso é particularmente importante uma vez que o verdadeiro critério está relacionado com o nível de limiar de quimiorrecepção de moléculas repelentes pelos insetos para obter o comportamento desejado (dispersão / fuga). Obviamente, isso pode ocorrer no ambiente se o inseto tem alta sensibilidade para o aleloquímico que provavelmente tem uma concentração da fase de vapor elevada. Do mesmo modo, os aleloquímicos repelentes aos quais os insetos são menos sensíveis ou que têm baixa concentração da fase de vapor (ex: azadiractina e 3-tigloilazadiractol) ocasionará repelência mais perto da superfície ou talvez mesmo por contato. No entanto, em um período de 24 h (fotofase de 14 h) os resultados observados na etapa 2 demonstram que as moscas são capazes de pousar na fonte de odor e, além disso, são capazes de discriminar com alta nitidez a presença dos limonoides (AzaMax[®]) na superfície do fruto hospedeiro (Figura 3.9). Assim, foi verificado que as fêmeas de *C. capitata* possuem uma capacidade excepcional para perceber a presença dos limonoides e explorar as partes livres de azadiractina e do 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) do hospedeiro.

Uma possibilidade adicional de explanação consiste na consideração em que os limonoides (AzaMax[®]) são capazes de mascarar o odor atraente do fruto hospedeiro de tal forma que o inseto evita o pouso. A incapacidade em detectar corretamente os odores do fruto hospedeiro pode impedir o pouso do inseto. Nesse caso, os limonoides (AzaMax[®]) presentes na superfície dos frutos interferem na percepção das uvas por *C. capitata*, sugerindo que os limonoides (AzaMax[®]) interferem na capacidade de *C. capitata* em detectar corretamente a mistura de voláteis emanados pelo hospedeiro (em inglês, *anosmia* ou *hyposmia*). Estudos de olfatométrica demonstraram que a azadiractina interfere na percepção de *Liriomyza*

huidobrensis Blanchard (Diptera: Agromizidae), impedindo a praga de detectar corretamente a mistura de voláteis emanados pelo hospedeiro (FACKNATH; STEWART-JONES; WRIGHT, 2009). Assim como, a presença de derivados de nim em armadilhas com cairomônios reduziu a eficiência de captura de *Diabrotica virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) quando comparado a armadilhas com cairomônio puro, sendo que os derivados de nim afetam a seleção hospedeira de *D. virgifera* em milho (HUMMEL, 1992).

De fato, é perceptível que a repelência inicial não detém o pouso da praga, porém as moscas permanecem sobre o fruto com limonoides (AzaMax[®]) por um tempo diminuto, insuficiente para avaliação e exploração do hospedeiro. Os resultados apontados demonstram que o contato com os limonoides é primordial para alteração do comportamento de oviposição dos insetos em estudo. Os resultados justificam porque a concentração estudada representa um limiar de inibição da oviposição. Nesse caso, o AzaMax[®] com 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) interfere na primeira etapa da seleção hospedeira dificultando a chegada ao fruto e sobretudo interrompe o processo de reconhecimento do hospedeiro após o pouso (segunda etapa da seleção hospedeira: procura). Após o pouso na planta, o sucesso da oviposição de *C. capitata* depende da execução de uma série de cascatas comportamentais para aceitação do hospedeiro. Na chegada ao fruto, a fêmea utiliza, à curta distância, estímulos visuais e avalia o fruto quanto ao seu tamanho, cor e formato (PROKOPY; ROITBERG, 1984). Durante a procura, a fêmea percorre toda a superfície do fruto, tocando-o com a parte anterior da cabeça, o labelo e o sintergosternito 7 (bainha do ovipositor). Nessa etapa, a fêmea analisa as características físicas (tamanho e formato) e químicas do fruto (PROKOPY; ROITBERG, 1989; YUVAL; HENDRICH, 2000; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000). Para fazer a punctura, a fêmea insere o acúleo na polpa do fruto, mantendo a “bainha do ovipositor” em posição perpendicular à superfície (YUVAL; HENDRICH, 2000; DÍAZ-FLEISCHER et al., 2000). A deposição de ovos não é obrigatória, e, em alguns casos, a fêmea retira o acúleo sem ovipositar, fazendo, portanto, apenas a punctura (SILVA et al., 2012b). No presente estudo, a chegada ao fruto (pouso) foi influenciada pela presença dos limonoides e o comportamento de procura não foi realizado após o contato com os limonoides (AzaMax[®]).

A moscamed apresenta alta mobilidade intrínseca e fatores negativos do ambiente podem contribuir significativamente para a dispersão da espécie. Neste estudo foi identificado que a repelência é um mecanismo de ação chave para inibição da oviposição de *C. capitata* com a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) em frutos de uva. Imediatamente após a exposição as moscas conseguem perceber o odor dos limonoides apresentando sinais de inquietação (irritação). Os dados

registrados apontam que o organismo é estimulado a se dispersar numa distância de percepção do odor muito próxima do hospedeiro ou mesmo após o contato com o hospedeiro. Neste caso, a dispersão é promovida também por um efeito estimulante locomotor ou, em outras palavras, em função do efeito repelente após o contato. Em suma, é possível caracterizar que a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) impede que o hospedeiro seja reconhecido pela praga em função dos estímulos que promovem a inquietação (irritação), locomoção e consequente dispersão da praga. A concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) inibe completamente a oviposição da fêmea em um intervalo de 24 h (capítulo 2), contudo, como demonstrado neste estudo, não impede a oviposição quando o inseto é exposto de forma pontual, ou seja, quando as diferentes partes do corpo com quimiorreceptores são expostas aos limonoides (AzaMax®). Assim, a concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) não é capaz de saturar os quimiorreceptores de tal forma que promova a inibição da oviposição por um intervalo de 24 h, demandando proteção contínua dos frutos. Neste caso, o ideal seria a utilização dos limonoides em pomares de fruteiras que não possuam populações residentes de *C. capitata* e ou apresentam uma baixa taxa de crescimento populacional para minimizar a pressão de seleção e evitar a perda da tecnologia, como proposto por Silva et al. (2012a). Adicionalmente, convém ressaltar que a simples presença de 100 (28,5) ppm de azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) em metade do fruto hospedeiro reduz o número de ovos colocados por *C. capitata*, porém a porcentagem de bagas infestadas não difere do controle. Portanto, numa condição de campo a proteção das frutas depende de uma pulverização eficiente e especificamente no caso das uvas indica-se o banho do cacho de forma uniforme. Recentemente, em um pomar de cereja foi demonstrado que iscas contendo derivados de nim foram efetivas na redução da infestação de *Rhagoletis cerasi* L., provavelmente como resultado da inibição da oviposição (BÖCKMANN et al. 2014). Essa estratégia é fortemente recomendada uma vez que não foi constatada aprendizagem pelas fêmeas em estudos anteriores (ver SILVA et al., 2012a). Para viabilização da utilização dos limonoides (AzaMax®) como estratégia de manipulação comportamental sugere-se validar o efeito em campo averiguando a proteção do parreiral por azadiractina e 3-tigloilazadiractol (AzaMax®) contra *C. capitata* e, além disso, é importante avaliar a atividade biológica residual da azadiractina e do 3-tigloilazadiractol (AzaMax®) sobre *C. capitata* numa condição de campo.

Referências

- ALVARENGA, C.D.; FRANÇA, W.M.; GIUSTOLIN, T.A.; PARANHOS, B.A.J.; LOPES, G.N.; CRUZ, P.L.; BARBOSA, P. R.R. Toxicity of neem (*Azadirachta indica*) seed cake to larvae of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid, *Diachasmimorphalongicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 57-62, 2012.
- BROWN, M.; HEBERT, A.A. Insect repellents: an overview. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 36, p. 243-249, 1997.
- BARRY, J.D.; SCIARAPPA, W.J.; TEIXEIRA, L.A.F.; POLAVARAPU, S. Comparative effectiveness of different insecticides for organic management of blueberry maggot (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, p.1236-1241, 2005.
- 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.
- BOCKMANN, E.; KOPPLER, K.; HUMMEL, E.; VOGT, H. Bait spray for control of European cherry fruit fly: an appraisal based on semi-field and field studies. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, p. 502-509, 2014.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 26, n. 2, p. 211-252, 1964.
- CHEN, C.; DONG, Y.; CHENG, L.; HOU, R.F. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in guava. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 462-466, 1996.
- DETHIER, V. G.; BROWN, L. B.; SMITH, C. W. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 53, p. 134-136, 1960.
- DÍAZ-FLEISCHER, F.; PAPAÍ, D.R.; PROKOPY, R.J. NORRBOM, A.L.; ALUJA, M. Evolution of fruit fly oviposition behavior. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A.L. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution behavior**. Boca Raton: CRC Press, 2000. chap. 30, p. 811-841.
- FACKNATH, S.; STEWART-JONES, A.; WRIGHT, D.J. Neem chemicals disturb the behavioral response of *Liriomyza huidobrensis* to conspecific-induced potato volatiles. **Pure Applied Chemistry**, Oxford, v. 81, n. 1, p. 85–95, 2009.
- FORIM, M.R.; DA SILVA, M.F.G.F.; CASS, Q.B.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. **Analytical Methods**, London, v. 2, p. 860-869, 2010.
- FÜRSTENBERG-HÄGG J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. 2013. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 14, p. 10242-10297.

GAHUKAR, R.T. Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control: A review. **Crop Protection**, Guildford, v. 62, p. 93-99, 2014.

HUMMEL, H.E. Neem extracts reduce *Diabrotica* beetle population in *Zea mays* fields and disrupt chemical communication with host plant kairomones: invitation for biotechnical research and application. In: KLEEBERG, H. (Ed.). WORKSHOP, 2., 1992. Wetzlar, Germany, **Proceedings...** Wetzlar, Germany, Trifolio-M GmbH, Lahnau. 1992. 30th Nov.–2nd Dec. 1992. p. 145–148.

HIDAYAT, Y.; HEATHER, N.; HASSAN, E. Repellency and oviposition deterrence effects of plant essential and vegetable oils against female Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). **Australian Journal of Entomology**, Brisbane, v. 52, p. 379-386, 2013.

JOSHI, B.G.; SITARAMAIAH, S. Neem kernel as an ovipositional repellent for *Spodoptera litura* (F.) moths. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 7, p. 199-202, 1979.

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

KHATTAK, M.K.; RASHID, M.M.; ABDULLAH, K. Effect of neem derivatives on infestation, settling and oviposition of melon fruit fly (*Bactrocera cucurbitae* Coq.) (Tephritidae: Diptera). **Pakistan Entomologist**, Faisalabad, v. 31, p. 11-16, 2009.

KUMAR, P.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Hom., Aleyrodidae) on tomato plants. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, p. 489-497, 2005.

MACHOTA JUNIOR, R.; FORMOLO, R.; BERNARDI, D.; BOTTON, M.; RUFATO, L. Efeito de inseticidas sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) em uva de mesa 'Itália' sob cultivo protegido. **Investigación Agraria**, Santiago de Chile, v. 15, p. 113-120, 2013.

MAHMOUD, M.F.; SHOEIB, M.A. Sterilant and oviposition deterrent activity of neem formulation on peach fruit fly *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Biopesticides**, Tamil Nadu, v. 1, p. 177-181, 2008.

MIRESMAILLI, S.; M.B. ISMAN. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, p. 29-35, 2014.

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

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

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

RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 913-920, 2010.

RAGA, A.; SATO, M.E. Time-mortality for fruit flies (Diptera: Tephritidae) exposed to insecticides in laboratory. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 73, p. 73-77, 2006.

SAS INSTITUTE. 2003. Statistical Analysis System, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.

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

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

SILVA, M.A.; ALVARENGA, C.D.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; MASTRANGELO, T.; LOPES-MIELEZRSKI, G.N.; GIUSTOLIN, T. Toxic effects of neem seed cake on the larval-pupal (prepupal) stage of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Fruits**, Paris, v. 66, p. 363–369, 2011.

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T. Inhibition of oviposition by neem extract: a behavioral perspective for the control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 333-337, 2012a.

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; MASTRANGELO, T. 2012b. The host marking pheromone application on the management of fruit flies - a review. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, p. 835-842, 2012b.

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

SINGH, R.P.; SRIVASTAVA, B.G. Alcohol extract of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil as oviposition deterrent for *Dacus cucurbitae* (Coq.). **Indian Journal of Entomology**, New Delhi, v. 45, p. 497-498, 1983.

STAM, J.M.; KROES, A.; LI, Y.; GOLDS, R.; Van LOON, J.J.A.; Poelman, E.H.; Dicke, M. Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 689-713, 2014.

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

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

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

VENDRAMIM, J.D., GUZZO, E.C. Plant resistance and insect bioecology and nutrition. In: PANIZZI, A.R. ; PARRA, J.R.P (Ed.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management.**, Boca Raton: CRC, 2012. p. 657-685.

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

4 TESTE DE CAMPO DOS LIMONOIDES (AZAMAX[®]) CONTRA A INFESTAÇÃO DA MOSCAMED NO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO

Resumo

A meia vida curta dos limonoides atrelado ao fato de que poucas investigações foram conduzidas em campo visando à utilização de limonoides no manejo de pragas traduz a urgência na realização de estudos dessa natureza. No presente estudo avaliou-se a proteção de um parreiral de uva pelos limonoides azadiractina e 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) contra *Ceratitis capitata*. Posteriormente, em um bioensaio com infestação artificial foi avaliada a atividade biológica residual desses limonoides (AzaMax[®]) sobre *C. capitata* em parreiral de uva. A capacidade de proteção do parreiral pelos limonoides sob pressão de infestação por *C. capitata* selvagem foi subestimada em função da baixa populacional natural no período experimental. Na presença de limonoides não foi detectada infestação com 5 e 15 dias após a aplicação (DAP), contudo esses resultados foram semelhantes aos observados nos controles. No bioensaio com infestação artificial foi demonstrada mortalidade superior com a exposição de *C. capitata* a concentrações a partir de 300 ppm de azadiractina (+ 85,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) com 0 DAP. Nessa concentração o efeito letal não perdurou após três dias, todavia a mortalidade foi persistente quando foram pulverizados 500 ppm de azadiractina (+ 143 ppm de 3-tigloilazadiractol) sobre os frutos e expostos às moscas até 3 DAP. Apesar de ocasionarem mortalidade sobre *C. capitata* os limonoides não evitaram que os cachos ou frutos de uva fossem infestados e ou injuriados. Para o manejo de *C. capitata* utilizando limonoides do nim são necessárias investigações adicionais, com especial referência aos períodos de pico populacional da praga.

Palavras-chave: *Ceratitis capitata*; *Azadirachta indica*; Inibição da oviposição; *Vitis vinifera*

Abstract

The short half-life of limonoids tied to the fact that few investigations have been conducted on the field aiming the use of limonoids in pest management reflects the urgency in conducting such studies. In the present study we evaluated the protection of the vineyard by limonoids, azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol (AzaMax[®]), against *Ceratitis capitata*. Subsequently, in a bioassay with artificial infestation was assessed residual biological activity of limonoids (AzaMax[®]) on *C. capitata* in vineyard. The capacity to protect the vineyard by limonoids under pressure of infestation by *C. capitata* wild was underestimated due to the low natural population during the trial period. In the presence of limonoids was not detected infestation with 5 and 15 days after application (DAP), however these results were similar to those observed in controls. In bioassay with artificial infestation was demonstrated a higher mortality of *C. capitata* with exposure to concentrations from 300 ppm of azadirachtin (+ 85.5 ppm of 3-tigloylazadirachtol) with 0 DAP. In this concentration the lethal effect did not persist after three days, however, the mortality was persistent when 500 ppm of azadirachtin (+ 143 ppm 3-tigloylazadirachtol) was sprayed upon the fruit and the exposed flies to 3 DAP. Although the limonoids cause mortality on *C. capitata*, they do not prevent the infestation and or injury on grape clusters or fruits. For the management of *C. capitata* using neem limonoids further investigations are needed, with special reference to periods of peak population of the *C. capitata*.

Keywords: *Ceratitis capitata*; *Azadirachta indica*; Oviposition inhibition; *Vitis vinifera*

4.1 Introdução

Os polos de exportação de frutas frescas do Brasil são localizados principalmente na região Nordeste, especialmente nos vales do Rio São Francisco, Açu, Jaguaribe e Parnaíba. Nos perímetros irrigados as principais culturas exploradas são acerola (*Malpighia glabra* L.), banana (*Musa* spp.), goiaba (*Psidium guajava* L.), manga (*Mangifera indica* L.), melão (*Cucumis melo* L.) e uva (*Vitis vinifera* L.). A uva é a fruta que proporciona maior receita e praticamente a totalidade das uvas exportadas são oriundas do polo de Juazeiro e Petrolina. Nessa região os vinhedos desenvolvem numa condição permanentemente quente acelerando os processos fisiológicos de tal forma que a propagação é muito rápida e a primeira produção ocorre depois de um ano e meio (TEIXEIRA et al., 2007). Com irrigação e tratos culturais adequados é possível produzir uvas em qualquer época do ano, permitindo 2,5 ciclos de produção por ano (TEIXEIRA et al., 2007). A técnica de produção de frutas apresenta alto nível tecnológico e o principal entrave para garantia da qualidade e mercado internacional é a segurança fitossanitária, sobretudo no que se refere à presença da mosca-do-mediterrâneo (moscamed), *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). A moscamed ocorria em baixa frequência no Nordeste do Brasil, sendo inicialmente restrita às áreas urbanas (MALAVASI et al., 1980; HAJI et al., 1991). Com o surgimento de plantações extensas de hospedeiros, houve aumento expressivo da população de moscamed em áreas de produção, principalmente no vale do Rio São Francisco no polo de Petrolina e Juazeiro (HAJI et al., 1991; 2005). Nessa região, *C. capitata* coloniza hospedeiros primários (ex: acerola e goiaba) cultivados no perímetro de irrigação e as fêmeas se dispersam para os parreirais e ovipositam nas uvas. Nessas circunstâncias a aplicação de substâncias com propriedades que alteram o comportamento de insetos pode reduzir a entrada de fêmeas (visitas) no parreiral, o pouso e contato com o hospedeiro e principalmente a infestação das frutas. Esse cenário é uma oportunidade para a utilização de inseticidas botânicos como fonte de estímulos para manipular o comportamento da moscamed (SILVA et al., 2012).

Inseticidas botânicos podem servir como uma alternativa para o manejo de pragas uma vez que são seguros, biodegradáveis e estão prontamente disponíveis em muitas áreas do mundo (LE MOS et al., 2011; GRDISA; GRSIC, 2013). Os limonoides, encontrados nos derivados de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (Sapindales: Meliaceae), são indicados para proteção de plantas (BEZERRA-SILVA et al. 2012). A utilização de produtos à base de limonoides começou a ter impacto comercial recentemente (KHATER et al., 2012). Atualmente, são conhecidas mais de 100 formulações comerciais à base de derivados de nim no mundo (KHATER et al., 2012). A segurança do meio ambiente é considerada o fator

primordial para o emprego de limonoides em campo. Os limonoides apresentam seletividade para vários predadores e parasitoides (MOMANYI et al., 2012) e efeito reduzido sobre organismos polinizadores (AKCA et al., 2009) e mamíferos (BOEKE et al., 2004). Os derivados de nim possuem grande diversidade de efeitos sobre insetos-praga, incluindo efeitos fisiológicos (ex: regulação do crescimento e esterilidade) e inibição da seleção hospedeira (ex: inibição da alimentação e oviposição) (SILVA et al., 2013ab). A azadiractina e o 3-tigloilazadiractol, limonoides presentes nos derivados de nim, são um exemplo bem documentado de terpenoides que ocasionam efeitos fisiológicos e inibição da seleção hospedeira (TAN; LUO, 2011; SENTHIL-NATHAN, 2013). Outros limonoides presentes nos derivados dessa planta também apresentam ambos os efeitos (MORGAN, 2009; TAN; LUO, 2011). Os limonoides podem ser utilizados para proteção de muitas culturas e contra uma alta diversidade de pragas (MORGAN, 2009; TAN; LUO, 2011), porém estudos em campo são escassos.

Uma série de investigações tem demonstrado que existem perspectivas de emprego de derivados do nim no manejo de moscas-das-frutas em campo. Os resultados mais promissores são referentes à inibição da oviposição (CHEN et al., 1996; SINGH; SINGH, 1998; VALENCIA-BOTÍN et al., 2004; SILVA et al., 2012). Recentemente, em pomares de mirtilo e cereja foi demonstrado que pulverizações contendo derivados de nim foram efetivas na redução da infestação de *Rhagoletis mendax* Curran (BARRY et al., 2005) e *Rhagoletis cerasi* L. (BÖCKMANN et al. 2014), respectivamente, provavelmente como resultado da inibição da oviposição. Para *C. capitata* essa estratégia é fortemente recomendada uma vez que o aprendizado por fêmeas não foi observado em prévios estudos (SILVA et al., 2012). Entretanto, a baixa persistência dos derivados de nim no ambiente e a ausência de padronização em relação à reprodutibilidade da eficácia agrônômica são entraves para sua utilização nos parreirais. Nesse contexto, com o estabelecimento da concentração limiar que inibe completamente a oviposição da mosca em frutos de uva procurou-se padronizar a reprodutibilidade da eficácia agrônômica (Capítulo 2). A concentração limiar de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) presente no AzaMax[®] impede que o hospedeiro seja reconhecido pela praga em função dos estímulos que promovem a inquietação (irritação), locomoção e consequente dispersão da praga. Neste estudo, em que se pretende validar os resultados com AzaMax[®] em uma situação de campo, avaliou-se a proteção do parreiral de uva pelo uso de azadiractina e 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) contra moscas-das-frutas selvagens abordando a estratégia de manipulação comportamental. Além disso, foi

examinada a atividade biológica residual da azadiractina e 3-tigloilazadiractol (AzaMax[®]) sobre *C. capitata* numa condição de campo.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Insetos e limonoides

As fêmeas de *C. capitata* utilizadas no bioensaio para avaliação da atividade residual dos limonoides foram obtidas da décima segunda geração mantida em laboratório. A população da moscamed em estudo foi obtida do cruzamento das populações de uma colônia (amostra de aproximadamente 1.000 pupas) mantida no Instituto Biológico em Campinas, SP, Brasil, desde 1993 (RAGA; SATO, 2006) com uma população (amostra de aproximadamente 1.000 pupas) coletada em frutos de acerola em um pomar localizado em Petrolina, PE, Brasil (9° 35' S - 40° 67' W) no período de novembro a dezembro de 2012. A moscamed *C. capitata* foi criada conforme descrito no item 2.2.1 (Capítulo 2).

Os limonoides, aleloquímicos presentes no produto concentrado emulsionável AzaMax[®], estão detalhados no item 2.2.2 (Capítulo 2).

4.2.2 Caracterização da área de estudo

Os experimentos de campo foram realizados em um parreiral de uva (*Vitis vinifera* L. cultivar Itália Muscat ou Itália melhorada) na Fazenda Santana localizada no projeto de irrigação Senador Nilo Coelho no vale do Rio São Francisco em Petrolina, PE, Brasil (Latitude: 9°16'6,99" S e Longitude: 40°23'51,7" O) (Figura 4.1). O parreiral é localizado 373,4 m acima do nível do mar e possui oito anos de implantação em espaçamento de três metros entre fileiras e dois metros entre plantas. Durante o experimento a temperatura média foi de 27,5 °C com máxima de 34,1 °C e mínima de 22,9 °C, a umidade média relativa do ar foi de 53,86 %, a precipitação pluviométrica média foi de 1,0 mm, a insolação média foi de 6,5 h enquanto a radiação solar média foi de 551,1 ly/dia e a velocidade do vento foi de 226,0 km/dia [dados obtidos na estação agrometeorológica da Embrapa Semiárido, no projeto Bebedouro, Petrolina, PE (Latitude: 9° 9' S e Longitude: 40° 22' O)].

Figura 4.1 - Localização da área de estudo. A faixa verde com borda amarela indica a etapa 1. A faixa vermelha indica a etapa 2

Os dados históricos do monitoramento de *C. capitata* utilizando armadilha Mcphail e Jackson na Fazenda Santana estão expostos na Figura 4.4. As armadilhas foram instaladas no parreiral a uma distância de aproximadamente 50 m da área experimental. Os experimentos foram instalados entre as semanas cinco e nove de 2014 (26/01/2014 a 22/02/2014), sendo que a poda de produção foi realizada cerca 75 a 90 dias antes da instalação dos experimentos.

4.2.3. Teste de campo 1: proteção do parreiral de uva com limonoides (AzaMax[®])

Nesta etapa foi averiguada a capacidade de proteção dos parreirais de uva pelos limonoides sob pressão de infestação por *C. capitata* selvagem em condições de campo. A área experimental (3.960 m²) foi implantada em 2006 com espaçamento de três metros entre fileiras (ruas ou linhas) e dois metros entre plantas compreendendo 660 plantas de uva em seis fileiras com 110 plantas cada (Figura 4.2). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições versus três tratamentos: AzaMax[®] (100 ppm de azadiractina + 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol), controle interno e controle externo, os dois últimos sem pulverização.

Figura 4.2 - Esquema para avaliação da proteção do parreiral de uva com limonoides (AzaMax[®])

O bioensaio foi realizado em uma área retangular com 18,0 x 220,0 m cujas fileiras de plantas nas extremidades foram consideradas bordaduras não tratadas da área experimental (Figura 4.2). O controle externo foi alocado perto das margens esquerda e direita (duas

repetições em cada extremidade) e só depois de sete fileiras de plantas de cada lado, as parcelas experimentais com limonoides e controle interno foram distribuídas (Figura 4.2). O controle externo foi adotado com intuito de reduzir o grau de influência dos limonoides sobre a área controle. Cada parcela possuía 168 m² com 28 plantas (quatro fileiras com sete plantas), onde 10 plantas na região central foram consideradas plantas úteis e o restante foi considerado borda da parcela experimental (Figura 4.2). Após 90 dias da poda de produção, os limonoides foram pulverizados sobre os cachos com auxílio de um pulverizador Guarany de alta pressão (até 300 psi) e pulverização ultrafina com capacidade para 5 L. Durante o período do experimento foram realizadas cinco amostragens em intervalos de 5 dias (0, 5, 10, 15 e 20 dias após a pulverização - DAP). Durante cada amostragem foram coletados três cachos por parcela experimental, onde foram obtidos em média cerca de um quilo de frutas e em cada tratamento foram amostrados cerca de 150 frutos por coleta (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Amostra de frutos de uva em teste de campo para avaliação da proteção do parreiral de uva com limonoides (Azamax[®])

	Parâmetros	Controle interno	Controle externo	Limonoides
Primeira amostra 0 DAP ¹	Número de frutos	191,3 ± 10,5	164,0 ± 8,9	153,0 ± 11,8
	Peso dos frutos (g)	1149,0 ± 64,0	1002,5 ± 53,6	997,0 ± 78,6
Segunda amostra 5 DAP	Número de frutos	133,0 ± 15,0	173,0 ± 29,0	146,5 ± 17,2
	Peso dos frutos (g)	877,5 ± 101,5	1106,0 ± 175,8	928,5 ± 81,3
Terceira amostra 10 DAP	Número de frutos	161,7 ± 7,4	171,7 ± 22,2	137,0 ± 7,8
	Peso dos frutos (g)	1174,5 ± 65,8	1205,5 ± 115,5	1019,0 ± 43,2
Quarta amostra 15 DAP	Número de frutos	161,7 ± 7,4	171,7 ± 22,2	137,0 ± 7,8
	Peso dos frutos (g)	1174,5 ± 65,8	1205,5 ± 115,5	1019,0 ± 43,2
Quinta amostra 20 DAP	Número de frutos	134,5 ± 10,4	156,0 ± 15,4	144,2 ± 8,7
	Peso dos frutos (g)	1173,5 ± 98,9	1240,0 ± 221,2	1084,5 ± 79,0

¹DAP: Dias após a pulverização

Os frutos coletados foram contados, pesados e acondicionados individualmente em recipientes plásticos de 50 ml (Tabela 4.1). Após 10 dias o exame da polpa dos frutos foi realizado e as larvas foram quantificadas. A amostragem dos frutos foi realizada cinco vezes em intervalos de cinco dias (0; 5; 10; 15 e 20 dias após a aplicação). Os parâmetros analisados

foram: a porcentagem de frutos infestados, o número de larvas por fruto e o número de larvas por kg de fruto.

4.2.4 Teste de campo 2: persistência da atividade biológica dos limonoides (AzaMax[®]) sobre *Ceratitis capitata*

Nesta etapa foi averiguada a atividade biológica residual dos limonoides em condições de campo. Inicialmente as uvas foram protegidas com gaiolas de tule e em seguida foram tratadas com antecedência e mantidas à temperatura, umidade relativa do ar e fotofase ambiente (Figura 4.3). Posteriormente, as uvas foram expostas por 24 h para as moscas em diferentes períodos residuais (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias após o tratamento) e concentrações de limonoides [Controle - 0 ppm, 100 (+ 28,5), 300 (+ 85,5) e 500 (+ 143) ppm de azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol)]. Cada parcela experimental foi constituída por uma gaiola de tecido tule com duas aberturas com velcro na parte superior e inferior, um cacho de uva e oito fêmeas sexualmente maduras (Figura 4.3).

Neste experimento somente as uvas foram expostas às fêmeas, portanto não foi disponibilizada fonte de alimento e água adicional. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 24 tratamentos (quatro concentrações versus seis períodos residuais) e cinco repetições. Os parâmetros avaliados nos experimentos foram número de frutos infestados, número de puncturas por fruto, número de ovos por fruto e a porcentagem de mortalidade das fêmeas (%). Posteriormente foi obtido o índice de infestação (II) utilizando-se as fórmulas: $II = (\text{número de larvas} / \text{fruto}) \times 100$ e $II = (\text{número de larvas} / \text{kg de fruto}) \times 100$.

.2.5 Análise dos dados

No teste de campo 1 os índices de infestação obtidos para cada tratamento (limonoides, controle interno ou externo) foram comparados conforme a análise de variância pelo teste F e quando detectada diferença significativa o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias. No teste de campo 2 a mortalidade dos insetos e os índices de infestação foram submetidos à análise de variância pelo teste F e pelo teste de Tukey, sob esquema fatorial 6 x 4, sendo os fatores constituídos por seis períodos residuais (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias após aplicação) e os tratamentos (três concentrações de limonoides e um controle). Os testes de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) foram aplicados para avaliar as pressuposições de homocedasticidade de variâncias dos tratamentos e a normalidade dos resíduos, respectivamente. Na ausência desses pressupostos, os dados foram

transformados pelo Método Potência Ótima de Box-Cox (BOX; COX, 1964). Neste estudo, as análises foram realizadas utilizando o programa SAS 9.1 de computação estatística (PROC GLM, SAS Institute 2003).

Figura 4.3. Procedimentos da etapa 2. (A) Acondicionamento dos cachos de uva em gaiolas. (B) Cacho de uva pulverizado. (C) Liberação das fêmeas de *Ceratitidis capitata*.

4.3 Resultados

4.3.1. Teste de campo 1: proteção do parreiral de uva com limonoides (AzaMax®)

Os resultados do monitoramento de moscas-das-frutas utilizando armadilha McPhail e Jackson em parreiral de uva na Fazenda Santana, durante o bioensaio, evidenciam baixa população natural de *C. capitata* na área experimental (Figura 4.4).

A capacidade de proteção dos parreirais de uva pelos limonoides sob pressão de infestação por *C. capitata* selvagem em condições de campo foi subestimada em função da baixa populacional natural no período experimental do teste de campo 1 (Figuras 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7). No controle externo foi verificada infestação dos frutos aos 0, 5, 10 e 15 DAP (dias após a pulverização) (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7). Na presença de limonoides não foi detectada infestação em dois momentos distintos: 5 e 15 DAP. Contudo, no presente estudo os resultados observados para a porcentagem de frutos infestados (Figura 4.5), o número de larvas por fruto (Figura 4.6) e ou o número de larvas por kg de fruto (Figura 4.7) foram semelhantes na presença dos limonoides e nos controles externo e interno.

Figura 4.4 - Captura de *Ceratitis capitata* em armadilha McPhail e Jackson em parreiral de uva na Fazenda Santana. (A) Período de 2013/2014. (B) Índice MAD nas cinco semanas de estudo. Fonte: Biofábrica Moscamed Brasil, 2014

Figura 4.5 - Porcentagem de frutos infestados com larvas em infestação natural de *Ceratitis capitata* em parreiral de uva tratado com 100 ppm de azadiractina + 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol (AzaMax®). Para análise, os dados de frutos infestados em 0 DAP, 5 DAP, 10 DAP e 15 DAP foram transformados usando $1/\text{SQRT}(X + 0,1)$, $1/\text{SQRT}(X)$, $1/\text{SQRT}(X + 0,5)$ e $1/(X + 3)$ respectivamente. Na amostragem aos 20 dias DAP não foi verificada infestação. DAP = Dias após a pulverização

Figura 4.6 - Número de larvas por fruto em infestação natural de *Ceratitidis capitata* em parreiral de uva tratado com 100 ppm de azadiractina + 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol (AzaMax®). Para análise, os dados de frutos infestados em 0 DAP, 5 DAP, 10 DAP e 15 DAP foram transformados usando $1/\text{SQRT}(X + 0,001)$, $1/X$, $1/X + 0,01$ e $1/X + 0,01$ respectivamente. Na amostragem aos 20 DAP não foi verificada infestação. DAP = Dias após a pulverização

Figura 4.7 - Número de larvas por kg de fruto em infestação natural de *Ceratitidis capitata* em parreiral de uva tratado com 100 ppm de azadiractina + 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol (AzaMax®). Para análise, os dados foram transformados usando $1/\text{SQRT}(X + 0,1)$, $1/\text{SQRT}(X)$, $1/\text{SQRT}(X + 0,001)$ e $1/\text{SQRT}(X + 0,001)$ respectivamente. Na amostragem aos 20 DAP não foi verificada infestação. DAP = Dias após a pulverização

4.3.2 Teste de campo 2: persistência da atividade biológica dos limonoides (AzaMax[®]) sobre *Ceratitis capitata*

No experimento para avaliação da persistência da atividade biológica dos limonoides pulverizados sobre os frutos de uva foi constatada interação significativa do tempo após pulverização versus concentração quando o parâmetro mortalidade das fêmeas de *C. capitata* foi avaliado (Tabela 4.2).

A mortalidade foi significativamente superior com a exposição de *C. capitata* à concentração a partir de 300 ppm de azadiractina (+ 85,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) imediatamente após a aplicação (0 DAP). Nessa concentração o efeito letal não perdurou após três dias, todavia a mortalidade foi persistente quando foram pulverizados 500 ppm de azadiractina (+ 143 ppm de 3-tigloilazadiractol) sobre os frutos e expostos às moscas até 3 DAP. Em contrapartida a partir dos 6 DAP, as moscas não foram afetadas pelos limonoides (AzaMax[®]) (Tabela 4.2).

A mortalidade registrada imediatamente após a aplicação (0 DAP) foi superior à mortalidade observada com 3, 12 e 15 DAP e semelhante à registrada com 6 e 9 DAP quando foram pulverizados 300 ppm de azadiractina (+ 85,5 ppm de 3-tigloilazadiractol). Por outro lado, no controle, bem como com 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) e com 500 ppm de azadiractina (+ 143 ppm de 3-tigloilazadiractol), a mortalidade foi semelhante nos diferentes períodos residuais em estudo (0 a 15 DAP) (Tabela 4.2).

Neste experimento não foi constatada interação significativa do tempo após pulverização versus concentração quando a porcentagem de cachos com injúrias pelas puncturas e infestação por ovos foi avaliada (Tabela 4.3).

Os limonoides (AzaMax[®]) apesar de ocasionarem mortalidade sobre *C. capitata* não evitaram que os cachos de uva fossem injuriados pelas fêmeas (Tabela 4.3). Em praticamente todos os cachos pelo menos uma uva apresentou injúrias resultantes das puncturas realizadas por *C. capitata*, e assim, os resultados registrados na ausência de limonoides foram semelhantes aos constatados na presença destes (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 - Mortalidade (%) de *Ceratitis capitata* em teste de campo para avaliação da persistência biológica dos limonoides (AzaMax[®])

DAP	Azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) em ppm ^{1,2}				F	CV	P
	0 ¹	100 (+ 28,5)	300 (+ 85,5)	500 (+ 143)			
0	0,0 ± 0,0 aB	32,5 ± 19,2 aAB	82,5 ± 9,4 aA	63,9 ± 15,1 aA	7,69	20,20	0,0021
3	0,0 ± 0,0 aB	7,3 ± 3,3 aB	7,5 ± 5,0 bB	52,5 ± 18,3 aA	6,24	18,42	0,0052
6	0,0 ± 0,0 aA	27,5 ± 10,8 aA	32,5 ± 15,6 abA	12,5 ± 7,9 aA	2,07	19,44	0,1447
9	0,0 ± 0,0 aA	5,0 ± 3,1 aA	22,5 ± 19,5 abA	44,3 ± 18,1 aA	2,24	25,40	0,1235
12	0,0 ± 0,0 aA	0,0 ± 0,0 aA	17,5 ± 14,6 bA	20,7 ± 9,5 aA	1,63	17,74	0,2212
15	0,0 ± 0,0 aA	2,5 ± 2,5 aA	21,9 ± 13,9 bA	21,2 ± 11,7 aA	1,65	18,41	0,2181
F	0,00	2,26	3,72	2,17			
CV	0,00	18,35	23,62	23,05			
P	0,00	0,0804	0,0124	0,0919			
	Fator	GL	F	P			
	Concentração (C)	3	13,95	<0,0001			
	DAP	5	5,50	0,0002			
	C x DAP	15	1,91	0,0310			

¹Os resultados obtidos no controle em 0 DAP foi extrapolado para os demais controles nas análises. ²Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P <0,05).

A porcentagem de cachos infestados foi semelhante na presença ou ausência de limonoides ao longo do período residual em estudo, portanto, desde 0 a 15 DAP, a presença de limonoides não isentou os cachos da infestação da praga uma vez que os resultados foram iguais aos obtidos no controle (Tabela 4.3). Contudo, na presença de 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) foi verificada uma variação da infestação ao longo do tempo, uma vez que a porcentagem de cachos infestados com 6 DAP foi significativamente menor quando comparado ao período imediatamente inferior (3 DAP) e após 12 e 15 DAP. Nas demais concentrações não foram constatadas diferenças ao longo do tempo (Tabela 4.3).

Neste experimento não foi constatada interação significativa do tempo após pulverização versus concentração quando a porcentagem de frutos com injúrias pelas puncturas e infestação por ovos foi avaliada (Tabela 4.4). A porcentagem de frutos com injúrias ou infestados pela praga foram semelhantes na presença ou ausência de limonoides (Tabela 4.4). As figuras 4.8 e 4.9 ilustram respectivamente as injúrias ocasionadas por *C. capitata* através das puncturas e a presenças de ovos em frutas infestadas.

Tabela 4.3 - Cachos (%) de uva com injúrias pelas puncturas e infestados por *Ceratitis capitata* em teste de campo para avaliação da persistência biológica dos limonoides (AzaMax[®])

DAP	Azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) em ppm ^{1,2}				F	CV	P
	0	100 (+ 28,5)	300 (+ 85,5)	500 (+ 143)			
----- Cachos com injúrias pelas puncturas (%) -----							
0	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	80 ± 20 aA	0,67	28,75	0,5847
3	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	1,00	19,44	0,4182
6	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	80 ± 20 aA	80 ± 20 aA	0,33	36,89	0,8014
9	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	0,00	0,00	0,0000
12	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	1,00	19,44	0,4182
15	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	100 ± 0 aA	1,00	19,44	0,4182
F	0,00	1,00	0,60	0,40			
CV	0,00	15,65	28,75	34,23			
P	0,0000	0,4389	0,7003	0,8439			
----- Cachos infestados por ovos (%) -----							
0	80 ± 20 aA	60 ± 24 abA	0 ± 0 aA	40 ± 24 aA	2,92	30,84	0,0662
3	80 ± 20 aA	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	80 ± 20 aA	0,33	20,93	0,8014
6	80 ± 20 aA	20 ± 20 bA	80 ± 20 aA	80 ± 20 aA	2,25	27,10	0,1219
9	80 ± 20 aA	80 ± 20 abA	60 ± 24 aA	80 ± 20 aA	0,22	27,10	0,8795
12	80 ± 20 aA	100 ± 0 aA	100 ± 0 aA	80 ± 20 aA	0,33	20,93	0,8014
15	80 ± 20 aA	100 ± 0 aA	60 ± 24 aA	80 ± 20 aA	0,76	23,24	0,5318
F	0,00	4,40	2,40	0,62			
CV	24,84	19,33	27,95	26,85			
P	1,0000	0,0055	0,0670	0,6892			

Fator		GL	F	P			
Concentração (C)		3	1,26	0,2934			
DAP		5	2,59	0,0304			
C x DAP		15	1,18	0,2967			

¹Os resultados obtidos no controle em 0 DAP foi extrapolado para os demais controles nas análises. ²Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P < 0,05).

Figura 4.8 - Colonização de frutos de uva por *Ceratitidis capitata*. (A) Uvas com injúrias pelas puncturas realizadas por *C. capitata*. (B e C) Uvas infestadas por ovos

Também em relação ao número de puncturas e de ovos por fruto, não foi constatada interação significativa do tempo após pulverização versus concentração (Tabela 4.5). O número de puncturas por fruto foi semelhante na presença ou ausência de limonoides, o mesmo ocorrendo com o número de ovos por fruto, com exceção do tratamento em que as uvas foram pulverizadas com a maior concentração de limonoides (500 ppm de azadiractina + 143 ppm de 3-tigloilazadiractol), situação em que o número de ovos por fruto após 6 DAP foi superior ao encontrado em frutas que foram infestadas logo após a pulverização (0 DAP), não havendo diferença em relação aos demais períodos de infestação (Tabela 4.5).

Tabela 4.4 - Frutos (%) de uva com injúrias pelas puncturas e infestados por *Ceratitis capitata* em teste de campo para avaliação da persistência biológica dos limonoides (AzaMax[®])

DAP	Azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) em ppm ^{1,2}				F	CV	P
	0	100 (+ 28,5)	300 (+ 85,5)	500 (+ 143)			
----- Frutos com injúrias pelas puncturas (%) -----							
0	15,31 ± 4,47 aA	13,86 ± 5,74 aA	2,28 ± 0,64 aA	6,58 ± 1,79 aA	2,67	21,28	0,0823
3	15,31 ± 4,47 aA	10,16 ± 3,15 aA	13,71 ± 3,91 aA	11,06 ± 4,00 aA	0,37	20,55	0,7765
6	15,31 ± 4,47 aA	16,74 ± 10,13 aA	13,08 ± 5,96 aA	16,58 ± 5,75 aA	0,06	34,03	0,9802
9	15,31 ± 4,47 aA	26,15 ± 9,36 aA	15,03 ± 4,32 aA	10,44 ± 2,98 aA	1,32	27,80	0,3039
12	15,31 ± 4,47 aA	21,95 ± 1,93 aA	10,82 ± 2,58 aA	8,63 ± 5,63 aA	2,23	19,94	0,1241
15	15,31 ± 4,47 aA	11,96 ± 3,21 aA	14,30 ± 6,40 aA	15,66 ± 6,90 aA	0,09	27,51	0,9624
F	0,00	0,92	1,15	0,66			
CV	22,06	30,66	23,82	26,07			
P	1,00	0,4830	0,3598	0,6596			
Fator		GL	F	P			
Concentração (C)		3	1,67	0,1783			
DAP		5	0,97	0,4398			
C x DAP		15	0,65	0,8263			
----- Frutos infestados por ovos (%) -----							
0	11,34 ± 5,66 aA	4,24 ± 2,66 aA	0,00 ± 0,00 aA	2,12 ± 1,30 aA	2,38	20,74	0,1080
3	11,34 ± 5,66 aA	6,54 ± 2,53 aA	10,38 ± 3,86 aA	8,84 ± 3,84 aA	0,26	23,50	0,8554
6	11,34 ± 5,66 aA	9,33 ± 9,33 aA	7,48 ± 3,26 aA	14,26 ± 5,17 aA	0,22	34,45	0,8841
9	11,34 ± 5,66 aA	14,96 ± 6,63 aA	8,06 ± 4,06 aA	6,34 ± 3,73 aA	0,54	28,71	0,6588
12	11,34 ± 5,66 aA	18,03 ± 3,25 aA	7,41 ± 2,60 aA	4,14 ± 1,89 aA	2,70	20,21	0,0805
15	11,34 ± 5,66 aA	8,34 ± 2,63 aA	7,58 ± 6,02 aA	5,28 ± 2,86 aA	0,30	26,77	0,8247
F	0,00	1,01	0,88	1,59			
CV	30,62	28,88	22,86	20,56			
P	1,0000	0,4307	0,5118	0,2000			
Fator		GL	F	P			
Concentração (C)		3	1,54	0,2084			
DAP		5	1,02	0,4100			
C x DAP		15	0,57	0,8877			

¹Os resultados obtidos no controle em 0 DAP foi extrapolado para os demais controles nas análises. ²Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P < 0,05).

Tabela 4.5 - Puncturas e ovos de *Ceratitis capitata* por fruto em teste de campo para avaliação da persistência biológica dos limonoides (AzaMax[®])

da persistência biológica dos inimicoides (Azadiractina)							
Azadiractina (+ 3-tigloilazadiractol) em ppm ^{1,2}					F	CV	P
DAP	0	100 (+ 28,5)	300 (+ 85,5)	500 (+ 143)			
----- Puncturas por fruto -----							
0	0,21 ± 0,06 aA	0,18 ± 0,08 aA	0,04 ± 0,02 aA	0,08 ± 0,02 aA	0,94	30,76	0,4424
3	0,21 ± 0,06 aA	0,12 ± 0,04 aA	0,24 ± 0,08 aA	0,16 ± 0,07 aA	0,70	1,40	0,5664
6	0,21 ± 0,06 aA	0,28 ± 0,20 aA	0,25 ± 0,15 aA	0,28 ± 0,11 aA	0,05	3,03	0,9860
9	0,21 ± 0,06 aA	0,42 ± 0,16 aA	0,24 ± 0,07 aA	0,13 ± 0,04 aA	1,61	2,11	0,2261
12	0,21 ± 0,06 aA	0,32 ± 0,04 aA	0,16 ± 0,01 aA	0,17 ± 0,12 aA	0,99	1,58	0,4231
15	0,21 ± 0,06 aA	0,15 ± 0,05 aA	0,23 ± 0,12 aA	0,23 ± 0,11 aA	0,16	1,95	0,9188
F	0,00	0,96	0,86	0,91			
CV	1,23	2,52	1,98	25,63			
P	1,0000	0,4634	0,5189	0,4924			
----- Ovos por fruto -----							
0	0,62 ± 0,29 aA	0,27 ± 0,16 aA	0,00 ± 0,00 aA	0,07 ± 0,04 bA	2,73	16,71	0,0782
3	0,62 ± 0,29 aA	0,39 ± 0,24 aA	0,63 ± 0,35 aA	0,62 ± 0,23 abA	0,17	24,30	0,9127
6	0,62 ± 0,29 aA	0,72 ± 0,58 aA	0,33 ± 0,15 aA	1,11 ± 0,45 aA	0,64	33,33	0,5992
9	0,62 ± 0,29 aA	0,65 ± 0,25 aA	0,43 ± 0,23 aA	0,13 ± 0,11 abA	1,09	20,97	0,3811
12	0,62 ± 0,29 aA	0,74 ± 0,16 aA	0,27 ± 0,14 aA	0,30 ± 0,17 abA	1,39	17,85	0,2829
15	0,62 ± 0,29 aA	0,26 ± 0,09 aA	0,50 ± 0,30 aA	0,29 ± 0,19 abA	0,56	21,33	0,6468
F	0,00	0,59	0,94	2,71			
C	24,61	26,17	21,31	21,76			
V							
P	1,0000	0,7085	0,4733	0,0447			

Fator		GL	F	P			
Concentração (C)		3	1,11	0,3504			
DAP		5	1,34	0,2532			
C x DAP		15	0,76	0,7220			

¹Os resultados obtidos no controle em 0 DAP foi extrapolado para os demais controles nas análises. ²Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas ou por letras maiúsculas diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P < 0,05).

4.4 Discussão

Nos parreirais de uvas as moscas-das-frutas foram historicamente descritas como um grupo de pragas secundárias (LEONARD, 1925) e só recentemente tem recebido status de praga em várias regiões do mundo (CHAVARRIA et al., 2009; ZART et al., 2010; DOMINIAK, 2011; HANAFY; EL-SAYED, 2013), com particular relevância para a infestação de *C. capitata* na América do Sul (GOMEZ et al., 2008, ZANARDI et al., 2011, SILVA et al., 2012) e Europa (BUONOCORE et al., 1999, RODITAKIS et al., 2008). O manejo de *C. capitata* é realizado com base no cultivo de frutas em áreas livres ou de baixa prevalência, cultivo de fruteira não hospedeira ou de preferência secundária, armadilhas para monitoramento populacional, destruição de restos culturais (frutos), controle químico, controle biológico com parasitoides e a técnica do inseto estéril. Investigações examinando o controle da mosca em áreas de produção de uva são raras (SILVA et al., 2012). Assim, investigações com o objetivo de aprimorar as estratégias de manejo é uma prerrogativa em evidência, especialmente em pomares orgânicos. O presente estudo centrou-se na aplicação de limonoides do nim em campo como estratégia comportamental para controlar *C. capitata*. Entretanto, no presente trabalho a capacidade de proteção do parreiral pelos limonoides sob pressão de infestação por *C. capitata* selvagem foi subestimada em função da baixa populacional natural no período experimental. Ainda assim, não foi detectada infestação da praga com 5 e 15 dias após a aplicação (DAP), porém esses resultados foram semelhantes aos observados nas áreas controles. Por outro lado, no teste de campo 2 foi observado que quando o inseto está confinado com frutos pulverizados com limonoides a sobrevivência é significativamente reduzida com altas concentrações de limonoides até 3 DAP, embora a exposição depois de 6 DAP não altere a sobrevivência das fêmeas. Notavelmente nos cachos de uva sem limonoides a mosca sobreviveu as 24 h de confinamento em gaiolas no campo. Estudos anteriores com derivados de nim evidenciaram baixo efeito tóxico letal em moscas-das-frutas adultas em sistemas confinados em uma gaiola (BARRY et al., 2005; EFROM et al., 2011; SILVA et al., 2013ab; SANCHEZ-RAMOS et al., 2013). Pensando no manejo das moscas-das-frutas, sistemas confinados para avaliar a mortalidade apresentam uma reposta pouco satisfatória, uma vez que limita o movimento das moscas e assim a exposição aos limonoides do nim aumenta exponencialmente. Nesse contexto o resultado de mortalidade aqui apresentando (significativo estatisticamente, porém com baixa eficácia) não é tão relevante para o manejo da praga em campo. Conhecendo a dinâmica de deslocamento e seleção continuada de alimento e locais de oviposição por moscas-das-frutas, mais provável é

que a exposição a limonoides no campo não seja suficiente para provocar efeito letal ou esterilização (SILVA et al., 2013a,b). Recentemente, em pomares de mirtilo e cereja foi demonstrado que a pulverização das árvores frutíferas com derivados de nim foi eficaz na redução da infestação de *Rhagoletis mendax* Curran (BARRY et al., 2005) e *Rhagoletis cerasi* L. (BÖCKMANN et al., 2014), respectivamente. Nesses estudos os autores colocam a mortalidade das moscas como uma das possíveis causas de redução da infestação, porém a letalidade da praga provavelmente deve contribuir em menor grau para o manejo do que a inibição da oviposição ocasionada pelo efeito comportamental dos limonoides, uma vez que esse efeito provavelmente se sobreponha aos demais.

Apesar de ocasionarem mortalidade sobre *C. capitata* os limonoides não evitaram que os cachos ou frutos de uva fossem injuriados e ou infestados. Praticamente a totalidade dos cachos apresentou alguma uva com injúria e ou infestada pela praga. Especialmente no controle, 15,31 % dos frutos apresentavam injúrias pelas puncturas e 11,34 % dos frutos foram infestados por ovos. Taxas de injúrias e infestação semelhantes foram registradas na presença de diferentes concentrações de limonoides. Neste estudo ficou evidente que a população artificial adotada (oito fêmeas) não foi suficiente para avaliar a eficácia dos limonoides sobre o comportamento de oviposição da praga alvo. Tal evidência corrobora também a grande variabilidade existente nos dados biológicos registrados, o que pode, ao menos em parte, ser devido ao ambiente.

Em suma, os limonoides não apresentaram capacidade de proteção do parreiral numa condição de baixa população natural. Concentrações a partir de 300 ppm de azadiractina (+ 85,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) reduzem a sobrevivência da mosca com a exposição logo após a aplicação, não perdurando o efeito após três dias. A mortalidade foi persistente por três dias quando foram pulverizados 500 ppm de azadiractina (+ 143 ppm de 3-tigloilazadiractol) sobre os frutos e expostos às moscas. Os limonoides não evitaram que os cachos ou frutos de uva fossem injuriados e ou infestados por *C. capitata* numa condição de infestação artificial. As conclusões registradas corroboram a hipótese de que são necessárias mais investigações pormenorizadas para avaliação do efeito de limonoides do nim sobre *C. capitata* em campo. Para diagnosticar a eficácia dos limonoides nas próximas investigações em campo deve-se atentar para a instalação do bioensaio nos períodos de maior pico populacional da praga alvo e, no caso de infestação artificial, deve-se adotar uma fêmea para no máximo três frutos e procurar utilizar uma concentração de até 100 ppm de azadiractina (+ 28,5 ppm de 3-tigloilazadiractol) (Azamax[®]) para evitar prejuízos com fitotoxicidade. No

presente estudo os frutos com concentração superior apresentaram um verde em tom mais escuro indicando a influência do tratamento.

Apesar das conclusões registradas provisoriamente neste estudo, a adoção de sistemas de manejo comportamental de *C. capitata* em pomares de uva em agroecossistemas tropicais com limonoides possui uma alta perspectiva de sucesso baseado nas seguintes características: (1) As estratégias de manejo atuais não são eficientes para proteger a cultura ao longo de todo o ciclo produtivo. Especialmente em áreas de produção em projetos de irrigação existe uma forte influência da paisagem (pomares comerciais, pomares abandonados e ou vegetação vizinha) sobre os danos da praga no parreiral. Em parreirais orgânicos a impossibilidade de utilização de inseticidas aumenta acentuadamente à demanda por produtos naturais dinamizando a prospecção desses produtos. (2) A população da praga não é residente no parreiral e flutua acentuadamente ao longo do ano. Assim, o risco de perda da efetividade do produto é reduzido em função da menor pressão de seleção e consequente risco de aprendizagem e ou habituação da praga. Estudo anterior não relatou aprendizado após contato da praga alvo com limonoides. (3) A moscamed adentra os parreirais de uva advinda de outros pomares comerciais, pomares abandonados e ou vegetação vizinha. As fêmeas em deslocamento poderão ser facilmente impedidas de entrar no parreiral através de uma barreira química. Adicionalmente, a fêmea presente no parreiral apresenta como característica intrínseca uma alta capacidade de mobilidade e propensão para o deslocamento; assim, a propensão para o deslocamento na presença de um odor irritante é significativa. Os limonoides impedem que o hospedeiro seja reconhecido pela praga em função dos estímulos que promovem a inquietação (irritação), locomoção e consequente dispersão da praga. (4) As uvas permanecem no parreiral por um período curto obedecendo a um critério cronológico baseado em tratos culturais. Os frutos apresentam um período curto de suscetibilidade para a praga reduzindo o período de proteção necessário e a quantidade de produto demandado. (5) A viticultura em agroecossistemas tropicais é explorada majoritariamente pela agricultura familiar caracterizada por pequenas áreas de cultivo. O tamanho da área é um elemento essencial para facilitar a saturação do ambiente com compostos químicos que influenciam negativamente a seleção hospedeira da praga. O crescimento vegetativo das plantas permite a formação de uma nuvem química internamente no parreiral. Pela resposta comportamental da praga em estudo é notório que o grau de difusão dos limonoides é lento. O tamanho da área influencia diretamente na demanda por produto e consequente matéria-prima. Dessa forma, é fortemente recomendada a intensificação do estudo dessa estratégia para o manejo de *C. capitata*. O controle dessa espécie é um sério problema em países tropicais, agravando a

situação em projetos de irrigação em função da diversidade e disponibilidade de frutos hospedeiros. Ademais, o risco de evolução da resistência de *C. capitata* a inseticidas sintéticos é um problema eminente (MAGANHA et al., 2007, COUSO-FERRER et al., 2011). A moscamed é a espécie com maior significância econômica entre os tefritídeos, uma vez que essa espécie é polífaga, cosmopolita, multivoltina, possui potencial biótico e adaptativo elevado e alto potencial para ocasionar danos.

Referências

- AKCA, I.; TUNCER, C.; GULER, A.; SARUHAN, I. Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Islamabad, v. 8, p. 436-440, 2009.
- BARRY, J.D.; SCIARAPPA, W.J.; TEIXEIRA, L.A.F.; POLAVARAPU, S. Comparative effectiveness of different insecticides for organic management of blueberry maggot (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, p.1236-1241, 2005.
- BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A**, London, v.160, p. 268–282, 1937.
- BEZERRA-SILVA, G.C.D.; SILVA, M.A.; VENDRAMIM, J.D.; DIAS, C.T.S.D. Insecticidal and behavioral effects of secondary metabolites from Meliaceae on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 743-751, 2012.
- BOCKMANN, E.; KOPPLER, K.; HUMMEL, E.; VOGT, H. Bait spray for control of European cherry fruit fly: an appraisal based on semi-field and field studies. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, p. 502-509, 2014.
- BOEKE, S. J.; BOERSMA, M.G.; ALINK, G.M.; VAN LOON, J.J.A.; VAN HUIS, A.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M.C.M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, p. 25–41, 2004.
- BUONOCORE, E.; COLOMBO, A.; CAMPO, G.; NUCIFORA, A. Symptoms of damage caused by *Ceratitis capitata* on clusters of Italia grapes. **Informatore Fitopatologico**, Bologna, v. 49, p. 56-60, 1999.
- CHAVARRIA, G.; ZART, M.; BOTTON, M.; SANTOS, H.P.; MARODIN, G.A.B.; Flutuação populacional de adultos de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) em cultivo protegido e convencional de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 725-731, 2009.
- CHEN, C.; DONG, Y.; CHENG, L.; HOU, R.F. Deterrent effect of neem seed kernel extract on oviposition of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in guava. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 462-466, 1996.

COUSO-FERRER, F.; AROURI, R.; BEROIZ, B.; PERERA, N.; CERVERA, A.; NAVARRO-LIOPIS, V.; CASTAÑERA, P.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; ORTEGO, F. Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, p. 1349-1356, 2011.

DOMINIAK, B.C. Review of grapes *Vitis* sp. as an occasional host for Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). **Crop Protection**, Kidlington, v. 30, p. 958-961, 2011.

EFROM, C.F.S.; REDAELLI, L.R., MEIRELLES, R.N., OURIQUE, C.B. Laboratory evaluation of phytosanitary products used for control of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, in organic farming. **Crop Protection**, Kidlington, v.30, p.1162-1167, 2011.

GOMEZ, M.; PARANHOS, B.A.J.; DAMASCENO, I.; CASTRO, R.; CAMPOS, D.; ANDRADE, K.; SILVA, M.A.; NASCIMENTO, A.S.; MALAVASI, A. Biología de la mosca del mediterráneo, *Ceratitidis capitata* Wiedemann (Díptera: Tephritidae) en dos variedades de uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) en el nordeste brasileño. **Revista CitriFrut**, Havana, v. 25, p. 18-23, 2008.

GRDISA, M.; GRSIC, K.; Botanical insecticides in plant protection. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 78, p. 85-93, 2013.

HANAFY, H.E.M.; EL- SAYED, W.; Control of the fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) and the peach fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae) on peach and grape fruits. **Journal of Applied Sciences Research**, cidade, v.9, n.1, p. 952-959, 2013

HAJI, F.N.P.; NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S.; COUTINHO, C.C. Ocorrência e índice de infestação de moscas-das-frutas (Tephritidae) na região do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 27, p. 205-209, 1991.

HAJI, F.N.P.; PARANHOS, B.A.J.; MIRANDA, I.G.; BARBOSA, F.R.; SOUZA, A. M. Monitoramento de moscas-das-frutas no Submédio do Vale do São Francisco. In: MENEZES, E.A.; BARBOSA, F.R. (Ed.). **Pragas da mangueira**: monitoramento, nível de ação e controle. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2005. p. 85-86.

KHATER, H.F. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. **Pharmacologia**, London, v. 3, p. 641-656, 2012.

LEMONS, F.; SARMENTO, R.A; TEODORO; A.V.; SANTOS, G.R.; NASCIMENTO, I.R. Agroecological Strategies for Arthropod Pest Management in Brazil. **Recent Patents On Food, Nutrition & Agriculture**, Rome, v. 3, p. 142-154, 2011.

LEONARD, M.D. Notes on the embargo of grapes from Almeria, Spain, on account of the Mediteranean fruit fly (*Ceratitidis capitata* Weid.). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, p. 257-265, 1925.

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

MALAVASI, A.; MORGANTE, J.S.; ZUCCHI, R.A. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). I. Lista de hospedeiros e ocorrência. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 9-16, 1980.

MOMANYI, G.; MARANGA, R.; SITHANANTHAM, S.; AGONG, S.; MATOKA C. M.; HASSAN, S. A. Evaluation of persistence and relative toxicity of some pest control products to adults of two native trichogrammatid species in Kenya. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, p. 591–601, 2012.

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

RAGA, A.; SATO, M.E. Time-mortality for fruit flies (Diptera: Tephritidae) exposed to insecticides in laboratory. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 73, p. 73-77, 2006.

RODITAKIS, E.; TSAGKARAKOU, A.; RODITAKIS, N.E.. Extensive damage on white variety table grapes by the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) in Crete. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Paris, v. 38, p. 216–219, 2008.

SAS INSTITUTE. 2003. Statistical Analysis System, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.

SANCHEZ-RAMOS, I.; FERNÁNDEZ, C.E.; GONZÁLEZ-NÚÑEZ, M.; PASCUAL, S. Laboratory tests of insect growth regulators as bait sprays for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 520–526, 2013.

SENTHIL-NATHAN, S. 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 4, p. 1-17, 2013.

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

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T. Inhibition of oviposition by neem extract: a behavioral perspective for the control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, p. 333-337, 2012.

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T. Sublethal effect of neem extract on Mediterranean fruit fly adults. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, p. 93-101, 2013a.

SILVA, M.A.; BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; MASTRANGELO, T.; FORIM, M.R. Neem derivatives are not effective as toxic bait for Tephritid fruit flies. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 106, n. 4, p. 1772-1779, 2013b.

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

TAN, Q.; LUO, X. Meliaceous Limonoids: chemistry and biological activities. **Chemical Reviews**, Washington, v. 111, p. 7437-7522, 2011.

TEIXEIRA, A.H.C.; BASTIAANSEN, W.G.M.; BASSOI, L.H.. Crop water parameters of irrigated wine and table grapes to support water productivity analysis in the São Francisco river basin, Brazil. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 94, p. 31-42, 2007.

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

ZANARDI, O.Z.; NAVA, D.E.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; MACHOTA JR., R.; BISOGNIN, M. Desenvolvimento e reprodução da mosca-do-mediterrâneo em caqui, macieira, pessegueiro e videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p. 682-688, 2011.

ZART, M.; FERNANDES, O.A.; BOTTON, M.. 2010. Biology and fertility life table of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* on grape. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 63, p. 237-242, 2010.