

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

FABIANO LEITE GOMES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE INSETICIDA DE COMPOSIÇÃO
FITOSSANITÁRIA DE *Annona squamosa* L. e *Annona mucosa* (Jacq.) Baill.
(Annonaceae) para o controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**

Rio Largo, AL

2018

FABIANO LEITE GOMES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE INSETICIDA DE COMPOSIÇÃO
FITOSSANITÁRIA *Annona squamosa* L. e *Annona mucosa* (Jacq.) Baill. (Annonaceae)
para o controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Proteção de Plantas (Área de concentração: Entomologia)

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

Coorientador: Prof. Dr. Renan Cantalice de Souza e Prof. Dr. João Inácio Soletti

Rio Largo, AL
2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

G633e Gomes, Fabiano Leite.
Estudo fitoquímico e atividade inseticida de composição fitossanitária de *Annona squamosa* L. e *Annona mucosa* (Jacq.) Baill. (Annonaceae) para o controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) / Fabiano Leite Gomes. – 2018.
159 f. : il.

Orientadora: Roseane Cristina Predes Trindade
Coorientadores: Renan Cantalice de Souza e João Inácio Soletti
Tese (doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas.
Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2018.

Inclui bibliografia.

1. *Annona squamosa*. 2. *Annona mucosa*. 3. Estudo fitoquímico. 4. Controle alternativo. 5. Atividade inseticida. I. Título.

CDU: 632.9:634.4



UFAL

Universidade Federal de Alagoas

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS
CÓDIGO-CAPEs – 26001012029P1



CECA

Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, no Auditório Hamilton Soutinho, do Centro de Ciências Agrárias da UFAL, sob a Presidência da Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Predes Trindade, reuniu-se a Banca Examinadora para Defesa Pública de Tese do Engenheiro Agrônomo **Fabiano Leite Gomes**, aluno do Curso de Doutorado em Proteção de Plantas da UFAL, com o título: **“Estudo Fitoquímico e atividade inseticida de composição fitossanitária de *Annona squamosa* L. e *Annona mucosa* (Jacq.) Bail. (Annonaceae) para o controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)”**. A Banca examinadora ficou assim constituída: Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Predes Trindade (CECA-UFAL) - Orientadora - Membro Titular, Prof.^a Dr.^a Mariana Oliveira Breda (CECA-UFAL) – Membro Titular, Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas (IFAL/Campus Maceió) e o Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ESENFAR-UFAL) – Membro Titular. Ocorrências: Abertura pela Presidente da Banca, Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Predes Trindade, que agradeceu as valiosas presenças dos demais membros componentes da Banca, manifestando sua satisfação pela defesa da Tese do Curso de Doutorado em Proteção de Plantas da UFAL, desta feita sob sua orientação. A seguir, parabenizou o aluno **Fabiano Leite Gomes** pelo trabalho apresentado. A presidente da Banca Examinadora iniciou os trabalhos passando a palavra ao Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento e, logo após, foram ouvidos os comentários e análises dos outros componentes da Banca. Terminada a defesa, procedeu-se o julgamento pelos membros examinadores, sendo o candidato **APROVADO**. O candidato foi informado que terá um prazo de sessenta (60) dias para entregar na Coordenação do Curso os exemplares da Tese com as modificações sugeridas pela banca examinadora e apresentar o comprovante de submissão de pelo menos dois artigos extraídos de sua Tese para expedição do Diploma de Doutor em Proteção de Plantas. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos Senhores Membros da Banca Examinadora e por mim, Maxwell Maclon Silva Guilherme, Secretário. Rio Largo (AL), 23 de fevereiro de 2018.

Roseane Cristina Predes Trindade
Prof.^a Dr.^a Roseane Cristina Predes Trindade
Presidente Titular

Mariana Oliveira Breda
Prof.^a Dr.^a Mariana Oliveira Breda
Membro Titular

Ticiano Gomes do Nascimento
Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Membro Titular

Johnnatan Duarte de Freitas
Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
Membro Titular

Fabiano Leite Gomes
Fabiano Leite Gomes
Engenheiro Agrônomo, M.Sc.

p/ Maxwell Maclon Silva Guilherme
Gustavo Luiz Nepomuceno Lage
Secretário

Ofereço

À Deus, pois me proporcionou viver e realizar o meu sonho.

A minha mãe, Maria Eunides Leite Gomes pela atenção, carinho, amor infinito e apoio.

A memória dos meus avós maternos, Francisco Vital Leite e Maria Leite Barbosa.

Dedico

A minha mãe, Maria Eunides Leite Gomes,

In memoriam do meu pai, Antônio Timóteo Gomes,

À Santíssima Trindade,

À Deus Pai, Filho e Espírito Santo,

À Santa Luzia.

A Prof^a Dr^a Sônia Maria Forti Broglio.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela infinitude bondade para com o seu filho, **Fabiano Leite Gomes**, por guiar e iluminar o caminho da vida;

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e ao Centro de Ciências Agrárias (CECA) pelo espaço, funcionários e corpo docente;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio da bolsa de pesquisa;

A Prof^ª Dr^a Roseane Crisina Predes Trindade pela orientação, oportunidade e atenção à realização da pesquisa;

A Prof^ª Dr^a Adriana Guimarães Duarte pela amizade, apoio e oportunidades no LECOM;

A Dr^a Mara Suyane Marques Dantas pela amizade, carinho, apoio, orientação e incentivo;

Ao Prof^º Dr Renan Cantalice de Souza pela atenção, orientação e incentivo;

Ao Prof^º Dr João Inácio Soletti pelo apoio, incentivo constante e orientação no desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof^º Dr Ticiano Gomes do Nascimento pela atenção, oportunidade e orientação no desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof^º Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'ana pela orientação e colaboração no desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof^º Dr. Reinaldo de Alencar Paes pela amizade, apoio e incentivo;

A Dr^a Alice Maria Nascimento de Araújo pela atenção e apoio à pesquisa;

Ao Dr. Djison Silvestre dos Santos pela atenção, amizade e contribuição;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas (PPGPP), CECA-UFAL pelos ensinamentos e apoio;

Aos funcionários da secretária do PPGPP;

Aos membros do Laboratório de Pesquisas Naturais (LPqRN)-UFAL;

Aos membros do Laboratório de Entomologia – Controle Alternativo de Pragas;

Aos discentes do CECA que colaboraram nas atividades laborais da pesquisa;

David Javier Matuz Zarate pela amizade (Mexicano), apoio e parceria ao desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO GERAL

Visando investigar o potencial inseticida da família Annonaceae como tática de controle alternativo para o manejo integrado da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), a pesquisa teve por objetivo desenvolver formulações fitossanitárias a partir de uma formulação emulsionável estável do extrato hexânico de sementes de *Annona squamosa* L. e do extrato etanólico de *Annona mucosa* Jacq (Annonaceae), avaliar as suas características organolépticas, analisar a estabilidade a curto e longo prazo, estimar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₉) e avaliar a atividade inseticida na capacidade de oviposição, nos estádios larvais, avaliar persistência do extrato e do formulado emulsionável em semicampo e realizar a prospecção dos constituintes químicos. A estimativa da CL₅₀ e CL₉₉ foi determinada através da fórmula de Bliss (1934) realizada por análise Probit. Para *A. squamosa* das cinco amostras testadas da emulsão do extrato hexânico de *A. squamosa* (EHAS) apenas a emulsão 5 mostrou estabilidade e apropriada ao longo dos testes de curta e longa duração para ser utilizada como produto inseticida; a CL₅₀ e CL₉₉ estimadas da EHAS foram de 2,76 e 21,52 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, apresentando toxicidade a *P. xylostella*; a CL₉₉ da EHAS apresenta efeito ovicida e repelente para oviposição; a CL₅₀ e CL₉₉ da EHAS apresentam eficiência no estágio larval do 1º instar, porém, diminuem a toxicidade nos demais instares; a persistência da toxicidade do EHAS em condição de semicampo com folha destacada é de até 18 e 16 dias para CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente; A persistência da toxicidade do EHAS em condição de semicampo na planta inteira é de 16 dias para CL₅₀ e CL₉₉; as partições da FACT e FH foram tóxicas a *P. xylostella*; através das análises por CLAE-DAD se evidencia a possibilidade de acetogeninas, dentre-as a esquamocina na EHAS, constatado por meio da concentração da área (%) e do comprimento de onda (λ). Para *A. mucosa* a CL₅₀ e CL₉₉ do extrato etanólico de *A. mucosa* (EEAM) estimadas foram de 51,64 e 616,2 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente; a CL₉₉ do EEAM apresenta efeito ovicida, repelente para oviposição e eficiência no estágio larval do 1º instar; CL₅₀ do EEAM apresenta efeito ovicida e eficiência no estágio larval do 1º instar; a persistência da toxicidade do EEAM apresenta efeito residual de até 8 e 12 dias para CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente, em condição de semicampo com folha destacada e com planta inteira é de até 6 e 12 dias para CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente; as partições das FHAL, FACT e FCLF foram as mais tóxicas sobre *P. xylostella*; através das análises por CLAE-DAD se evidencia a presença de acetogeninas, dentre-as a esquamocina na EHAM e alcalóides, constatado por meio da concentração da área (%) e do comprimento de onda (λ) e presença de flavonoides orientina e rutina. Conclui-se que, as espécies de *A. squamosa* e *A. mucosa* apresentam ação bioinseticida para o controle de *P. xylostella*.

Palavras-chave: *Annona squamosa*. *Annona mucosa*. Estudo fitoquímico. Controle alternativo. Atividade inseticida. Traça-das-crucíferas.

GENERAL ABSTRACT

Aiming to investigate the insecticidal potential of the Annonaceae family as an alternative control tactic for the integrated management of the diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), the research aimed to develop phytosanitary formulations from a stable emulsifiable formulation of the hexane extract of *Annona squamosa* L. and *Annona mucosa* (Annonaceae) ethanolic extract, evaluate their organoleptic characteristics, analyze long and short term stability, estimate lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₉) and evaluate the insecticidal activity in the capacity of oviposition, in the larval stages, to evaluate the persistence of the extract and of the emulsifiable formulation in the semi-field and to carry out the prospection of the chemical constituents. The estimation of LC₅₀ and LC₉₉ was determined using the Bliss formula (1934) performed by Probit analysis. For *A. squamosa* of the five samples tested of the emulsion of the hexanic extract of *A. squamosa* (EHAS) only emulsion 5 showed stability and appropriated along the short and long duration tests to be used as an insecticidal product; the estimated LC₅₀ and LC₉₉ of EHAS were 2.76 and 21.52 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectively, showing toxicity to *P. xylostella*; the LC₉₉ of the EHAS presents ovicidal and repellent effect for oviposition; the LC₅₀ and LC₉₉ of the EHAS show efficiency in the 1st instar larval stage, however, they decrease the toxicity in the other instars; the persistence of EHAS toxicity in semi-field leaf spot condition is up to 18 and 16 days for CL₅₀ and CL₉₉, respectively, while semi-field in whole plant condition is 16 days for CL₅₀ and CL₉₉; the FACT and FH partitions were toxic to *P. xylostella*; through the analyzes by CLAE-DAD, the possibility of acetogenins, among them the squamocin in EHAS, is evidenced by the concentration of the area (%) and the wavelength (λ). For *A. mucosa* the LC₅₀ and LC₉₉ of the ethanolic extract of *A. mucosa* (EEAM) estimated were 51.64 and 616.2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectively; the eeg LC₉₉ shows ovicidal, oviposition repellent and efficiency effects in the 1st instar larval stage; eeg LC₅₀ has ovicidal effect and efficiency in the 1st instar larval stage; the persistence of EEA toxicity shows residual effect of up to 8 and 12 days for LC₉₉ and LC₅₀, respectively, in semi-field condition with detached leaf and with whole plant is of up to 6 and 12 days for LC₉₉ and LC₅₀, respectively; the FHAL, FACT and FCLF partitions were the most toxic on *P. xylostella*; through the analysis by CLAE-DAD, the possibility of acetogenins, among them the squamocin in EHAM and alkaloids, is evidenced by the concentration of the area (%) and the wavelength (λ) and the presence of flavonoids orientin and rutin. It is concluded that the species of *A. squamosa* and *A. mucosa* present biopesticide action for the control of *P. xylostella*.

Keywords: *Annona squamosa*. *Annona mucosa*. Phytochemical study. Alternate control. Insecticidal activity. Diamondback

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

- Figura 1. Fotografias correspondentes a emulsão 5 por meio da microscopia óptica. a) após o preparo; b) após três meses sob ambiente escuro; c) após três meses sob sol indireto e d) após três meses sob sol direto..... 84
- Figura 2. Perfis cromatográficos e espectros de UV no extrato das sementes de *Annona squamosa*, composto isolado ASS2A [Condições de análise: C₁₈ THERMOHypersil® (5 µm; 4,6 x 150 mm), fase móvel ACN/H₂O, fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, λ= 205 nm, adaptado Lima, (2007)] (A); fração acetato de etila, λ= 205 (B), presença de acetogeninas..... 100
- Figura 3. Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das sementes de *Annona squamosa*, fração hexano, λ= 280 nm..... 91

Artigo 2

- Figura 1. Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das sementes de *Annona mucosa*, fração hidroalcoólico, λ= 205 nm.... 137
- Figura 2. Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das sementes de *Annona mucosa*, fração clorofórmio, λ= 205 nm..... 138
- Figura 3. Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das sementes de *Annona mucosa*, fração acetato de etila, λ= 205 nm... 139
- Figura 4. Perfis cromatográficos e espectros de UV para padrões de flavonoides rutina (A), orientina (B) e no extrato das folhas de *Annona mucosa*, fração hidroalcoólico (C), presença de orientina (C1) e rutina (C2), λ= 354 nm..... 142
- Figura 5. Perfis cromatográficos e espectros de UV padrão flavonóide rutina (A) e do extrato das folhas de *Annona mucosa*, presença de rutina (B), fração clorofórmico λ= 354 e 280 nm, respectivos..... 144
- Figura 6. Perfis cromatográficos e espectros de UV padrão flavonoide rutina (A) e do extrato das folhas de *Annona mucosa*, presença de rutina (B), fração hexano λ= 354 nm..... 146

LISTA DE TABELAS

Artigo 1.	Formulado emulsionável, toxicidade e estudo fitoquímico do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> L. (Annonaceae) no controle de <i>Plutella xylostella</i> (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae)	
Tabela 1.	Proporção de homogeneizadores utilizados para o preparo das emulsões do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS), adaptado (SENHORINI, 2010).....	72
Tabela 2.	Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD das frações obtido da <i>Annona squamosa</i>	80
Tabela 3.	Emulsões preparadas com óleo de sementes de <i>Annona squamosa</i> com Span 60 e Tween 80 em proporções diferentes, Rio Largo-AL.....	80
Tabela 4.	Estudo da estabilidade em ambiente com sol indireto, sol direto e em ambiente escuro, entre os meses de dezembro de 2016 a março de 2017, Rio Largo, AL.....	82
Tabela 5.	Avaliação das propriedades organolépticas das emulsões em curto prazo sob diferentes estresses, Rio Largo-AL.....	85
Tabela 6.	Concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₉) da emulsão hexânica da semente de <i>Annona squamosa</i> sobre lagartas neonatas de <i>Plutella xylostella</i> , Rio Largo-AL.....	86
Tabela 7.	Viabilidade dos ovos (Média ± DP) tratados com extrato hexânico de sementes de <i>Annona squamosa</i> , Rio Largo-AL.....	88
Tabela 8.	Preferência da oviposição (Média ± DP) de <i>Plutella xylostella</i> tratados com emulsão do extrato hexânico de sementes de <i>Annona squamosa</i> , Rio Largo-AL.....	90
Tabela 9.	Média ± DP de diferentes ínstares de lagartas <i>Plutella xylostella</i> depositados em folhas de couve tratadas com emulsão do extrato hexânico de semente de <i>Annona squamosa</i> (EHAS), Rio Largo-AL.....	92
Tabela 10.	Mortalidade ± DP larval de 1º instar de <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo com folha destacada das plantas tratadas com a emulsão do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) ao longo do tempo, Rio Largo-AL.....	95
Tabela 11.	Mortalidade ± DP larval de 1º instar de <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo da planta inteira tratadas com emulsão do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) ao longo do tempo, Rio Largo-AL.....	96
Tabela 12.	Média ± DP da mortalidade de lagartas neontas de <i>Plutella xylostella</i> , submetidas a CL ₃₅ tratados com as frações da partição líquido-líquido de <i>Annona squamosa</i> , Rio Largo-AL.....	98

Tabela 13.	Análise cromatográfica por CLAE da fração acetato de etila de sementes de <i>A. squamosa</i> , comprimento de onda (205 nm).....	99
Tabela 14.	Análise cromatográfica por CLAE da fração hexano de sementes de <i>A. squamosa</i> , comprimento de onda (280nm).....	101
Artigo 2.	Estudo fitoquímico e efeito do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> Jack. (Annonaceae) no controle de <i>Plutella xylostella</i> (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae)	
Tabela 1.	Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos para acetogeninas por CLAE-DAD das frações obtido da <i>Annona mucosa</i>	122
Tabela 2.	Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos para flavonóides por CLAE-DAD das frações obtido da <i>Annona mucosa</i>	123
Tabela 3.	Concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₉) do extrato etanólico da folha de <i>Annona mucosa</i> sobre lagartas neonatas de <i>Plutella xylostella</i> , Rio Largo-AL.....	124
Tabela 4.	Viabilidade dos ovos (Média ± DP) de <i>Plutella xylostella</i> tratados com extrato etanólico da folha de <i>Annona mucosa</i> , Rio Largo-AL.....	126
Tabela 5.	Preferência da oviposição (Média ± DP) de <i>Plutella xylostella</i> tratados com extrato etanólico da folha de <i>Annona mucosa</i> , Rio Largo-AL.....	127
Tabela 6.	Média ± DP de diferentes ínstares de lagartas <i>Plutella xylostella</i> depositados em folhas de couve tratadas com extrato etanólico das folhas de <i>Annona mucosa</i> (EEAM), Rio Largo-AL.....	130
Tabela 7.	Mortalidade ± DP larval de 1º instar de <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo com folha destacada tratadas com extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) ao longo do tempo, Rio Largo-AL	133
Tabela 8.	Mortalidade ± DP larval de 1º instar de <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo da planta inteira tratadas com extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) ao longo do tempo, Rio Largo-AL.....	134
Tabela 9.	Média ± DP da mortalidade de lagartas neontas de <i>Plutella xylostella</i> , submetidas a CL ₃₃ tratados com as frações da partição líquido-líquido de <i>Annona mucosa</i> , Rio Largo-AL.....	135
Tabela 10.	Análise cromatográfica por CLAE da fração hidroalcoólico de folhas de <i>A. mucosa</i> , comprimento de onda (205nm).....	136
Tabela 11.	Análise cromatográfica por CLAE da fração cloroformico de folhas de <i>A. mucosa</i> , comprimento de onda (205nm).....	138
Tabela 12.	Análise cromatográfica por CLAE da fração acetato de etila de folhas de <i>A. mucosa</i> , comprimento de onda (205nm).....	139
Tabela 13.	Análise cromatográfica por CLAE da fração hidroalcoólico de folhas de <i>A. mucosa</i> , comprimento de onda (354 nm).....	141

Tabela 14.	Análise cromatográfica por CLAE da fração cloroformico de folhas de <i>A. mucosa</i> , comprimento de onda (354 nm).....	143
Tabela 15.	Análise cromatográfica por CLAE da fração hexano de folhas de <i>A. mucosa</i> , comprimento de onda (354nm).....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGs – Acetogeninas

ACN – Acetonitrila

ADE – Água destilada

BHL – Balanço hidrofílico-lipofílico

Bt- *Bacillus thuringiensis*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CECA – Centro de Ciências Agrárias

CL – Concentração Letal

CL₅₀ – Concentração Letal para matar 50% da população

CL₂₀ – Concentração Letal para matar 20% da população

CL₉₀ – Concentração Letal para matar 90% da população

CL₉₉ – Concentração Letal para matar 99% da população

CV% – Coeficiente de Variação

DP – Desvio padrão

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

EEAM – Extrato etanólico de *Annona squamosa*

EHAS – Extrato hexânico de *Annona mucosa*

EHL – Equilíbrio hidrofílico-lipófilo

FACT – Fração acetato de etila

FCLF – Fração clorofórmio

FH – Fração hexano

FHALC – Fração hidroalcoólico

IC- Intervalo de confiança

IOBC – Internacional Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants

LECAP – Laboratório de Entomologia – Controle Alternativo de Pragas

LI – Limite inferior

LS – Limite superior

LPqRN – Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MS – Ministério da Saúde

MIP – Manejo integrado de pragas

MEP – Manejo ecológico de pragas

NEPs – Nematóides entomopatogênicos

NS – Não significativo

PG – Progressão geométrica

PVDF – Polifluoreto de vinilideno

Rpm - Rotações por minuto

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SPAN – Monoleato de sorbitano

T - Tonelada

TR – Tempo de retenção

THP - Tetrahidropirano

TWEEN 80 – Monoleato de polioxietilnossorbitano

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

UV – Ultravioleta

UR – Umidade relativa

WPRS – West palearctic regional section

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Família Brassicaceae	18
2.2	Traça-das-crucíferas, <i>Plutella xylostella</i> (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)	19
2.3	Táticas de controle usadas no manejo integrado de <i>Plutella xylostella</i>	20
2.3.1	Controle mecânico-cultural	21
2.3.2	Controle biológico.....	22
2.3.3	Controle comportamental.....	25
2.3.4	Método por resistência de plantas.....	26
2.3.5	Controle químico.....	29
2.3.6	Controle com extratos vegetais.....	31
2.4	Annonaceae	33
2.4.1	Annonaceae no controle de artrópodes.....	34
2.4.2	Fitoquímica das anonáceas.....	39
2.5	Formulações de produto fitossanitário	43
2.5.1	Emulsão	44
	REFERÊNCIAS	48
3	Formulado emulsionável, toxicidade e estudo fitoquímico do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> L. (Annonaceae) no controle de <i>Plutella xylostella</i> (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae)	65
	RESUMO	65
	ABSTRACT	66
3.1	Introdução	67
3.2	Material e métodos	70
3.2.1	Condução da cultura.....	70
3.2.2	Criação de <i>Plutella xylostella</i>	70
3.2.3	Obtenção das sementes e preparo de extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i>	71
3.2.4	Preparo da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS).....	71
3.2.5	Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis	72
3.2.5.1	Testes de estabilidade normais em longo prazo	72
3.2.5.1.1	Caracterização das emulsões por microscopia ótica	73
3.2.5.2	Testes de estabilidade acelerados em curto prazo	73
3.2.6	Estimativa das concentrações letais da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) sobre <i>Plutella xylostella</i>	73
3.2.7	Efeito ovicida da emulsão do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) na fase embrionária de <i>Plutella xylostella</i>	74
3.2.8	Efeito da emulsão do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) na preferência de oviposição em <i>Plutella xylostella</i>	75
3.2.9	Efeito da emulsão do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) em	76

	diferentes estádios larvais de <i>Plutella xylostella</i>	
3.2.10	Avaliar a persistência da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) sobre <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo com folhas destacadas e planta inteira.....	77
3.2.11	Estudo fitoquímico de extratos de <i>Annona squamosa</i>	77
3.2.11.1	Partição líquido-líquido do extrato bruto hexânico de <i>Annona squamosa</i>	77
3.2.11.2	Bioensaios para testar as frações da partição líquido-líquido de <i>Annona squamosa</i>	78
3.2.11.3	Fracionamento da partição biotiva do extrato bruto hexânico de <i>Annona squamosa</i>	78
3.2.11.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	78
3.2.11.4.1	Identificação de acetogeninas (ACG) de <i>Annona squamosa</i>	79
3.3	Resultados e discussão	80
3.3.1	Emulsão.....	80
3.3.2	Avaliação organoléptica e teste de estabilidade da emulsão estável: testes normais em longo prazo e acelerados em curto prazo.....	81
3.3.2.1	Testes de estabilidade normais em longo prazo.....	81
3.3.2.2	Caracterização das emulsões por meio da microscopia óptica.....	83
3.3.2.3	Testes de estabilidade acelerados à curto prazo.....	84
3.3.4	Estimativa das concentrações letais da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) no controle de <i>Plutella xylostella</i>	85
3.3.5	Efeito ovicida da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) sobre <i>Plutella xylostella</i>	87
3.3.6	Efeito na preferência de oviposição da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) sobre <i>Plutella xylostella</i>	89
3.3.7	Efeito da emulsão do extrato hexânico de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) em diferentes estádios larvais de <i>Plutella xylostella</i>	90
3.3.8	Efeito residual da emulsão hexânica de <i>Annona squamosa</i> (EHAS) sobre <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo com folha destacada e planta inteira.....	93
3.3.9	Avalidação da atividade inseticida de frações da partição líquido-líquido de <i>Annona squamosa</i> sobre <i>Plutella xylostella</i>	97
3.3.10	Identificação de acetogeninas (ACG) de <i>Annona squamosa</i>	98
3.4	Conclusões	103
	REFERÊNCIAS	104

4	Estudo fitoquímico e efeito do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> Jack. (Annonaceae) no controle de <i>Plutella xylostella</i> (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae).....	112
	RESUMO.....	112
	ABSTRACT.....	113
4.1	Introdução	114
4.2	Material e métodos	115
4.2.1	Condução da cultura	115
4.2.2	Criação de <i>Plutella xylostella</i>	116
4.2.3	Obtenção das folhas e preparo de extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM)	116
4.2.4	Estimativa das concentrações letais do extrato etanólico da folha de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) sobre <i>Plutella xylostella</i>	117
4.2.5	Efeito da CL ₅₀ do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) na fase embrionária de <i>Plutella xylostella</i>	118
4.2.6	Efeito do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) na preferência de oviposição em <i>Plutella xylostella</i>	118
4.2.7	Efeito do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) em diferentes estádios larvais de <i>Plutella xylostella</i>	119
4.2.8	Avaliar a persistência do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) sobre <i>Plutella xylostella</i> da folha destacada e planta inteira em condição de semicampo.....	120
4.2.9	Estudo fitoquímico de extratos de <i>Annona mucosa</i>	120
4.2.9.1	Partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico de <i>Annona mucosa</i>	120
4.2.9.2	Bioensaios para testar as frações da partição líquido-líquido de <i>Annona mucosa</i>	121
4.2.9.3	Fracionamento da partição biotiva do extrato bruto etanólico de <i>Annona mucosa</i>	121
4.2.9.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	121
4.2.9.5	Identificação de acetogeninas (ACG) de <i>Annona mucosa</i>	122
4.2.9.6	Identificação de flavonoides de <i>Annona mucosa</i>	122
4.3.	Resultados e discussão.....	124
4.3.1	Estimativa das concentrações letais do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) no controle de <i>Plutella xylostella</i>	124
4.3.1.1	Efeito ovicida do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) sobre <i>Plutella xylostella</i>	125

4.3.1.2	Efeito do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) sobre a preferência à oviposição de <i>Plutella xylostella</i>	127
4.3.1.3	Efeito do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) em diferentes estádios larvais de <i>Plutella xylostella</i>	128
4.3.1.4	Efeito residual do extrato etanólico de <i>Annona mucosa</i> (EEAM) sobre <i>Plutella xylostella</i> em condições de semicampo com da folha destacada e planta inteira.....	130
4.3.2	Avaliação da atividade inseticida de frações da partição líquido-líquido de <i>Annona mucosa</i> sobre <i>Plutella xylostella</i>	135
4.3.2.1	Identificação de acetogeninas (ACG) de <i>Annona mucosa</i>	135
4.3.2.2	Identificação de flavonoides de <i>Annona mucosa</i>	140
4.4	Conclusões	148
	REFERÊNCIAS	149

1 INTRODUÇÃO GERAL

Novos estilos de desenvolvimento da agricultura de base ecológica, baseados nos princípios da ciência Agroecologia, reconhecem as especificidades e heterogeneidade dos agroecossistemas, buscando soluções tecnológicas sustentáveis. A conscientização de produtores e consumidores levando-os a atitudes ecologicamente corretas, produzindo produtos livres de agrotóxicos impulsiona a busca por produtos alternativos que não agridam o ambiente (KRINSK; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

Os extratos botânicos são uma opção alternativa interessante especialmente para sistemas orgânicos, um mercado com potencial exponencial, e que vem sendo estudado para substituir e ou minimizar o impacto do inseticida químico sintético (MAZZONETTO; CORBANI; DALRI, 2013). A detecção de novas fontes de compostos inseticidas a partir da flora de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento constitui, ainda, uma das principais lacunas a serem preenchidas (ANSANTE et al., 2015).

As barreiras técnicas para o manejo de pragas têm muitas vezes limitado a viabilidade e consolidação do uso de inseticidas botânicos (RIBEIRO et al., 2012). Especificamente, para os extratos aquosos ou à base de solventes polares ou apolares, que podem apresentar uma menor persistência após a aplicação, menor durabilidade à conservação. Assim, demandando a necessidade da elaboração de formulações que permitam o aumento da sua viabilidade para uso nos sistemas agrícolas para a proteção das culturas. A emulsão é um tipo de formulação que consiste na mistura entre dois líquidos imiscíveis, tipo óleo e água utilizando métodos como agitação e adição de homogeneizadores, agentes surfactantes para unir o óleo e água (BAJPAI; GIRI, 2002).

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) é a principal espécie-praga da família Brassicaceae, cujos ataques severos podem inviabilizar áreas de cultivos, devido ao elevado dano (MORATÓ, 2000), associado ao desequilíbrio biológico causado pelo uso excessivo do controle químico sintético, onde dependendo da região pode totalizar até 20 pulverizações, ocorrendo até 4 aplicações semanais de acordo com a época de produção da cultura (VILLAS BÔAS et al., 2004).

As Annonaceae compreendem um grande número de gêneros e espécies, com cerca de 140 e 2.500, respectivamente (CHATROU et al., 2004; BRAGA SOBRINHO, 2010). Entre as espécies, 42, distribuídas em 14 gêneros, destacam-se as *Annona squamosa* e *A. mucosa* L., com potencial inseticida (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009, KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

As acetogeninas (ACGs) são compostos extremamente bioativos das anonáceas, únicos desta família, tendo descritas mais de 450, todas com estruturas diversificadas, que atuam como inibidor do transporte de elétrons mitocondriais e afetam a ação da NADH-ubiquinona oxidoreductase (ÁLVAREZ et al., 2008). A esquamocina é uma das principais ACGs na espécie *A. squamosa* (BERMEJO et al., 2005; YANG et al., 2009c; CHAMPY, 2011) promissora para o controle de artrópodes (ÁLVAREZ-COLOM et al., 2010; HOE et al., 2010; TOLOSA et al., 2012).

Pesquisas de diferentes partes da planta das espécies *A. squamosa* atestam controle para *P. xylostella* e *Trichoplusia ni* Hüb, 1803 (Lepidoptera: Noctuidae) (LEATEMIA; ISMAN, 2004; ISMAN, 2006; SEFFRIN et al., 2010), *Bemisia argentifolii* Bellow & Perr, 1994 (Hemiptera: Aleyrodidae), *Aphis gossypii* Glöver, 1877 (Hemiptera: Aphididae) (CHIEN-YIH LIN et al., 2009), *Sitophilus zeamais* Mots, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) (SAITO et al., 1989) e *Aedes aegypti* L, 1762 (Diptera: Culicidae) (COSTA et al., 2013); ao passo que a espécie *A. mucosa* apresentam bioatividade para *A. aegypti* (COSTA et al., 2013; 2016; 2017), *S. frugiperda* (ANSANTE et al., 2015), *S. zeamais* (RIBEIRO et al., 2013; 2016), *T. ni*, *Myzus persicae* Sulzer, 1776 (Hemiptera: Aphididae) (RIBEIRO et al., 2014), *Tibraca limbativentris* Stal. (Hemiptera: Pentatomidae) (KRINSKI; MASSAROLI, 2014), *Euschistus heros* Fabr. (Hemiptera: Pentatomidae) (TURCHEN et al., 2016) e *Panonychus citri* McGregor, 1916 (Acari: Tetranychidae), (RIBEIRO et al., 2014).

Tendo em vista a importância do cultivo de brássicas e o uso de extratos botânicos dentro do MIP (Manejo Integrado de Pragas), esta pesquisa teve por objetivo obter extrato etanólico de *A. mucosa* e uma formulação emulsionável estável do extrato hexânico de sementes de *A. squamosa*, avaliar as suas características organolépticas, analisar a estabilidade a longo e curto prazo, identificar e determinar os seus efeitos subletais e letais na fase embrionária, na capacidade de oviposição, nos estádios larvais de *P. xylostella*, avaliar

persistência do extrato e do formulado emulsionável em semicampo e a prospecção dos constituintes químicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Brassicaceae

A família botânica Brassicaceae possui cerca de 400 gêneros e aproximadamente 4000 espécies (KOCH et al., 2001; JOHNSTON et al., 2005). Destacam-se entre as olerícolas como a família mais numerosa, cujas espécies podem ser utilizadas para a alimentação humana na forma de folhas, inflorescências, hipocótilos; como sementes - na agroindústria na forma do processamento do óleo; na saúde - como fonte de minerais e vitaminas, além do uso na alimentação animal. Destacam-se pela importância socioeconômica as espécies: couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), repolho (*B. oleracea* L. var. *capitata*), couve chinesa (*B. rapa* L. var. *pikinensis*), couve-flor (*B. oleracea* L. var. *botrytis*), brócolis (*B. oleracea* L. var. *italica*), mostarda (*B. juncea* L.), nabo (*B. napus*), rabanete (*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativus*), agrião (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), rúcula (*Eruca sativa*), chingensai ou pak-choi (*Brassica rapa* var. *chinensis*) couve-de-bruxelas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) e a canola (*B. napus* L. e *B. rapa* L.) (FILGUEIRA, 2008; CASTRO-MELO;).

Os cultivos das brássicas apresentam grande importância socioeconômica no Brasil. As diversas espécies geralmente são plantadas em pequenas e médias áreas da agricultura familiar e são severamente atacadas por muitos artrópodes praga que podem causar danos e baixo desempenho técnico nos cultivos comerciáveis.

Segundo Gallo et al (2002), Kalyan et al. (2008); Seif; Nyambo (2013), as pragas das crucíferas são: pulgões, *Brevicoryne brassicae* (L., 1758) (Hemiptera: Aphididae) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae); moscas-branca, *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), *Aleyrodes proletella* (L., 1758) (Hemiptera: Aleyrodidae) e *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Hemiptera: Aleyrodidae); curuquerê da couve, *Ascia monuste orseis* (Latr., 1819) (Lepidoptera: Pieridae) ; traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758); lagarta rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae); lagarta mede palmo, *Trichoplusia ni* (Hueb., 1802) (Lepidoptera: Noctuidae); broca da couve, *Hellula phidylealis*, *H. undalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyralidae); vaquinha verde amarela, *Diabrotica speciosa* (Germ., 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae); percevejo da couve, *Bagrada* spp. (Hemiptera); vespa da couve, *Athalia* spp. (Hymenoptera); lagarta

gregária da couve, *Crocidolomia binotalis* (Zeller, 1852) (Lepidoptera: Pyralidea); lagarta mineira, *Liriomyza* spp. (Diptera); tripes, *Frankliniella* spp. (Thysanoptera); lagartas das vagens, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera; Noctuidae).

Dentre os insetos-praga potenciais da família Brassicaceae, destaque a traça-das-crucíferas *P. xylostella* considerada a mais importante, pois é uma espécie que tem sido registrada e estudada em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil (YANG; CHU; TALEKAR, 1994; JUSTUS; MICHELL, 1996; MICHEREF et al., 2000; MONNERAT et al., 2000; CASTELO BRANCO et al., 2003; BOIÇA JUNIOR et al., 2005; TORRES et al., 2006; FARIA et al., 2008; SILVA-TORRES et al., 2010; RONDELLI et al., 2011, 2013).

2.2 Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

A traça-das-crucíferas, *P. xylostella*, é um microlepidóptero de coloração parda, pertencente à ordem Lepidoptera e família Plutellidae (DICKSON et al., 1990; GALLO et al., 2002). É originária da região mediterrânea e se encontra em todos os continentes acompanhando a disseminação das culturas (MONNERAT et al., 2000). O primeiro registro no Brasil foi feito no estado da Bahia em cultivos de repolho (BONDAR, 1928), e ao longo dos anos, os relatos de ocorrências da praga foram registrados nos estados de Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (CASTELO BRANCO; GUIMARÃES, 1990; BARROS et al., 1993; MELO; CASTELO BRANCO; MADEIRA, 1994).

Os adultos apresentam dimorfismo sexual, onde os machos apresentam margem posterior nas asas anteriores branca e na posição de repouso forma uma mancha característica sobre a face dorsal, já a fêmea é mais clara (ROSÁRIO; CRUZ, 1986; IMENES et al., 2002). A mancha característica nos machos, de coloração clara em forma de diamante, caracteriza a praga também a ser conhecida como “Diamondback moth”. Também podem distinguir machos e fêmeas observando-se a parte ventral do inseto: o macho apresenta uma “fenda” no final do abdomen e na fêmea duas manchas circulares de coloração escura (IMENES et al., 2002; GALLO et al., 2002).

O método visual proposto por Liu; Tabashnik (1997), os quais observaram que no estágio larval o macho apresenta uma coloração clara no quinto segmento abdominal, que advém da presença das gônadas masculinas nesta região, sendo que as larvas fêmeas não apresentavam tal coloração. Esse método foi testado, com resultado satisfatório com 96 e 86% de acertos, para machos e fêmeas, respectivamente, na obtenção de adultos de sexo pré-determinado (CREMA; CASTELO BRANCO, 2004). A longevidade dos adultos chega a ser de 7 a 47 dias para as fêmeas, numa média de 16,2 dias e os machos vivem de 3 a 58 dias, numa média de 12,1 dias (HARCOURT, 1957).

Os ovos da traça-das-crucíferas são microscópicos, de coloração esverdeada-alaranjado, arredondados-elípticos, aplanados e com presença de relevos ondulados e medem menos de 1 mm de comprimento. As fêmeas podem depositar em média 160 ovos, podendo chegar a 350 ovos num ciclo de 15 a 35 dias dispostos preferencialmente na região abaxial das folhas e próximo à nervura central, podendo ser encontrados isolados ou em grupos de dois ou três (GALLO et al., 2002; MEDEIROS et al., 2004b).

O período de incubação pode variar de 2 a 4 dias. Ao final do 3º dia, os ovos ficam escurecidos e no 4º dia as lagartas rompem o córion, eclodindo primeiro a cabeça (OOI; KELDERMAN, 1979; GALLO et al., 2002). Apresentam no 1º ínstar o hábito minador, cujas lagartas penetram no interior da folha passando a alimentar-se do parênquima, durante 2 ou 3 dias (MEDEIROS et al., 2004b). Em seguida, abandonam a galeria e passam a alimentar-se da epiderme da face inferior da folha. O estágio larval divide-se em 4º instares (MONNERAT et al., 2000).

No 4º ínstar, final do estágio larval, a lagarta tece um casulo, constituído de pequenas malhas, facilmente reconhecido, na face abaxial das folhas. A pupa é do tipo obtecta (ROSARIO; CRUZ, 1986), e de acordo com Medeiros et al. (2004b) o período pupal pode variar entre 3 a 5 dias à 28°C. A duração do ciclo biológico da traça-das-crucíferas varia conforme a temperatura (MEDEIROS et al., 2004b; DIAS; SOARES; MONNERAT, 2004), fotoperíodo e fonte de alimento, podendo ocorrer de 14 até 30 gerações do inseto por ano.

2.3 Táticas de controle usadas no manejo integrado de *Plutella xylostella*

As táticas de controle integradas são necessárias nos sistemas produtivos das brássicas no território brasileiro, devido ao surgimento de populações de insetos resistentes ao controle químico, sendo assim, inúmeras pesquisas foram realizadas entre as de Micheref et al. (2000); Monnerat et al. (2000); Castelo Branco et al. (2003); Boiça Junior et al. (2005); Torres et al. (2006); Faria et al. (2008); Silva-Torres et al. (2010); Rondelli et al. (2011, 2013), os quais buscaram avaliar e propor medidas de controle mecânico-cultural, biológico, comportamental, químico, resistência de plantas e extratos botânicos para *P. xylostella*.

2.3.1 Controle mecânico-cultural

As áreas produtoras de brássicas são ininterruptamente cultivadas, principalmente nas pequenas propriedades, com ciclos sucessivos, sem rotação de cultura, plantios de diferentes estágios fenológicos, proximidade entre as áreas produtoras, ausência organizacional dos produtores sobre o uso das táticas de manejo de insetos-praga, inexistência de acompanhamento técnico, entre outros. Diante disso, converge-se o surgimento de surtos populacionais de insetos-praga, que incidem diretamente na cadeia produtiva, donde produtores pela facilidade e oferta utilizam a tática do controle químico sintético, porém, o uso desregulado pode gerar problemas de contaminação ao meio ambiente e à cadeia trófica, além de gerações de populações resistentes são selecionadas.

A catação manual do inseto-praga se mostra viável para a *P. xylostella* em pequenas áreas de cultivo das brássicas, ao passo, que se torna impraticável para extensas áreas. O conjunto de práticas que englobam práticas culturais nos sistemas de produção como: correção da acidez do solo, manejo da fertilidade do solo, densidade de plantio, manejo da água no solo, rotações de culturas, aração do solo, épocas de plantio, destruição de restos de cultura, mostrou-se práticas viáveis para o controle de *P. xylostella*. No controle físico utiliza-se de práticas para o controle dos insetos-praga através do uso do fogo, drenagem, inundações, armadilhas luminosas e temperatura (WATERHOUSE, 1987; GALLO et al., 2002).

As lagartas de *P. xylostella* são sensíveis aos períodos de chuvas e alta umidade, mais da metade das três primeiras fases larvais morrem por afogamento nas gotículas de água (WATERHOUSE, 1987). A precipitação influencia no controle da traça-das-crucíferas pela

remoção das larvas da planta independente da idade da planta ou larva, porém, foi observado que a remoção de larvas foi superior quando as plantas de repolho estavam com aproximadamente 40 dias de idade (folhas abertas) para as larvas de primeiro e segundo ínstar (OLIVEIRA; JUNQUEIRA; FRANÇA, 2000). McHugh; Foster (1995) verificaram que larvas de primeiros estádios ao serem removidas pela irrigação por aspersão convencional são incapazes de retornar à sua posição na planta e são afogadas nas poças de água formadas no solo ou nas axilas das folhas, podendo reduzir as infestações da traça-das-crucíferas em 37,5-63,9% em comparação com um controle irrigado por gotejamento.

De acordo com Oliveira; Junqueira; França (2000) a irrigação aplicada à cultura via aspersão convencional pode vir a ser utilizada como parte de programas de manejo integrado da traça-das-crucíferas, reduzindo a quantidade de inseticidas empregada no ciclo da cultura e permitindo aos produtores enviar produtos mais saudáveis ao mercado consumidor.

2.3.2 Controle biológico

O controle biológico baseia-se no uso de inimigos naturais (parasitóides e predadores) e agentes patogênicos (vírus, fungos, bactérias, nematóides entre outros) no controle de insetos-praga de diversas ordens taxonômicas.

Dentre os patógenos que controlam *P. xylostella*, podem-se citar *Zoophthora radicans* (Brefeld, 1964), *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879), *Isaria farinosa* (Holmsk) Fr.(1832) e *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (MEDEIROS et al., 2004; FURLONG; WRIGHT; DOSDALL, 2013).

O emprego da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (*Bt*) tem sido feito há mais de 50 anos e têm proporcionado vantagens, como a especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao meio ambiente, inocuidade a mamíferos e vertebrados, assim como a ausência de toxicidade às plantas (MONNERAT; BRAVO, 2000; MEDEIROS et al, 2005).

Dentre os microrganismos, *Bt* é a mais estudada e utilizada para a maioria das pragas agrícolas, inclusive *P. xylostella* (MEDEIROS et al, 2005). Os produtos à base de *Bt* representam 90% dos biopesticidas e são usados especialmente em países como os EUA. Na América Latina, Cuba e México lideram a utilização para controle de pragas nas culturas de

algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho e pastagens (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003).

Diversos laboratórios em todo o mundo buscam novos isolados de *Bt* que produzam diferentes toxinas ou que estejam mais adaptados às condições locais, para que tenham melhor eficácia em campo e possam ser usados no manejo da resistência de insetos (MONNERAT; BRAVO, 2000).

De acordo com a plataforma Agrofit (2017), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os produtos formulados à base de *Bt* existentes no mercado brasileiro são 22, pertencentes a 9 empresas titulares do registro, das quais 11 marcas com registro à família Brassicaceae, com classificação toxicológica variando de pouco, mediantemente, altamente e extremamente tóxico. Estes produtos comerciais têm como ingrediente ativo o sorotipo de *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* e são utilizados no controle de lagartas como *P. xylostella*, *A. monuste orseis* e *T. ni*.

Castelo Branco et al. (2003) obtiveram resultados para controle de *P. xylostella* com *Bt*, chegando a 100% de mortalidade para larvas de 2º ínstar. Monnerat et al. (2000) indicam que os produtos biológicos à base de *Bt*, reduzem a população de *P. xylostella*, sem afetar a população ou ocasionando menor dano sobre os parasitoides quando comparados aos inseticidas químicos.

De acordo com Godonou et al. (2009) o fungo entomopatogênico *B. bassiana* quando avaliado em campo controlou *P. xylostella*, proporcionando menor número de lagartas vivas por planta e maior peso médio das cabeças de repolho. Rondelli et al. (2011; 2013) constataram compatibilidade do uso associado *B. bassiana* em mistura com o óleo de mamona no controle de *P. xylostella*. A associação do óleo de mamona com *B. bassiana* não aumentou a mortalidade de *P. xylostella*, ao passo que o uso isolado do óleo de mamona reduziu a viabilidade pupal, reduzindo significativamente os níveis da traça-das-crucíferas. Em outro estudo Rondelli et al. (2012) constataram que os isolados CCA/UFES-4, CCA/UFES-18, CCA/UFES-31 e ESALQ-447, bem como o formulado Boveril® PM, possuem viabilidade para serem utilizados no controle da traça-das-crucíferas, podendo ser uma alternativa eficaz ao controle convencional realizado, normalmente, com inseticidas sintéticos, objetivando o

manejo da resistência de *P. xylostella* e, sobretudo na agricultura orgânica, na qual não é permitido o uso de inseticidas químicos sintéticos.

Rondelli et al. (2011; 2013) avaliaram associações sinérgicas do potencial do agente entomopatogênico aos extratos vegetais com resultados promissores para o controle de *P. xylostella*, assim, Razeq; Gowen (2002) buscaram avaliar o uso de extratos de nim e nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) e *Steinernema* (Travassos, 1927) com resultados favoráveis para o controle da traça-das-crucíferas. Estes nematóides são agentes etiológicos de patologias que muitas vezes desencadeiam na morte do inseto (VOSS et al., 2009; KOOLYOTIL et al., 2013).

De acordo com Owuama (2001) os NEPs possuem relação mutualística com bactérias do seu tubo digestivo, e estas quando regurgitadas, são as responsáveis pela rápida morte do hospedeiro por septicemia, pois, estas bactérias degradam a hemolinfa e os tecidos do inseto, que serve de alimento para os NEPs. Os principais gêneros de bactérias simbiotes são *Xenorhabdus* (THOMAS; POINAR, 1979) e *Photorhabdus*. As bactérias simbiotes produzem toxinas que matam o hospedeiro 24 a 48 horas reiniciando o ciclo (LEITE et al., 2005).

Monnerat et al. (2000) estudando a evolução da população de *P. xylostella* e dos seus parasitóides na cultura do repolho no Brasil, coletaram *Diadegma* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae) e *Cotesia plutellae* Kurdjumov (Hymenoptera: Braconidae), destes, o primeiro parasitoide foi o mais abundante, responsável por mais de 50% do parasitismo, seguido pelo segundo e o último que foi o menos frequente.

Para Furlong; Wright; Dossall (2013) os parasitóides que possuem potencialidade para o controle de *P. xylostella* destacam-se *D. semiclausum* (Hellen, 1949) (Hymenoptera: Ichneumonidae), que é parasitóide larval e pupal, *Diadromus collaris* (Gravenhorst, 1829) (Hymenoptera: Ichneumonidae), parasitóide pupal, *C. vestalis* (Haliday, 1834) (Hymenoptera: Braconidae), um parasitóide larval e *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitóide larval-pupal.

Parasitóides de *P. xylostella* são identificados em diferentes partes do mundo, muitos dos quais ocorrem constantemente junto ao inseto-praga. Altos níveis de parasitismo têm sido

reportados para manter baixos os níveis da traça-das-crucíferas em muitas partes do mundo (WATERHOUSE, 1987).

O gênero *Trichogramma* sp. destaca-se pela ampla distribuição geográfica, por serem especializados, com ação sobre ovos do inseto-praga, com comprovada eficiência, especialmente aos insetos pertencentes à ordem Lepidoptera (ZUCCHI; MONTEIRO, 1997). Pratisoli et al. (2008) avaliaram várias espécies de *Trichogramma* sp. no controle da traça-das-crucíferas, no qual a espécie *T. atopovirilia* foi a espécie de melhor desempenho em laboratório quando criada sobre ovos da traça-das-crucíferas. Por ser um parasitoide de ovos, mata a praga antes de ocasionar danos ao cultivo (CARDOSO; PAMPLONA; MICHEREFF-FILHO, 2010). Porém, essa tática de controle precisa ser testada nas diversas condições dos agroecossistemas.

O endoparasitóide gregário *O. sokolowskii* tem sido citado por exercer controle natural da *P. xylostella* em várias regiões produtoras de brássicas do mundo (WANG et al., 1999), inclusive no agreste de Pernambuco (FERREIRA; BARROS; TORRES, 2003; SILVA-TORRES et al., 2010). Torres et al. (2010) avaliando o parasitismo da traça-das-crucíferas por *O. sokolowskii* concluíram que o parasitoide tem potencial para localizar e parasitar o inseto-praga, seja em altas ou baixas densidades populacionais do hospedeiro, ou seja, a taxa de parasitismo é mantida constante, apesar do parasitóide parasitar mais lagartas de *P. xylostella* com o aumento da densidade do hospedeiro. É observado para algumas espécies de parasitóides o aumento na taxa de parasitismo mediante a densidade do hospedeiro (FARIA et al., 2000, 2008; SAMPAIO; BUENO; PÉREZ-MALUF, 2001; MAKUNDI; SARIAH, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva Torres et al. (2010), que avaliaram um número constante e excedente de lagartas de *P. xylostella* versus um número variável de lagartas diariamente ofertadas a *O. sokolowskii*.

2.3.3 Controle comportamental

O uso de semioquímicos, principalmente os feromônios, em ações de controle de insetos-praga aumenta a eficiência do controle comportamental e ainda contribui para a preservação do meio ambiente. Portanto, esta tecnologia está na vanguarda do modelo preconizado para a agricultura do futuro (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

Pesquisa na área de monitoramento populacional de *P. xylostella* por meio do uso de armadilhas com feromônio sexual conota 35 anos, correlacionando os adultos capturados com a subsequente presença de larvas na cultura do repolho (BAKER; SHELTON; ANDAROLO, 1982). No Brasil, pesquisas sobre o uso de feromônios em armadilhas vêm tornar os resultados aplicáveis na área de produção comercial das brássicas (CASTELO BRANCO, 1999; MICHEREFF et al., 2000; IMENES et al., 2002).

Mclaughlin; Mitchell; Kirsch (1994) demonstraram interferência nos acasalamentos de *P. xylostella* com o uso de armadilhas de feromônio sexual sintético, mostrando ser eficiente para proteção da cultura de repolho em áreas menores que 8 ha na Flórida. Quando Michereff et al. (2000) avaliaram o uso de feromônio sexual para captura de machos de *P. xylostella*, concluíram que formulações de feromônio sexual sintético disponíveis no mercado internacional e com as características testadas nas proporções iguais entre Z11-16:Ald e Z11-16:Ac e com a presença de Z11-16:OH, mostram-se promissoras para o monitoramento em cultivos de repolho nas condições brasileiras. No mesmo trabalho avaliaram modelos e altura de instalação da armadilha, cuja armadilha do estilo alada (wing-trap), com abertura de acesso para todas as direções e com anteparos internos, proporcionou a maior captura de machos de *P. xylostella*. A melhor altura de instalação da armadilha corresponde ao ápice das plantas de repolho (30 cm).

Resultados semelhantes confirmaram a eficiência de atratividade do feromônio sexual sintético, Bioplutella[®], em armadilha adesiva do tipo delta, instalada mais próxima ao nível do solo (50 cm), capturando machos da traça-das-crucíferas, evidenciando a possibilidade de seu uso para monitoramento, para fins de manejo e tomada de decisão quanto às medidas de controle a serem utilizadas (IMENES et al., 2002).

2.3.4 Método por resistência de plantas

Os insetos possuem atividade alimentar estimulados por nutrientes como açúcares, aminoácidos, proteínas e outros metabólitos secundários que ocorrem na maioria das plantas, ao passo que o inseto *P. xylostella* torna-se especialista por necessitar de estímulos químicos mais específicos para a alimentação. Esta característica limita a variedade de hospedeiros a

um grupo particular de espécies da família Brassicaceae (SARFRAZ; DOSDALL; KEDDIE, 2006).

A resistência das brássicas aos insetos-praga tem sido avaliada com base nas características: cerosidade da superfície foliar, determinada pelo teor de alceno, e quanto ao teor de sinigrina (2-propenilglucosinolato) presente nas folhas (ULMER et al., 2002).

Torres (2004), avaliando a biologia de *P. xylostella* sobre cultivares de repolho por duas gerações sucessivas, classificaram as cultivares Ruby Ball, Coração de Boi e Matsukase Sakata como moderadamente resistentes; Chato de Quintal, Louco de Verão, Roxo Mamuth Gigante e Toshin Takii como suscetíveis e Sessenta Dias como altamente suscetível. Já Thuler; Bortoli; Hoffmann-Campo, (2007) em estudo avaliando resistência de cultivares de repolho e de couve na biologia da traça-das-crucíferas classificaram as cultivares de couve-manteiga “Geórgia” e “Geórgia híbrido HS20” e variedade de repolho “Roxo” como altamente suscetíveis; repolho “Roxo precoce” e “Midori” como suscetíveis e, repolho verde “Chato de Quintal” como moderadamente resistente à *P. xylostella* quanto à presença de glucosinolatos, porém, não apresentam a substância secundária sinigrina.

Boiça Júnior; Chagas Filho (2009) avaliaram a não preferência para alimentação com e sem chance de escolha de *P. xylostella* em genótipos de couve-flor, e não verificaram diferenças significativas da massa consumida tanto por lagartas recém-eclodidas quanto de quarto instar. No entanto Thuler; Bortoli; Hoffmann-Campo (2007) obtiveram mortalidade de 38,70% de lagartas quando alimentadas com Chato de Quintal, sendo esta cultivar aquela que proporcionou maior mortalidade das larvas comparativamente a Midori, Roxo Precoce, HS20, Geórgia e Híbrido Roxo. Boiça Júnior et al. (2013) como também Vendramim; Boiça Júnior; Chagas Filho (2010) não verificaram diferenças da massa consumida de discos foliares das cultivares Ruby Ball e Chato de Quintal na atratividade de lagartas de *P. xylostella*.

Em estudo avaliando o efeito de cultivares para resistência, Boiça Júnior et al. (2013), avaliaram a mortalidade de pupas de *P. xylostella*, no qual não houve diferença para as cultivares Ruby Ball e Chato de Quintal, bem como a mortalidade total (lagartas + pupas), a qual foi de 50% para a cultivar Ruby Ball e 58,33% para Chato de Quintal. Corroborando Vendramim; Boiça Júnior; Chagas Filho (2010) não observaram diferenças na viabilidade pupal entre essas mesmas cultivares, porém, pupas cujas lagartas foram criadas sobre Toshin

Takii e Coração de Boi apresentaram os menores e maiores valores para esse parâmetro, 50,00 e 82,02%, respectivamente.

Os glicosinolatos são compostos que atuam como metabólitos secundários de plantas, consistindo numa barreira química em resposta a desafios bióticos, reduzindo o dano causado por fitopatógenos e insetos-praga (HALKIER; GERSHENZON, 2006). Mais de 120 glicosinolatos foram identificados, sendo de ocorrência natural como constituintes de espécies vegetais, quase exclusivamente das espécies brássicas e algumas poucas famílias relacionadas (REICHELTL et al., 2002).

O teor de sinigrina presente nas folhas de repolho *B. oleracea* var. *capitata* tem sido predominantemente relacionado com a obtenção de cultivares resistentes à traça-das-crucíferas. Este componente pode estar ligada a estímulo na seleção do substrato para a oviposição por *P. xylostella* (THULER, 2003).

A sinigrina presente em cultivares de brássicas, mesmo em baixos níveis, pode influenciar negativamente insetos polípagos como o pulgão *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) e a lagarta *Mamestra configurata* (Walker, 1856) (Lepidoptera: Noctuidae), mas pode não afetar algumas espécies, específicas de brássicas, como o pulgão *B. brassicae* e a lagarta *P. xylostella* (BODNARYK, 1997; COLE, 1997).

Spencer (1996) utilizou substrato para postura com diferentes quantidades de sinigrina e alcanos, e verificou que à medida que aumentou o teor de sinigrina nos tratamentos, o número de ovos de *P. xylostella* também aumentou, sendo maior, no entanto, no tratamento com alto teor de sinigrina associada ao alcanos. Observou que as ceras isoladas não são estimulantes para oviposição, ao contrário da sinigrina sozinha, que é um excelente incitante à postura.

2.3.5 Controle químico

O controle químico através do uso de inseticidas químicos sintéticos é o método mais utilizado no manejo de *P. xylostella*, e dependendo da região pode chegar a 20 pulverizações durante o ciclo vegetativo e ocorrem até 4 aplicações semanais de acordo com a época de produção da cultura (VILLAS BÔAS et al., 2004).

No Brasil de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, 2017) foram aplicados quantitativos nas lavouras (toneladas – t.) 129.835, 130.362 e 161.819 de inseticidas via foliar, movimentando valores econômicos (US\$ 1000) 1.947.485, 2.412.091 e 2.972.108, nos anos 2010, 2011 e 2012 respectivamente. No setor hortícola foram comercializados agrotóxicos (t.) 5.667, 5.194, 5.171, 6.621 e 10.697, em valores (US\$ 1000) 71.731, 73.195, 74.991, 99.670 e 121.704 nos anos 2010, 2011, 2012, 2013 e 2014 respectivamente. Contudo, o mercado dos agrotóxicos é crescente a cada ano, em quantidade e valores monetários, porém, prescindentes de passivos ambientais, para Monnerat et al. (2004) os agrotóxicos trazem riscos de intoxicação aos produtores, animais domésticos e selvagens podendo também deixar resíduos nos alimentos que são consumidos em sua maioria *in natura* ou com pouco preparo, além da contaminação do ambiente e, principalmente, dos inimigos naturais.

Villas Bôas et al. (2004) avaliando inseticidas para o controle de *P. xylostella* e o impacto sobre população natural de parasitóides concluíram que os produtos Spinosad, Indoxacarb e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foram os mais eficientes para o controle, porém, o produto Spinosad apresentou impacto na população de parasitóides. Lima; Barros (2000) obtiveram para o inseticida químico lufenuron (Match[®]), mais de 90% de mortalidade de larvas de *P. xylostella*, o produto testado demonstrou atuação no processo de ecdise do inseto, agindo como regulador do crescimento e afetando a velocidade de mudança de instares, resultado semelhante obtiveram Thuler; Bortoli; Barbosa (2007), com 100% de mortalidade larval, porém, o período pupal não foi influenciado no controle químico Match[®].

Thuler; Bortoli; Barbosa (2007) avaliaram toxicidades de diferentes inseticidas químicos, lufenuron (Match[®]) e deltametrina (Decis 25 CE[®]) e produtos vegetais no controle de *P. xylostella* e concluíram para o inseticida deltametrina que as mortalidades não

ultrapassaram 22% para nenhuma das concentrações testadas em relação à testemunha, inferiram que a população do inseto-praga, apresenta indícios de resistência ao inseticida. Corroborando com Castelo Branco et al. (2003) cuja maior porcentagem de mortalidade larval foi 41,1% de populações da traça-das-crucíferas, oriundas de diferentes regiões do Brasil, com o tratamento químico deltametrina.

Hoje existem 862 casos registrados em todo mundo de resistência à inseticidas a *P. xylostella*, no qual abrange 95 ingredientes ativos, sendo destes 14 casos no Brasil, com registros nos Estados da Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Paraná (IRAC:APRD, 2017), como também, à quase todos os grupos de inseticidas utilizados (RIDLAND; ENDERSBY, 2011), incluindo novos compostos, como à classe química das diamidas antranílicas (WANG; WU, 2012). Ataques mais severos podem inviabilizar áreas de cultivos, devido ao elevado dano (MORATÓ, 2000), e as perdas ocasionadas por *P. xylostella* que podem chegar a 1 bilhão de dólares por ano (IRAC, 2016).

A utilização inadequada do controle químico vem aumentando a seleção de população resistente, dentre os quais Georghiou; Lagunes-Tejada (1991) apontaram a traça-das-crucíferas como uma das espécies com maiores casos de resistência. No Brasil essa resistência à inseticidas foi relatada por Castelo Branco; Gatehouse (1997), restrito somente ao Distrito Federal, em relação à diferentes grupos ativos, piretroides, organofosforados e *B. thuringiensis*. Oliveira et al. (2011) e Silva et al. (2012) observaram a resistência de *P. xylostella* a oxadiazinas, benzoilureias e piretroides, nos Estados de Pernambuco e do Espírito Santo.

Santos et al. (2011) avaliaram resistência à inseticidas de diferentes populações da traça-das-crucíferas de sete regiões tradicionais produtoras do Estado de Pernambuco, no qual a população coletada no município de Bezerros, apresentou os maiores índices de resistência à diafentiuron (1,6 vezes), metomil (4,0 vezes), indoxacarb (25,3 vezes), abamectina (61,7 vezes) e lufenuron (705,2 vezes), quando comparado a população de referência, ao passo, que a população de Bonito apresentou resistentes para lufenuron (33% vezes) e abamectina (12% vezes). Os resultados indicam que as falhas no controle químico praticado pelos produtores, reforçando a necessidade de um programa de gestão a resistência aos inseticidas.

2.3.6 Controle com extratos vegetais

Produtos naturais extraídos de plantas constituem-se em fonte de substâncias bioativas compatíveis com programas de MIP e MEP (Manejo Ecológico de Pragas), o que pode inibir a aplicação descontrolada de inseticidas organossintéticos (VENDRAMIN; SCAMPINI, 1997; MEDEIROS; BOIÇA JÚNIOR; TORRES, 2005).

As espécies botânicas pertencentes aos biomas brasileiros e espécies exóticas são objetos de estudos na área do controle de insetos-praga e fitoquímica, assim espécies das famílias Meliaceae, Annonaceae e Anacardiaceae são amplamente estudadas, porém outras espécies pertencentes às famílias Mimosaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Piperaceae, Chenopodiaceae entre outras, apresentam potencialidades (MEDEIROS; BOIÇA JÚNIOR; TORRES, 2005; BOIÇA JUNIOR et al., 2005; ; TORRES, 2006; COVARRUBIAS et al., 2015). Essa utilização é explicada pela presença de metabólitos secundários, que são compostos cuja função está relacionada com a defesa química das plantas contra herbivoria, seja por inibir a alimentação, reduzir a oviposição, por interferir no crescimento larval.

Para Oliveira et al. (2007) o emprego de substâncias extraídas de plantas silvestres com o poder inseticida apresenta algumas vantagens quando comparada aos sintéticos: são renováveis, facilmente degradáveis, ou seja, não contaminam o meio ambiente. A seleção de populações resistentes de insetos a estas substâncias é lenta, pois o produto natural geralmente apresenta diversos compostos com ação inseticida o que reduz o processo de seleção, além de não deixarem resíduos nos alimentos e no solo, são seguros aos operadores, e de baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores. O fato de serem produtos facilmente biodegradáveis, após exposição aos raios solares, é também uma desvantagem, pois em termos práticos, sua ação inseticida é rapidamente reduzida em condições de campo.

As estruturas químicas destes produtos são muito grandes e complexas, difíceis de isolar e sintetizar, e quando sintetizadas, não possuem a mesma ação que o produto natural, provavelmente pela falta de algum efeito sinérgico, estabilizante ou outro componente na sua formulação (RODRÍGUEZ; VENDRAMIM, 1995).

Em estudo, Medeiros; Boiça Júnior; Torres (2005) avaliaram o efeito dos extratos aquosos de 18 espécies de plantas, dos quais *Enterolobium contortisilliquum* (frutos),

Sapindus saponaria (frutos) e *Trichilia pallida* (folhas) apresentaram 100% de deterrência, seguidos dos extratos de *Nicotiana tabacum* (folhas), *Chenopodium ambrosioides* (ramos+folhas+frutos), *Trichilia pallida* (ramos) e *Bougainvillea glabra* (folhas), com deterrência acima de 95% na oviposição da traça-das-crucíferas.

De acordo com Chen et al. (1996), extratos orgânicos de *Melia azedarach* causaram 93,5% de redução na oviposição de *P. xylostella* na concentração de 4%, sendo essa redução proporcional à concentração utilizada. Corroborando-se com Torres et al. (2006) os quais verificaram que os extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *M. azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* possuem efeito tóxico para ovos de *P. xylostella*, sendo dependente do aumento da concentração. Quando a *P. xylostella* foram alimentadas com folhas de couve tratadas com o extrato aquoso de *A. indica* proporcionou 25,20% de ovos inviáveis na avaliação da biologia do inseto.

Torres; Barros; Oliveira (2001) constataram 100% de mortalidade de lagartas de *P. xylostella* quando alimentadas com folhas de couve tratadas com extratos aquosos de *A. indica* e *A. pyrifolium*, na concentração de 10%, resultado semelhante foi constatado por Boiça Junior et al. (2013) com o extrato de *A. indica*, nas concentrações de 5 e 10%, igualmente eficientes na mortalidade de lagartas de traça-das-crucíferas a 1, 3 e 5 dias após o início do teste, diferindo significativamente da testemunha.

De acordo com Boiça Junior et al. (2005), os extratos aquosos na concentração de 10% de *E. contortisilliquum*, *N. tabacum*, *S. saponaria* e *T. pallida* resultaram em 100% de mortalidade das larvas de *P. xylostella*. Torres et al. (2006) determinaram as concentrações subletais e letais do extrato aquoso de nim, assim, na CL₅₀ para lagartas de primeiro instar de 0,06%, enquanto a dose letal desse mesmo extrato foi de 0,60%, afetando a biologia de *P. xylostella*.

Thuler; Bortoli; Barbosa (2007) avaliaram produtos vegetais e concluíram que os inseticidas vegetais Organic Neem[®] e Biopirol[®] foram eficientes para o controle larval de *P. xylostella*, nas CL₅₀ 0,16474 e 3,01224%, respectivamente. Quanto à mortalidade das pupas, Organic Neem[®] apresentou atividade, reduzindo significativamente a possibilidade de os insetos chegarem à fase adulta, demonstrando o efeito da azadiractina sobre a biologia do inseto, reduzindo suas atividades vitais e até levando-o à morte.

Tais compostos podem proporcionar ao agricultor de baixa renda, um método fácil, natural e econômico de manejo de insetos, utilizando as ferramentas do seu próprio ecossistema (HERNANDEZ; VENDRAMIM, 1997), porém, é importante que existam estudos na área fitoquímica, visando elucidar os seus efeitos no meio ambiente, síntese química e toxicologia na cadeia alimentar.

2.4 Annonaceae

A família Annonaceae compreende um grande número de gêneros e espécies, a maioria nativa das regiões tropicais e subtropicais (DONADIO; DURIGAN, 1992). Constituída por cerca de 120 gêneros e aproximadamente 2.300 espécies (BRAGA SOBRINHO, 2010). No Brasil, são registrados 29 gêneros de Annonas, dentro dos quais cerca de 260 espécies, sendo algumas de importância econômica, distribuídas principalmente na Amazônia, mas também, nos biomas da Mata Atlântica e Cerrado (LEMOS, 2011; 2014).

Muitas espécies de interesse para o agronegócio da fruticultura são cultivadas em vários países como Chile, México, Austrália e Brasil. As principais espécies cultivadas nas regiões tropicais são pertencentes ao gênero *Annona*, destacando a *Annona squamosa* (L.), conhecidas popularmente no Brasil como fruta-do-conde, ata ou pinha e *A. muricata* (L.), a graviola. Nas regiões subtropicais as espécies mais cultivadas são *A. cherimola* (Mill.) e seu híbrido atemóia (*A. cherimola* x *A. squamosa*), está última sendo cultivada também no Brasil (KAVATI, 1992).

A pinheira, *A. squamosa* é possivelmente originária das terras baixas da América Central, mais precisamente da Ilha de Trinidad, nas Antilhas, sendo levada inicialmente para o México e depois introduzida no Oriente, nas Filipinas e na Austrália. Esta fruteira tem grande importância na Índia, pelas populações espontâneas em número e abundância, acreditou-se a princípio que seria nativa daquele país (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). No Brasil a *A. squamosa* tem sido cultivada em quase todo o país, mas é na região nordeste que o seu cultivo tem se disseminado mais intensamente, apresentando mais de 90% de toda área cultivada do país (LEMOS, 2014).

A *A. mucosa* (Jacq.) Baill. (anteriormente agrupados no gênero *Rollinia* (RAINER, 2007) é uma planta nativa da Floresta Amazônica e Mata Atlântica, com ampla dispersão

geográfica, o fruto é conhecido popularmente como biribá, araticum, ariticum, condessa, fruta-da-condessa, fruta-de-conde ou graviola brava (LORENZI, 2002). De acordo Costa; Muller (1995) o biribazeiro apresenta porte arbóreo, tipicamente tropical, explorada sem qualquer ordenação cultural, sendo frequentemente encontrada em quintais e bosques silvestres. Os frutos têm grande aceitação popular, sendo na maioria das vezes comercializados e consumidos na forma “in natura”.

As indústrias alimentícias que processam a polpa das anonáceas descartam os resíduos do processamento, principalmente as sementes, que podem se tornar um produto de valor agregado na cadeia da agroindustrialização, podendo já ser utilizados no processo de preparo dos extratos botânicos para o controle dos insetos-praga. Matéria prima de fácil acesso, a depender da região e do centro produtor, pode gerar a oferta e sem custo de aquisição até o momento, aos agentes da pesquisa e dos produtores rurais, os quais visam inserir como tática de controle com potencial inseticida nos sistemas agrícolas.

2.4.1 Annonaceae no controle de artrópodes

A família Annonaceae apresenta 42 espécies, em 14 gêneros com propriedades inseticidas: uma espécie nos gêneros *Anaxagorea*, *Artabotrys*, *Cananga*, *Cleistopholis*, *Monodora*, *Oxandra*, *Pachypodanthium*, *Polyalthia*, *Popowia* e *Xylopia*, duas espécies no gênero *Asimina*, *Goniothalamus* e *Rollinia* e 13 espécies no gênero *Annona*, com ênfase as espécies *A. muricata* e *A. squamosa* atualmente as mais utilizadas para estudos de potencial inseticida (KRINSKI; MASSAROLI, MACHADO, 2014).

Diferentes partes da planta das espécies das anonáceas têm apresentado propriedades fitoquímicas para o controle de insetos de importância agrícola e médica. Extratos aquosos da *A. squamosa* apresentam efeitos larvicida sobre *P. xylostella* e *T. ni*, pragas das brássicas (LEATEMIA; ISMAN, 2004). De acordo com Seffrin et al. (2010) os extratos metanólicos de *A. atemoya* e *A. squamosa* apresentam fagodeterrência, redução do desenvolvimento larval e toxicidade sobre larvas de 3º ínstar de *T. ni*. Isman (2006) relata que os extratos etanólicos e aquosos de sementes de *A. squamosa* coletados em vários locais no leste da Indonésia são efetivos contra *P. xylostella*. Óleo de sementes da *A. squamosa*, na concentração de 0,5% apresentou controle para *B. argentifolii* e *A. gossypii* (CHIEN-YIH LIN et al., 2009).

Estudos avaliaram os efeitos tóxicos e deterrentes das ACGs extraídas de folhas e ramos frescos de *A. montana* sobre *S. frugiperda*. As ACGs *cis*-anonacina-10-one, densicomacina-1, gigantetronenina apresentaram efeito deterrente a uma concentração de apenas 100 mg L⁻¹ (BLESSING et al., 2010).

Ansante et al. (2015) avaliaram extratos etanólicos de diferentes espécies de anonáceas por screening a partir das folhas, galhos e sementes (*A. cacans* War., *A. montana* Macf., *A. mucosa* Jacq., *A. reticulata* L., *A. sylvatica* A. St.-Hil. e *Duguetia lanceolata* A. St.-Hil.) com ação bioinseticida contra *S. frugiperda*. O extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* foi o tratamento mais ativo, causando toxicidade aguda significativa (CL₅₀ = 842,9 mg kg⁻¹) e inibição do crescimento larval (CL₅₀ = 580,4 mg kg⁻¹) após 7 dias de exposição a dieta. Além disso, extratos etanólicos (1000 mg kg⁻¹) a partir de sementes de *A. cacans*, *A. montana*, *A. mucosa* e *A. sylvatica*; folhas e galhos de *A. reticulata* e *D. lanceolata* causam apenas efeitos subletais, reduzindo o peso das larvas de *S. frugiperda*. No entanto, extrato etanólico de *A. mucosa* (CL₉₀) mostrou uma eficácia semelhante à de dois inseticidas comerciais [Azadirachtin + 3-tigloylazadirachtol (Azamax[®] 1.2 CE) e clorantraniliprole (Premio[®] 20 SC)], que foram testados na concentração recomendada para o inseto estudado.

A *A. mucosa* apresenta potencial inseticida e ação letal sobre *A. aegypti*, com alteração comportamental antes da morte larval e alta mortalidade em baixas concentrações (CL₅₀ = 0,01 µg mL⁻¹ e CL₉₀ = 0,11 µg mL⁻¹) além de ser seletivo para os predadores *Culex bigoti* e *Toxorhynchites theobaldi* e apresentar baixa citotoxicidade para células humanas (COSTA et al., 2013; 2017). Neste estudo foi identificado a squamocin bis THF (C₃₇H₆₆O₇).

Outro estudo visando avaliar os modos de ação da squamocin na morfologia celular e expressão de genes para o vetor *A. aegypti* mostrou ação citotóxica com alterações no epitélio do intestino médio e células digestivas das larvas de *A. aegypti*, aumento da expressão para o gene de autofagia *Atg1* e *Atg8*, diminuição na expressão da V-ATPase, diminuição da expressão do gene *Aqp4* na CL₂₀ e inibição dos genes *Aqp4* no intestino médio deste vetor na CL₅₀. Estes múltiplos modos de ação para a squamocin são descritos pela primeira vez em insetos e são importantes porque diferentes locais de ação da squamocin de *A. mucosa* podem reduzir a possibilidade de resistência de *A. aegypti* a esta molécula (COSTA et al., 2016).

He et al. (1997) avaliaram propriedades pesticidas de 44 ACGs no ensaio para o controle da larva do mosquito da febre amarela. Os resultados demonstraram claramente que a maioria das ACGs tinha propriedades pesticidas. Além disso, indicaram que as ACGs adjacentes do bis-THF com três grupos hidroxí, por exemplo, bullatacina e trilobina, foram os mais potentes. Guadano et al. (2000) também descobriram que annonacin apresenta deterrência sobre *Leptinotarsa decemlineata* Stal., 1858 (Coleoptera: Chrysomelidae). e squamocin foram tóxicos para *L. decemlineata* e *M. persicae*.

O extrato acetônico da semente *A. squamosa* provocou 40% de mortalidade em *Musca domestica*, como também extrato hexânico do fruto e etanólico da semente diminuíram em 20 a 30% a população de *Z. subfasciatus* (SAITO et al., 1989).

Para investigar fontes potenciais de novos compostos protetores de grãos contra *S. zeamais*, avaliou a bioatividade de 66 preparados de extratos etanólicos a partir de 29 espécies pertencentes a 11 gêneros de diferentes Annonaceae do Brasil. Um teste de screening demonstrou que os efeitos bioativos mais pronunciados em *S. zeamais* foram causados por extratos etanólicos de sementes de *A. montana*, *A. mucosa*, *A. muricata* e *A. sylvatica*, causando a morte de todos os insetos expostos, inibição quase completa da descendência F1 e uma drástica redução nas perdas de grãos. Além disso, os extratos etanólicos obtidos das folhas de *A. montana*, *A. mucosa*, *A. muricata* e *D. lanceolata*, especialmente *A. montana* e *A. mucosa*, demonstraram efeitos bioativos significativos nas variáveis estudadas; No entanto, os níveis de atividade foram menos pronunciados do que nos extratos de semente, e a resposta dependia da concentração utilizada. Este estudo é o primeiro a relatar a atividade de metabólitos secundários de *D. lanceolata* em insetos, bem como a ação de *A. sylvatica* em pragas associadas aos grãos armazenados (RIBEIRO et al., 2016).

Ribeiro et al. (2013) avaliaram a bioatividade de extratos e frações obtidos de diferentes estruturas (folhas, ramos e sementes) de *A. mucosa* sobre *S. zeamais*. Os resultados preliminares mostraram que as frações em hexano e diclorometano apresentaram as maiores médias de mortalidade sobre *S. zeamais*. Em seguida, os autores selecionaram a fração em hexano para os particionamentos, verificando que as frações hidroalcoólicas e em diclorometano foram mais promissoras. Segundo os autores, os compostos majoritários

encontrados nessas frações e que revelaram maior bioatividade sobre *S. zeamais* foram às ACGs e o alcalóide isoquinolina.

Em outro estudo Ribeiro et al (2014) avaliaram a toxicidade de extratos etanólicos de sementes de espécies de *Annona* brasileira (*A. montana*, *A. mucosa*, *A. muricata* e *A. sylvatica*) e um bioinsecticida comercial à base de ACG (Anosom[®]), sobre *T. Ni* e *M. persicae*, em laboratório, extratos de *A. mucosa* e *A. sylvatica*, bem como Anosom[®] foram especialmente ativos por ação oral (dieta artificial) e tópica, ao passo que, em semi-campo o extrato formulado de *A. mucosa* e Anosom[®] foram altamente efetivos (> 98% de mortalidade) contra o terceiro ínstar de larvas de *T. ni* e quando comparado ao inseticida comercial à base de piretrinas (Insect Spray[®]) utilizado como controle positivo. Semelhante aos resultados com *T. ni*, o extrato de *A. mucosa* mostrou a maior atividade inseticida sobre *M. persicae*, seguido do extrato de *A. sylvatica* e Anosom[®]. Em semicampo, a redução da população de pulgões com o uso do extrato de *A. mucosa* foi superior ao fornecido por outros tratamentos, incluindo o controle positivo.

Carneiro; Pereira; Galbiati (2013) avaliaram o extrato etanólico de sementes de *A. coriacea* em ninfas e adultos de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera: Reduviidae), cujo extrato foi capaz de interromper o desenvolvimento ninfal e dos adultos, provocando concomitantemente anormalidades morfológicas nas ninfas. Em outra pesquisa foi testada a ação inseticida do extrato de *A. coriacea* sobre ninfas de *Dichelops melacanthus* Dallas, 1851 (Hemiptera: Pentatomidae), nas concentrações de 0,5 a 8,0% e concluíram que o extrato etanólico foi o mais eficiente com mortalidade acima de 80% para todas as concentrações (SOUZA; CORDEIRO; PEREIRA, 2007).

Turchen et al. (2016) avaliaram a toxicidade do extrato de folhas e de sementes de *A. mucosa* sobre o percejo-marrom *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), sendo os resultados do extrato de sementes quando comparado ao extrato de folhas promissores para o controle de ninfas e adultos, em concentrações entre 5,0 e 20 mg mL⁻¹. Em adultos, os extratos de sementes influenciaram na redução da sobrevivência, na fecundidade e fertilidade. Este foi o primeiro estudo sobre toxicidade *A. mucosa* (folhas e semente) sobre *E. heros*.

Krinski; Massaroli (2014) verificaram a ação ninficida dos extratos clorofórmio-metanólico de folhas e sementes de *A. mucosa* e de sementes de *A. crassiflora* sobre

percevejo-do-colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* (Stal) (Hemiptera: Pentatomidae). Resultados mostraram que os extratos de sementes de *A. mucosa* e de *A. crassiflora* apresentaram atividade inseticida sobre ninfas de 2º ínstar de *T. limbativentris* em todas as concentrações, quando comparadas com os controles. O extrato de sementes de *A. mucosa* foi o que apresentou maior toxicidade com mortalidade maior que 75% na concentração de 1,0 % do extrato, nas primeiras 24 h após a aplicação. O extrato de folhas de *A. mucosa* apresentou a menor toxicidade, não ultrapassando 40% de mortalidade. O extrato de sementes de *A. crassiflora* apresentou toxicidade intermediária entre todos os extratos testados, e a mortalidade das ninfas passou dos 80% na maior concentração, após 120 h da aplicação.

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

Álvarez et al. (2008) mostraram que as ACGs anonacina, anonacina-A, e cis-anonacin-10-ona, provocaram a morte de mais de 50% das ninfas de *Oncopeltus fasciatus* Dallas, 1852 (Hemiptera: Lygaeidae) podendo variar as concentração entre 0,1 a 15µg dieta⁻¹. Extrato etanólico de *A. muricata* na concentração de 5 mg mL⁻¹ causou 100% de mortalidade em lagartas de *P. xylostella*, quando expostas por até 12 dias. Nas concentrações mais baixas, também se observou que a viabilidade foi reduzida (TRINDADE et al., 2011). Gomes et al. (2016) constataram bioatividade do extrato microencapsulado (polímero goma arábica a 20%) de sementes *A. muricata*, causou significativa toxicidade aguda (CL₅₀ = 258 mg L⁻¹) e efeitos crônicos, especialmente redução da viabilidade larval e aumento da duração do estágio larval para *P. xylostella*. Em outro estudo Trindade et al. (2018) estimaram as concentrações letais de *A. muricata* de três diferentes solventes extratores (água, hexano e etanol) sobre *P. xylostella*, os valores estimados foram de 0,013 e 0,084%; 0,025 e 0,196%; 2,33 e 35,22%, para as CL₅₀ e CL₉₉ do extrato etanólico, hexânico e aquoso, respectivamente. Os extratos orgânicos afetaram apenas a fase larval e reduziu a viabilidade larval em mais de 60%, mas não afetou a fase pupal das lagartas remanescentes. Além disso, o extrato etanólico na concentração letal se mostrou eficiente afetando negativamente a fase embrionária.

2.4.2 Fitoquímica das anonáceas

As substâncias orgânicas produzidas pelas plantas são renováveis, facilmente degradáveis e não contaminam o meio ambiente, vantagens quando comparado às substâncias organossintéticas. O desenvolvimento da resistência dos insetos a essas substâncias é lento, além de não deixarem resíduos nos alimentos, são seguras aos operadores e de baixo custo, sendo acessível aos pequenos produtores (ROEL; VANDRAMIM, 2006; OLIVEIRA et al., 2007). Estas substâncias biossintetizadas, são chamadas de aleloquímicos ou metabólitos secundários, sendo originadas do metabolismo secundário das plantas (LACHER, 2000).

Os metabólitos secundários diferem dos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, sendo produzido por uma espécie vegetal ou um grupo de espécies, enquanto os primários são encontrados em todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009). A concentração dos metabólitos secundários varia entre os órgãos, tecidos e até mesmo entre células das plantas. A concentração destes metabólitos também pode se alterar ao longo do desenvolvimento da planta e da idade do indivíduo, bem como dependendo da estação do ano. Essa alteração pode ocorrer em poucos dias ou até mesmo poucas horas (LACHER, 2000).

A família Annonaceae se destaca pela diversidade de classes estruturais químicas como: substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, substâncias benzênicas, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteróides, alcalóides, flavonóides, carotenos, saponinas e ACGs, os quais sugere que estes metabólitos secundários possam proporcionar uma vantagem evolutiva (REIS, 2011; LIMA, 2007; LUNA, 2006). A persistente biossíntese desses produtos parece indicar um papel para esses compostos em termos fisiológicos, ecológicos e/ou evolutivos, com funções importantes para a sobrevivência das plantas nesta família (MACHADO, 2005; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014). Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, entre elas, atuam no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos como vírus, bactérias, fungos e insetos (MACHADO, 2005), e vem sendo estudada extensivamente a natureza química e sua aplicação na agricultura (WOO; JEONG; HAVES, 2005).

De acordo com Simões et al., (2000) polifenóis, em especial os flavonóides, são metabólitos de plantas biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e definidos

quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanona (C₆-C₃-C₆) com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001).

Já foram identificados flavonóides no gênero *Annona*. Santos; Salatino (2000) identificaram por CG-MS nas folhas *A. crassiflora* os flavonóides glicosilados: Kaempferol-3-O-galactosídeo, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo e quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo; os glicosídeos de quercetina, isoramnetina, kaempferol e luteolina foram detectados nas folhas de *Annona monticola*, *Annona warmingiana* e *Annona tomentos*. Rinaldi (2007) encontrou flavonas (luteonina) e flavonois (canferol, quercetina, ramnetina, rutina e isoramnetina) nas espécies de *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. dolichorcharpa*. Carollo et al., (2006) isolaram a isoramnetina da espécie de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae)

Foram isolados em espécies de *A. squamosa*, *A. senegalensis*, *A. bullata*, *A. muricata* e *A. reticulata* os biativos como: monoterpenos e diterpenos; monoterpenos; sesquiterpenos; terpenóides, respectivamente (HIRUMA-LINA, 2003; RINALDI, 2007).

Os estudos fitoquímicos das anonáceas se concentram principalmente na classe de compostos extremamente bioativos que são as ACGs (RUPPRETCH; HUI; McLAUGHLIN, 1990; FANG et al., 1993). A primeira ACG isolada foi a uvaricina, descrita por Jolad; Hoffmann; Cole (1982), isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (Oliv.). As ACGs caracterizam-se por uma longa cadeia alifática de 35 a 37 átomos de carbono, conecta-se a um grupo terminal metil substituído anel α , β -insaturado e γ -lactona, que às vezes é rearranjado à cetolactona com um, a três anéis de tetrahydrofurano (THF), e várias porções oxigenadas ao longo da cadeia de carbono. Existem seis tipos principais de ACGs: ACGs lineares que não contém anéis THF, epoxi-ACGs, mono-THF ACGs, ACGs de bis-THF, ACGs tri-THF e atípicos ACGs com um anel de tetrahidropirano (THP). O anel lactona pode ser insaturado, substituído ou reorganizado por uma cetolactona (CAVE et al., 1997). Esses compostos naturais são de particular interesse devido à sua ação antitumoral, citotóxica, antiparasitária, inseticida, antifúngicas e imunossupressoras.

Para extrair os metabólitos secundários com ação inseticida, é necessário considerar a natureza química dos compostos e, principalmente, a composição do solvente utilizado

(CHIRINOS et al., 2007). De acordo com Shaalan et al. (2005), a bioatividade desses fitoquímicos podem variar significativamente dependendo da espécie, bem como do solvente usado na extração. Segundo Alali et al. (1999), embora as ACGs sejam facilmente extraídas pela maioria dos solventes orgânicos, a separação das moléculas depende da sua polaridade.

Segundo Aslan et al. (2006), as frações hexano e clorofórmio apresentam compostos com baixa polaridade e em algumas espécies vegetais a maior concentração de compostos com atividade inseticida encontra-se principalmente nas frações de menor polaridade. Dentre os solventes orgânicos, as ACGs são mais solúveis em clorofórmio e diclorometano (ZENG et al., 1996).

Estudos demonstram os mais diversos solventes na extração das ACGs: água (PÉREZ-PACHECO et al., 2004), etanol (BOBADILLA et al. 2002, BOBADILLA et al., 2005), acetona (KHALEQUZZAMAN; SULTANA 2006), clorofórmio (PARVIN et al., 2003), éter (ALVAREZ et al., 2008), hexano (FONTANA et al., 1998) e metanol (DAS et al., 2007; COSTA et al., 2013;). Esses solventes são utilizados a partir do pressuposto que as ACGs podem variar de muito polar, tal como aqueles extraídos pela água, álcool etílico e metanol a não polares como os extraídos pelo hexano (BOBADILLA et al., 2005; COSTA et al., 2013).

As ACGs são metabólitos secundários únicas para as anonáceas, sendo descritas mais de 450, todas com estruturas homogêneas (BERMEJO et al., 2005), bastante promissoras para o controle de artrópodes (ÁLVAREZ-COLOM et al.; 2010; HOE et al., 2010), porém, estudos atribuem a ação bioinseticida aos terpenos (COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012) e aos alcaloides (KABIR, 2010).

De acordo com Chen et al. (2013) exemplos de ACGs, annosquamosin B, isoladas de *A. squamosa*, bis-THF adjacente, bullatacina e a bis-THF não adjacente. Esquamocina é uma das principais ACGs em *A. squamosa* (BERMEJO et al., 2005) e foi relatado em grandes quantidades nas sementes destas espécies (YANG et al., 2009c; CHAMPY, 2011).

Compostos isolados como as ACGs laherradurina, rolliniastatina-1, rolliniastatina-2, e cherimolin-2 de *A. diversifolia* e *A. lutescens* (SCHLIE-GUZMÁN; GARCÍA-CARRANCÁ; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2009; LUNA-CAZARES; GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2010) são encontrados em diferentes órgãos das plantas, e suas localizações distintas desempenham as

funções que esses tipos de moléculas podem apresentar nas plantas que os produzem (GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014).

A rota metabólica das ACGs difere do caminho da biossíntese dos alcaloides (CAVE et al., 1997; ALALI; LIU; McLAUGHLIN, 1999; BERMEJO, 2005), assim, as ACGs são encontradas em muitas partes da planta, enquanto os alcaloides geralmente não estão presentes nas folhas ou sementes. A ativação genética dessas vias (alcaloide vs. biossíntese ACGs) se dá em órgão específico. Por exemplo, quando *A. lutescens* frutifica, a maioria do alcaloide (liriodenina) é acumulada nas raízes, enquanto as ACGs aherradurina, rolliniastatina-2, e iso-anno-reticulina são acumuladas nas sementes e raízes (ABRAJAN, 2002).

Duas ACGs, esquamostanina-C e esquamostanina-D, do grupo bis-THF não adjacentes, foram isoladas a partir de 95% de extrato etanólico das sementes de *A. squamosa*. Suas estruturas foram determinadas por método espectroscópico e suas citotoxicidades foram avaliadas usando o método MTT, ambos compostos exibiram atividades seletivas significativas antitumorais para quatro linhas de células tumorais humanas (YANG et al., 2009, 2009b). Ndob et al. (2009) isolaram das frações menos polares do extrato bruto hexânico de sementes de *A. squamosa* novas ACGs: dieposabadelin, squamocenina, lepirenina e dotistenin.

Recentemente, um bioinsecticida com base no extrato botânico de *A. squamosa* (Anosom[®]) (AgriLife SOM Phytopharma Ltda., Hyderabad, Estado de Andhra Pradesh, Índia) foi registrado na Índia, fornecendo uma alternativa importante para o controle de pragas em culturas orgânicas em escalas maiores. Contém a ACG anonina como principal ingrediente ativo e é formulado como um concentrado emulsionável a 1% (10 000 ppm) (RIBEIRO et al., 2014)

Estudos sobre o mecanismo de ação mostram que as ACGs são potentes inibidores respiratórios, superiores àqueles inibidores clássicos, como a rotenona e a piericidina A. Essas substâncias agem como inibidoras do complexo I (NADH - ubiquinona oxidoreductase) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, promovendo apoptose (morte celular programada) e levando à redução das taxas respiratórias e cardíaca (DEGLI ESPOSTI et al., 1994; ALALI et al., 1999; GALLARDO et al., 2000; GUADANO et al., 2000).

Ansante et al. (2015) e Souza et al. (2017) utilizaram diferentes técnicas cromatográficas no isolamento da ACG bis-THF rolliniastatina-1, identificado como o composto primário mais ativo das frações de *A. mucosa*. Este isolado causou mortalidade e inibição do crescimento para *S. frugiperda* e *H. armigera* podendo ser um componente útil para o MIP de grande importância.

Linhas de investigação para futuras pesquisas em fitoquímica das anonáceas devem englobar as vias do metabolismo secundário onde as ACGs e alcalóides estão presentes, se estas plantas dedicam recursos fotossintéticos para a biossíntese dos metabólitos secundários, determinação de suas distribuições dentro da planta, período específico do ciclo fenológico para as vias ativas ou induzidas da biossíntese, e se são influenciadas por fatores bióticos ou abióticos específicos (CASTRO-MORENO et al., 2013; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014).

2.5 Formulações de produto fitossanitário

Estão registrados no mercado brasileiro 490 e 91 ingredientes ativos de uso autorizado e banidos, respectivamente, resultando em mais 2.400 formulações de agrotóxicos autorizados nas lavouras brasileiras. Os inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas e formicidas, são regulados e controlados pelo conjunto dos Ministérios da Saúde (MS), da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do Meio Ambiente (MMA) (KUGLER, 2012; ANVISA, 2017).

A legislação brasileira da produção orgânica dá tratamento diferenciado aos insumos destinados à agricultura orgânica. Os agrotóxicos ou afins que tiverem em sua composição apenas produtos permitidos na legislação de orgânicos, recebem, após o devido registro, a denominação de “produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica”. Por serem considerados produtos de baixo impacto ambiental e também de baixa toxicidade a mamíferos e humanos, alta toxicidade a insetos, incluindo muitas vezes os inimigos naturais, a legislação foi idealizada no intuito de acelerar o seu registro sem deixar de lado a preocupação com a saúde, o meio ambiente e a eficiência agrônômica (MAPA, 2016).

A formulação do agrotóxico permite a união do ingrediente ativo com elementos inertes, de modo a obter uma concentração apropriada para manipulação, aplicação e

dispersão do produto, além de melhorar a sua eficácia contra a espécie alvo a ser controlada. Na maioria dos casos, os compostos que constituem os ingredientes inertes são mantidos em sigilo por parte dos fabricantes de agrotóxicos (COX, 1999).

Dentre as formulações encontradas no mercado para o controle de pragas, têm-se o pó molhável, pó solúvel, granulados, soluções concentradas, aerossóis, produtos gasosos, suspensões líquidas, pastas, microencapsulados e os concentrados emulsionáveis (também chamados de emulsão concentrada ou emulsões e dispersões aquosas) (GALLO et al., 2002).

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

De acordo com Cloyd (2004) os inseticidas naturais geralmente têm baixa persistência no meio ambiente após o uso e baixa bioatividade quando armazenados. Portanto, é necessário desenvolver formulações que possam melhorar sua viabilidade e facilitar a sua aplicação pelos agricultores.

Para Garrido (2003) a tecnologia de aplicação de agrotóxicos é o emprego de todos os conhecimentos científicos que proporcionem a correta colocação do produto biologicamente ativo no alvo, em quantidade necessária, de forma econômica, com o mínimo de contaminação de outras áreas.

2.5.1 Emulsão

Emulsão é um sistema termodinamicamente instável resultante da mistura de duas fases imiscíveis entre si, estabilizadas por um agente emulsificante ou surfactante (BREVER, 1985). Para Bajpai; Giri (2002) a emulsão consiste da mistura de dois fluidos não miscíveis, por agitação ou adição de homogeneizadores. A instabilidade é a sua grande energia superficial que é resultante da combinação de tensão na interface, da grande área de superfície da fase dispersa e da diferença de densidade entre os dois líquidos que constituem as fases (SENHORINE, 2010). A adição de surfactante, em sistemas contendo água e óleo pode

reduzir a tensão superficial das duas fases, ativar suas superfícies, e maximizar suas áreas de contato facilitando a formação das emulsões (CASTELLAN, 1972).

De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante as emulsões são formadas basicamente por duas fases: a dispersa e a dispersante. As emulsões, em geral são compostas por três fases: fase aquosa, fase oleosa e a fase emulsificante (SHARMA; SHAD, 1985; MORRISON; ROSS, 2002; McCLMENTS, 2005). O líquido que está disperso em pequenas gotas é conhecido como fase dispersa, interna ou descontínua, enquanto que o segundo líquido é chamado de fase dispersante, externa ou contínua (ZANIN et al., 2001 e 2002; PRISTA et al., 2003; GENNARO, 2004). Uma emulsão óleo em água (O/A) consiste de gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa, enquanto uma emulsão água em óleo (A/O) consiste de gotas de água dispersa em uma fase oleosa.

A utilização do Span[®] 80 é recomendada (PEMULEN, 1999) para aumentar a estabilidade de emulsões, pois, promove diminuição do tamanho do glóbulo por reduzir a tensão na interface O/A (TADROS, 2004). Lima et al. (2008) desenvolveu emulsão estável do tipo O/A viável comercialmente com óleo de babaçu, quando adicionou 0,4% (p/p) de Span[®] 80.

Há vários mecanismos físico-químicos que causam instabilidade, incluindo *creaming*, sedimentação, floculação, coalescência, maturação de Ostwald e inversão de fases. Para melhorar esta estabilidade diversos estudos vêm sendo realizados em relação à adição de estabilizantes (BENICHOU; ASERIN; GARTI, 2007; SCHIMIDTS et al., 2009; IQBAL et al., 2013).

Para emulsões do tipo O/A existem diversos mecanismos de desestabilização. Os principais são a cremeação, a sedimentação, a floculação e a coalescência, sendo que os dois primeiros são fenômenos de migração das gotas, e os últimos são processos de variação do tamanho da gota (McCLEMENTS, 2005). A cremeação ocorre quando a fase dispersa é menos densa que a fase contínua, porém não existe coalescência. Na sedimentação as gotas são mais densas que a fase contínua. A floculação é um processo no qual as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais (HILL, 1996).

Torna-se mais relevante considerar os diversos fatores que podem alterar a reologia de uma emulsão: problemas referentes à fase dispersa (interação entre as substâncias, floculação,

tamanho e distribuição das partículas, viscosidade, composição e estrutura do polímero); influência da fase contínua (composição, polaridade, pH, concentração de eletrólitos); fatores referentes a membrana interfacial (composição química, potencial de energia da interação das partículas, concentração e solubilidade dos polímeros e estrutura da camada interfacial), além das condições de preparo da formulação (TADROS, 1999; 2004; CALLEGOS; FRANCO, 1999; OPREA; DODITA, 2001).

Buscar a uniformidade da emulsão consiste em dizer que as gotículas do líquido disperso no outro apresentam diâmetros iguais, em sua grande maioria. Quanto menor o tamanho das gotas dispersas e maiores a densidade e a viscosidade da fase contínua, maior e melhor será a estabilidade cinética da emulsão (SAMAVATI et al., 2011).

Na formulação concentrado emulsionado o ingrediente ativo é primeiramente dissolvido em um solvente apropriado e são adicionados adjuvantes. O resultado da diluição do concentrado emulsionável na água é uma mistura homogênea onde glóbulos líquidos da formulação ficam dispersos na fase aquosa (emulsão), constituindo uma calda de aspecto leitoso. A estabilidade da emulsão é muito melhor que a da suspensão e, portanto, a necessidade de agitação não é tão crítica. Não possuindo partículas sólidas, a calda não provoca desgaste nem obstrução das passagens estreitas do pulverizador (SENHORINE, 2010).

Para confeccionar emulsões estáveis é necessário adicionar excipientes conhecidos como agentes emulsificadores ou tensoativos. Uma emulsão estável é definida como um sistema que consegue manter, de maneira homogênea, suas gotículas ou glóbulos na fase contínua. O tensoativo, neste caso, é responsável por manter um filme entre as fases (entre as gotículas e a fase externa), exercendo assim uma barreira física que impede a coalescência que pode ser definida como a junção, a união de duas ou mais gotículas. Caso este filme possua cargas, é considerado que o agente emulsificador exerce, portanto, uma barreira química (SENHORINE, 2010).

O extrato da semente de *A. squamosa* apresenta potencialidade inseticida, em pragas agrícolas, mas a sua composição geralmente é muito oleosa, dificultando a sua aplicação no campo, surgindo, desta forma o interesse pelas emulsões.

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

REFERÊNCIAS

- ABRAJÁN, H.P. Acetogeninas y compuestos de *Annona lutescens* Safford. 2002. 75 f. Tesis, Instituto Tecnológico de Tuxtla. Gutiérrez. 2002.
- AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação geral de agrotóxicos e afins/DFIA/DAS. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 9 jun. 2017.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, n.3, p.504-540, 1999.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset.publisher/ZK4q6VQCJ9Pn/content/consult-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201?inhexitRedirect=false>. Acesso em 11 de julho de 2017.
- ANSANTE, T.F. et al. Secondary metabolites from neotropical Annonaceae: Screening, bioquidated fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v.74, p.969-975, 2015.
- ÁLVAREZ, O. et al. Toxic effects annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal Pesticide Science**, v.81, p.85-89, 2008.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Insecticidal, mutagenic and genotoxic evaluation of annonaceous acetogenins. **Natural Product Communications**, v. 5, n.3, p.391-394, 2010.
- ASLAN, I. et al. Toxicity of acetone extract of *Sideritis trojana* and 7-epicandicandiol, 7-epicandicandiol diacetate and 18-acetylsideroxol against stored pests *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Sitophilus granarius* (L.) and *Ephestia kuehniella* (Zell.). **Industrial Crops and Products**, v.23, n.2, p.171-176, 2006.
- BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. **Reactive and Functional Polymer**, v.53, p.125-141, 2002
- BARROS, R. et al. Controle químico da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.22, n.3, p.463-469, 1993.
- BAKER. P. B; SHELTON, A. M; ANDALORO, J. T. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) in cabbage with pheromones. **Journal Economic Entomology**, v.75, n.6, p.1025-1028, 1982.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.294, n.1-3, p.20-32, 2007.

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

BOIÇA JÚNIOR et al. Efeito de cultivares de repolho e doses de extrato aquoso de nim na alimentação e biologia de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). **Bioscience Journal**, v.29, n.1, p.22-31, 2013.

BOIÇA JÚNIOR, A. L., CHAGAS FILHO, N. R. Não-preferência para alimentação de traças-crucíferas por genótipos de couve-flor. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.373-379, 2009.

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

BODNARYK, R.P. Will low glucosinolate cultivars of the mustards *Brassica juncea* and *Sinapis alba* be vulnerable to insect pests?. **Canadian Journal of Plant Science**, v.77, p.283-287, 1997.

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

BOBADILLA, A. M. et al. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Revista Peruana de Biología**, v.12, n.1, p. 145-152, 2005.

BOBADILLA, A. M. et al. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller (chirimoya) y *A. muricata* Linnaeus (guanábana) sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. **Revista Peruana de Biología**, v.9, n. 2, p. 64-73, 2002.

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

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, Z., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.90, p.157-177, 2001.

BREVE, M.M. Cosmetics emulsions. In: BECHER, P. (ed.) Encyclopedia of emulsions technology, New York, Marcel Dekker, v.2, p.385-424, 1985.

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

CALLEGOS, C.; FRANCO, J.M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. **Colloid Interface Science**, v.4, n.4, p.228-293, 1999.

CAROLLO, C. A.; HELLMANN-CAROLLO, A.R.; DE SIQUEIRA, J.M.;

CARDOSO, M. O.; PAMPLONA, A. M. S. R.; MICHEREFF, F. M. Recomendações técnicas para o controle de lepidópteros praga em couve e repolho no Amazonas. Circular Técnica 35. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 15p., 2010.

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

CASTRO-MELO, R.A.; MADEIRA, N.R.; LIMA, C.E.P. Produção de brássicas em sistema plantio direto. **Circular Técnica 151**, 16p., 2016

CASTRO-MORENO, M. et al. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *annonalutescens* (Annonaceae). **Journal of Plant Research**, v.124, n.4, p.529-537, 2013.

CASTELO BRANCO, M.; MADEIRA, N. R. Avaliação de genótipos de repolho para a resistência à traça das crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 19-24, 1994.

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

CASTELO BRANCO, M. Associação de armadilhas de feromônio e número de machos coletados para redução do uso de inseticidas no controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, v.17, n.3, p.280, 1999.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A.G. Inseticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p.75-79, 1997.

CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A.L. Controle da traça das crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, v.10, n.1, p.24-25, 1990.

CASTELLAN, G.W. Físico-química. Ao livro técnico, Rj. 2ª ed., v.1, 461p., 1972.

CAVÉ, A. et al. Acetogenins from Annonaceae. Progress in the chemistry of organic natural products, v.70, p.81-288, 1997.

- COVARRUBIAS, D.A.V. et al. Effects of five species of *Chenopodiaceae* on the development and reproductive potential of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). v.98, n.1, p.80-85, 2015.
- COSTA, M.S. et al. Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. **Pest Management Science**, v.73, p.636-640, 2017.
- COSTA, M.S. et al. Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v.11, n.8, p.1-13, 2016.
- COSTA, M.S. et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, p.184-190, 2013.
- COSTA, E.V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v.16, p.9714-9720, 2011.
- COSTA, J.P.C.; MULLER, C.H. Fruticultura tropical: o biribazeiro *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. Belém: Embrapa-CPATU, **Documento 84**, 35p., 1995.
- COLE, R.A. The relative importance of glucosinolates and aminoacids to the development of two aphid pest *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on wild cultivated brassica species. **Entomologia Experimentales et Applicata**, v.85, p.121-133, 1997.
- COSTA, M.S. et al. Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. **Pest Management Science**, v.73, p.636-640, 2017.
- COSTA, M.S. et al. Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v.11, n.8, p.1-13, 2016.
- COSTA, M.S. et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira Biociências**, v.11, n.2, p.184-190, 2013.
- COX, C. "INERT INGREDIENTS IN PESTICIDES: WHO'S KEEPING SECRETS?" **Journal of Pesticide Reform**, v.19, n.3, 1999.
- CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V (Ed.). Flowering plants of the neotropics. New York: Princeton University Press, p.18- 2004.
- CHAMPY, P. Acetogenins from the seeds of the custard apple (*Annona squamosa* L.) and their health outcomes. In V.R. Preedy; R.R. Watson & V.B. Patel (Eds). Nuts and seeds in health and disease prevention. **Elsevier**, p.429-437, 2011.

CHEN, Y. et al. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**, v.58, p.394-400, 2013.

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

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

CHIRINOS, R. et al. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v.55, n.2, p. 217–225, 2007.

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

CREMA, A.; CASTELO BRANCO, M. Impacto da temperatura e fotoperíodo no desenvolvimento ovariano e oviposição de traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.305-308, 2004.

DAS, N.G.; GOSWAMI, D.; RABHA, B. Preliminary evolution of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts. **Journal of Vector Borne Disease**, v.44, n.2, p.145, 2007.

DEGLI ESPOSTI, M. et al. Natural substances (acetogenins) from the Family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). **Biochemical Journal**, v.301, p.161-167, 1994.

DICKSON, M.H. et al. Selection for resistance to diamond back moth (*Plutella xylostella*) in cabbage. **Hortscience**. v.25, n.12, p.1643-1646, 1990.

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

DONADIO, L.C.; DURIGAN, J.F. Biribá. In: Fruits of tropical and subtropical origin. Flórida, p.127-130, 1992.

FARIA, C.A. et al. Parasitismo de *Tuta absoluta* por *Trichogramma pretiosum* Riley em resposta a densidade do hospedeiro e estruturas da planta. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1504-1509, 2008.

FARIA, C.A. et al. Resposta funcional de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasitando ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:

Gelechiidae): Efeito da idade do hospedeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.1, p.85-93, 2000.

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

FERREIRA, S.W.J.; BARROS, R.; TORRES, J.B. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae), para regiões produtoras de crucíferas em Pernambuco. **Neotropical Entomology**, v.32, n.3, p.407-411, 2003.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliça. 3.ed., Viçosa:UFV, 421p., 2008.

FONSÊCA, S.G.C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**. 2005. Disponível em: http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/Farmacot_Fitoterapicos.PDF. Acesso em: 11 de julho 2017.

FONTANA, J. D et al. Selective Polarity- and adsorption- guided extraction/purification of Annona sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, n.19, p. 67-76, 1998.

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

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

GALLARDO, T. et al. Semisynthesis of antitumoral acetogenins: SAR of functionalized alkyl-chain bis-tetrahydrofuranic acetogenins, specific inhibitors of mitochondrial complex I. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, n.25, p.4793-4800, 2000.

GARRIDO, L.R. Sistema de produção 3. disponível em <http://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/pessegop;pessegodemeresaregiaosrrag aucha;defensi.html>. Acesso em 11 de julho de 2017.

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

GEORGHIOU, G.P.; LAGUNES-TEJADA, A. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. AGPP/MISC/ p.91-1.318, 1991.

- GODONOU, I. et al. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplae* isolats from benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Crop Protection**, v.28, p.220-224, 2009.
- GOMES, I. B. et al. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. **Ciência Rural**, v.46, n.5, p.771-775, 2016.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R. et al. Alkaloids and acetogenins in annonaceae development: Biological considerations. Palestra anonáceas – V Congresso Internacional e Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação – 2013. v.36, edição especial, p.001-016, 2014.
- GUADAÑO, A. et al. Inseticidal and mutagenic evaluation of two anonaceous acetogenins. **Journal Natural Produce**, v.63, p.773-776, 2000.
- HALKIER, B.A.; GERSHENZON, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annuary Revious Plants Biology**, v.57, p.303-333, 2006.
- HARCOURT, D. G. Biology of the diamondback moth, *Plutella maculipensis* (Curt) (Lepidoptera: Plutellidae), in eastern ontario. II. Life history, behavior, and host relationships. **Canadian Entomologist**, v.89, p.554-564, 1957.
- HERNANDEZ, C. R.; VENDRAMIN, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae em Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, San José, v. 42, p. 14- 22, 1996.
- HERNÁNDEZ, C.R.; VENDRAMIM, J.D. Avaliação da bioatividade de extratos aquoso de meliaceae sobre Spodoptera frugiperda. **Revista de Agricultura, Piracicaba**, v.72, n.3, p.305-317, 1997.
- HE, K. et al. Comparative structure-activity relation ship evolutions of anonaceous acetogenins for pesticidal activity. **Pesticide Science**, v.49, p.372-378, 1997.
- HILL, S.E. Emulsions. In G.M. Hall, Methods of testing protein functionality, New York: Blackie, 1996.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; DI STASI, L. C. Magnoliales medicinais. In: GUIMARÃES, M.E.; SANTOS, M. N.; DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: UNESP, p. 89-109, 2003.
- HOE, P. K. et al. Biological activity of *Annona muricata* seed extracts. **Malaysian Journal of Science**, v.29, n.2, p.153-159, 2010.
- IRAC-APRD – Arthropod Pesticide Resistance Database, www.pesticideresistance.org, acesso em 30 de outubro de 2017.

IRAC – Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas, www.irac-br.org, acesso em 12 de dezembro de 2016.

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

IQBAL, S. et al. Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. **Food Research International**, v.54, p.1613-1620, 2013.

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

JOHNSTON, J.S. et al. Evolution of genome size in Brassicaceae. **Annals of Botany**, v.95, p.229-235, 2005.

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

JUSTUS, K.A.; MITCHELL, B.K. Oviposition site selection by the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Insect Behavior**, v.9, p.887-897, 1996.

KALYAN, B.A. et al. Integrated management strategy for painted bug, *Bagrada lilaris* (Burn.) inflicting injury at seedling stage of mustard (*Brassica juncea*) in arid western rajasthan. **Pesticide Research Journal**, v.20, n.1, p.48-51, 2008.

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

KOOLYOTTIL, R. et al. A comparative analysis of entomoparasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Open Journal of Animal Sciences**, v.3, n.4, p.326-333, 2013.

KOCH, M.; HAUBOLD, B.; MITCHELL-OLDS, T. Molecular systematics of the Brassicaceae: Evidence from coding plastidic natk and nuclear sequences. **American Journal of Botany**, v.88, p.534-544, 2001.

KUGLER, H. Paraíso dos agrotóxicos. **Revista Ciência Hoje**, v.50, n.296, p.20-25, 2012.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tribbraca limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae. v.36, edição especial, p.217-224, 2014.

- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p.225-242, 2014.
- KHALEQUZZAMAN, M.; SULTANA, S. Insecticidal activity of *Annona squamosa* L. seed extracts against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of BioScience**, v.14, n.1, p.107-112, 2006.
- LACHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RIMA, 519p., 2000.
- LEITE, L.G. et al. Screening of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditidae) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.785-790, 2005.
- LEATEMIA, J.; ISMAN, M. Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. **International Journal of Pest Management**, London, v. 50, p.129-133, 2004.
- LEMOS, E.E.P. A produção de anonáceas no Brasil. Palestra Anonáceas - V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Edição especial, v.36, p.77-085, 2014.
- LEMOS, E.E.P. Panorama de lãs anonas cultivadas em Brasil: saramuyo, guanábana y atemoya. In: **Anonáceas: plantas antigas, estudos recientes**. Gonzales-Esquinca, A.R. et al. Colección Jaguar, p.21-34, 2011.
- LIMA, J.F.M. et al. Action of natural insecticide in control of *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Spodoptera: Noctuidae) in corn crop cultivated in low agroecosystem. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.607-613, 2008.
- LIMA, M. P. L.; BARROS, R. Toxicidade de lufenuron para lagartas de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Ômega**, v.9, n.1, p.52-54, 2000.
- LIU, Y-B.; TABASHNIK, B.E. Visual determination of sex of diamondback moth larvae. **The Canadian Entomologist**, v.129, p.585-586, 1997.
- LIMA, M. D. Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência. Alagoas, 2007. 102p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, 2007.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, v.2, Nova Odessa, São Paulo, 2002.

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

LUNA-CAZARES, L.M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R. Susceptibility of bacteria and complete spheroplasts of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhitoides* to rolliniastatin – 2. **Natural Product Research**, v.24, n.12, p.1139-1145, 2010.

MAKUNDI, R.H.; SARIAH, J.E. A functional response of braconid parasitoids of the bean stem maggot, *Ophiomyia spencerella* (Diptera: Agromyzidae), in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tanzania. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.112, p.478-484, 2005.

MAZZONETTO, F.; CORBANI, R. Z.; DALRI, A.B. Biofumigation of plant species on *Sitophilus zeamais* in stored maize. **Applied Research & Agrotecnology**, v.6, n.1, p.53-61, 2013.

MACHADO, H. Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “*in vivo*”. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

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

MEDEIROS, P.T. et al. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

MEDEIROS, P.T. et al. Susceptibilidade da traça-das-crucíferas a produtos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* na cultura do repolho no Distrito Federal. **Comunicado Técnico 109**, 11p., 2004.

MEDEIROS, P. T. et al. Instalação e manutenção de criação massal da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). **Circular Técnica**, Brasília: Embrapa Hortaliças, 4p., 2004b.

MICHEREFF, M .F. F. et al. Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.1919-1926, 2000.

MONNERAT, R. G. et al. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas químicos sobre a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) e seus parasitóides. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.4, p.723-730, 2000.

MONNERAT, R.S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, p.163-200, 2000.

MORATÓ, M. G. Plagas y enfermedad en el cultivo de coliflor. Descripción e control. **Vida Rural**, v.8, n.107, p.1-5, 2000.

MOSCA, J.L.; CAVALCANTE, C.E.B.; DANTAS, T.M. Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação. Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical, **Documentos 106**, 2006.

MORRISON, I.D.; ROSS, S. Emulsions. Colloidal dispersions – suspensions, emulsions and foams. New York: John Wiley & Sons Ltd. (Ed.), p.420-455, 2002.

McCLEMENTS, D.J. Food emulsions: Principles, practice and techniques. Washington: CRC Press, 2005.

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

McHUGH, J.J.J.; FOSTER, R.E. Reduction of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) infestation in head cabbage by overhead irrigation. **Journal of Economic Entomology**, v.88, n.1, p.162-168, 1995.

NDOB, I.B.B. et al. Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v.2, p.72-76, 2009.

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

OLIVEIRA, M.S.S. et al. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.326-331, 2007.

OLIVEIRA, A.T.; JUNQUEIRA, A.M.R.; FRANÇA, F.H. Impacto da irrigação por aspersão convencional na dinâmica populacional da traça-das-crucíferas em plantas de repolho. **Horticultura Brasileira**, v.18, n.1, p.37-40, 2000.

OPRREA, S.; DODITA, T. Influence of agitation during emulsion polymerization of acrylic-styrene latexes on end product properties. **Progress in Organic Coatings**, v.42, n.3, p.194-201, 2001.

OWVAMA, C.I. Entomopathogenic symbiotic bactéria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.505-515, 2001.

OOI, P.A.C.; KALDERMAN, W. The biology of three common pests of cabbages in Cameron highlands, Malaysia. **Malaysian Agricultural Journal**, v.52, n.1, p.85-101, 1979.

PARVIN, S. et al. Pesticidal activity of Pure Compound Annotemoyin-1 Isolated from chloroform extract of the plant *Annona squamosa* Linn. against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Biological Sciences**, v.6, n.12, p.1088-1091, 2003.

PÉREZ-PACHECO, R. et al. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Acta Zoológica Mexicana**, v.20, n.1, p.141-152, 2004.

PEMULEN, Introducing pemulen polymeric emulsifiers. Technical Literature. September, Cleveland, 1999.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.6, p.813-816, 2003.

POTTER, C. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. **Annals Applied Biology**, v. 38, n.1, p.1-12, 1952.

PRATISSOLI, D. et al. Selection of *Trichogramma* species for controlling the Diamond back moth. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.259-261, 2008.

PRISTA, L. N. et al. **Tecnologia Farmacêutica**. 6 ed., v.1, p.597-669, 2003.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien : Serie B: für Botanik und Zoologie, **Ann Arbor**, v. 108, p. 191-205, 2007.

RAZEK, A.S.A.; GOWEN, S. The integrated effect to the nematode bacteria complex and nem plant extracts against *Plutella xylostella* (L.) larvae (Lepidoptera: Yponomeutidae) on chinese cabbage. **Archive Phytopathology**, v.35, n.2, p.181-188, 2002.

REICHELT, M. et al. Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v.59, n.6, p.663-671, 2002.

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

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

RIDLAND, P.M.; ENDERSBY, N.M. Some australian populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) show reduced susceptibility to fipronil. The Sixth International Workshop on Management of the Diamondback Moth and Other Crucifer Insect Pests. p.21-25, 2011.

RIBEIRO, L.P. et al. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas**, v.15, n.4, p.215-232, 2016.

RIBEIRO, L.P. et al. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian annona species and na acetogenin – based comercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v.62, p.100-106, 2014.

RIBEIRO, L.P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.55, p.6-14, 2013.

RIBEIRO, L.P. et al. Compatibility of *Beauveria bassiana* comercial isolate with botanical insecticides utilized in organic crops in Southern Brazil. **Biological Agriculture Horticulture**, v.28, p.223-240, 2012.

RODRÍGUEZ, H.C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidad de extracts acuosos de meliáceas em larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797). **Avances en la Investigacion**, v.1, p.61-63, 1995.

RONDELLI, V.M. et al. Insecticide activity of *Beauveria bassiana* and castor bean oil against *Plutella xylostella* under greenhouse. **Bioscience Journal**, v.29, n.5, p.1187-1193, 2013.

RONDELLI, V.M. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* potenciais para o controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.3, p.391-396, 2012.

RONDELLI, V.M. et al. Associação do óleo de mamona com *Beauveria bassiana* no controle da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.2, p.212-214, 2011.

ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D. Efeito residual do extrato acetate de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1049-1054, 2006.

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

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

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SARFRAZ, M.; DOSDALL, L.M.; KEDDIE, B.A. Diamondback moth host plant interactions: Implications for pest management. **Crop Protection**, v.25, p.625-639, 2006.

SAMAVATI, V. et al. Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate. **Journal of Texture Studies**, 2011.

SANTOS, V.C. et al. Insecticide resistance in populations of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the State of Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, v.40, n.2, p.264-270, 2011.

SAITO, M.L. et al. Verificação da atividade inseticida de alguns vegetais brasileiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.52, n.1/2, p.53-59, 1989.

SAMPAIO, M.V.; BUENO, V.H.P.; PÉREZ-MALUF, R. Parasitismo de *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae) em diferentes densidades de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.81-87, 2001.

SEIF, A.A.; NYAMBO, B. Manual de manejo integrado de pragas das brássicas na África Oriental. The International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE), Nairobi-Kenya, 88p. 2013.

SEFFRIN, R.C. et al. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, v.29, n.1, p.20-24, 2010.

SENHORINI, G.A. Micropartículas poliméricas de PHBV e emulsões contendo extrato vegetal de *Carapa guianensis*: Desenvolvimento, caracterização e aplicação. 2010, 105p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. Acesso em 17 de agosto de 2017, www.sindiveg.org.br/docs/genericos%20e%20especialidades.pdf, 2017.

SILVA, E.J. et al. Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection**, v.35, p.97-101. 2012

SILVA-TORRES, C.S.A. et al. Parasitismo de traça-das-crucíferas por *Oomyzus sokolowskii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.7, p.638-645, 2010.

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

SIMÕES, C.; SCHENKEL, E.; GOSMANN, G.; MELLO, J.; MENTZ, L.; PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª ed. ver. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Universidade/UFSC, 2000.

SOUZA, C.M. et al. Lethal and growth inhibitory activities of neotropical Annonaceae – derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal Pesticide Science**, v.90, p.701-709, 2017.

SOUZA, E.M.; CORDEIRO, J.R.; PEREIRA, M.J.B. Avaliação da atividade inseticida dos diferentes extratos das sementes de *Annona coriácea* sobre *Dichelops melanthus* (Dallas, 1851). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1150-1153, 2007.

SCHLIE-GUZMÁN, M.A.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. ; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R. In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. **Phytotherapy Research**, v.23, n.8, p.1128-1133, 2009.

SCHMIDTS, T. et al. Influence of hydrophilic surfactantes on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.338, n.1, p.184-192, 2009.

SHAALAN, E. A. S. et al. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v.31, p.1149-1166, 2005.

SHARMA, M.K.; SHAH, D. Introduction to macro and microemulsions. In: SHAH, D.O. (ed.). *Macro and microemulsions theory and applications*. Washington, American Chemical Society. Chap.1, 1985.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advance Colloid Interface Science**, v.108, p.109-227, 2004.

TADROS, T.F. Fundamental principles of emulsion rheology and their application. **Colloids and Surface a Physicochem and Engineering Aspects Journal**, v.91, p.39-55, 1999.

TAÍZ, L. ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p., 2009.

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

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

- TORRES, A. L. Efeito de cultivares de repolho e extratos aquosos vegetais na biologia de *Plutella xylostella* (L.) e no parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov). 2004. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração em Entomologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- THOMAS, G. M.; G. O. POINAR, Jr. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entornopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.29, p.352-360, 1979.
- TURCHEN, L.M. et al. Potencial phytoinsecticide of *Annona mucosa* (Jacq.) (Annonaceae) in the control of brown stink bug. **Bioscience Journal**, v.32, n.3, p.581-587, 2016.
- THULER, R.T.; BORTOLI, S.A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Classificação de cultivares de brássicas com relação à resistência à traça-das-crucíferas e a presença de glucosinolatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.4, p.467-474, 2007.
- THULER, R. T.; BORTOLI, S.A.; BARBOSA, J.C. Eficácia de inseticidas químicos e produtos vegetais visando ao controle de *Plutella xylostella*. **Científica**, v.35, n.2, p.166-174, 2007.
- TRINDADE, R.C.P. et al. Toxicity of soursop extracts to diamondback moth. **Bioscience Journal**, v.34, n.1, p.104-111, 2018.
- TRINDADE, R.C.P. et al. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.37, n.2, p.223-227, 2011.
- ULMER, B.C. et al. Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), feeding and oviposition preferences on glossy and waxy *Brassica rapa* (L.) lines. **Crop Protection**, v.21, n.4, p.327-331, 2002.
- VENDRAMIM, T. C. BOIÇA JUNIOR, A. L.; GHAGAS FILHO, N. R. Aspectos biológicos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em nove genótipos de repolho (*Brassica oleracea* VAR capitata). **Revista de Agricultura**, v.85, p.117-126, 2010.
- VENDRAMIM, J.D.; SCAMPINI, P.J. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, v.72, n.2, p.159-170, 1997.
- VILLAS BÔAS, G.L. et al. Inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas e impactos sobre a população natural de parasitóides. **Horticulture Brasileira**, v.22, n.4, p.696-699, 2004.
- VOSS, M.V. et al. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematóides entomopatógenos. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 44p., 2009.

- WANG, X.; WU, Y. High levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.3, p.1019-1023, 2012.
- WATERHOUSE, D.F. *Plutella xylostella* (Linneus) (Lepidoptera: Yponomeutidae) diamondback cabbage moth. In: WATERHOUSE, D.F.; NORRIS, K.R. (Ed). **Biological Control**, v.22, p.177-191, 1987.
- WOO, H.; JEONG, R.B.; HAWES, C.M. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. **Review Biotechnology Letters**. v.27, p.365-374, 2005.
- YANG, H. et al. New nonadjacent bis-THF ring acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v.80, p.177-181, 2009.
- YANG, H. et al. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.2199-2202, 2009b.
- YANG, H. et al. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in annona genus plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.140-144, 2009c.
- ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, M.A.C.M.; LIMA, E.R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v.32, n.3, p.722-731, 2009.
- ZANIN, S. M. W. et al. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v.3, n.1. p.13-18, 2002.
- ZANIN, S. M. W. et al. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Visão Acadêmica**, v.2, n.2. p.47-58. 2001.
- ZENG, L. et al. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. **Natural Product Reports**, v.13, n.2, p.275-306, 1996.
- ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA J.R.P.; ZUCCHI R.A. (Ed.) *Trichogramma e o controle aplicado*. Piracicaba: FEALQ, p.41-66, 1997.

3 FORMULADO EMULSIONÁVEL, TOXICIDADE E ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Annona Squamosa* L. (Annonaceae), NO CONTROLE DE *Plutella Xylostella* (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

RESUMO

Os inseticidas botânicos podem apresentar uma menor persistência após a aplicação e, menor tempo de conservação, assim, o desenvolvimento tecnológico de formulado fitossanitário pode permitir a união do ingrediente ativo com elementos inertes, de modo a obter eficácia ao controle do inseto-praga. Várias espécies da família Annonaceae apresenta comprovada ação bioinseticida, assim, buscou-se investigar o potencial inseticida da *Annona squamosa* como tática de controle alternativo para o manejo integrado da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). O objetivo do presente trabalho foi desenvolver formulações fitossanitárias a partir de uma formulação emulsionável estável do extrato hexânico de sementes de *A. squamosa* L. (Annonaceae), avaliar as suas características organolépticas, analisar a estabilidade a longo e curto prazo, estimar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₉) e avaliar a atividade inseticida na capacidade de oviposição, nos estádios larvais, avaliar persistência do extrato e do formulado emulsionável em semicampo e realizar a prospecção dos constituintes químicos. A estimativa da CL₅₀ e CL₉₉ foi determinada através da fórmula de Bliss (1934) realizada por análise Probit. Para *A. squamosa* das cinco amostras testadas da emulsão do extrato hexânico de *A. squamosa* (EHAS) apenas a emulsão 5 mostrou estabilidade e apropriada ao longo dos testes de curta e longa duração para ser utilizada como produto inseticida; a CL₅₀ e CL₉₉ estimadas da EHAS foram de 2,76 e 21,52 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, apresentando toxicidade a *P. xylostella*; a CL₉₉ da EHAS apresenta efeito ovicida e repelente para oviposição; a CL₅₀ e CL₉₉ da EHAS apresentam eficiência no estágio larval do 1º instar, porém, diminuem a toxicidade nos demais instares; a persistência da toxicidade do EHAS em condição de semicampo com folha destacada é de até 18 e 16 dias para CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente, ao passo, em condição de semicampo na planta inteira é de 16 dias para CL₅₀ e CL₉₉; as partições da FACT e FH foram tóxicas a *P. xylostella*; através das análises por CLAE-DAD se evidencia a presença de acetogeninas, dentre-as a esquamocina na EHAS, constatado por meio da concentração da área (%) e do comprimento de onda (λ). Assim sendo, o concentrado emulsionável das sementes de *A. squamosa* apresentam ação bioinseticida para o controle de *P. xylostella*.

Palavras-chave: Pinha. Traça-das-crucíferas. Formulação fitossanitária. Extrato botânico. Estudo fitoquímico.

ABSTRACT

Botanic insecticides may present a lower persistence after application and, therefore, a shorter shelf life, thus the technological development of phytosanitary formulations may allow the attachment of the active ingredient with inert elements, in order to obtain efficacy to control the insect-plague. Several species of the Annonaceae family have proven bioinsecticidal action, thus investigating the insecticidal potential of *Annona squamosa* as an alternative control tactic for the integrated management of the diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). The objective of the research was to develop phytosanitary formulations from a stable emulsifiable formulation of the hexane seed extract of *A. squamosa* L. (Annonaceae), to evaluate its organoleptic characteristics, to analyze long and short term stability, to estimate lethal concentrations LC₅₀ and LC₉₉) and to evaluate the insecticidal activity in the oviposition capacity in the larval stages, to evaluate the persistence of the extract and the emulsifiable formulations in semi-field and to carry out the prospection of the chemical constituents. The estimation of LC₅₀ and LC₉₉ was determined using the Bliss formula (1934) performed by Probit analysis. For *A. squamosa* of the five samples tested of the emulsion of the hexanic extract of *A. squamosa* (EHAS) only emulsion 5 showed stability and appropriated along the short and long duration tests to be used as an insecticidal product; the estimated LC₅₀ and LC₉₉ of EHAS were 2.76 and 21.52 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, showing toxicity to *P. xylostella*; the LC₉₉ of the EHAS presents ovicidal and repellent effect for oviposition; the LC₅₀ and LC₉₉ of the EHAS show efficiency in the 1st instar larval stage, however, they decrease the toxicity in the other instars; the persistence of EHAS toxicity in semi-field leaf spot condition is up to 18 and 16 days for CL₅₀ and CL₉₉, respectively, while semi-field in whole plant condition is 16 days for CL₅₀ and CL₉₉; the FACT and FH partitions were toxic to *P. xylostella*; through the analyzes by CLAE-DAD, the possibility of acetogenins, among them the squamocin in EHAS, is evidenced by the concentration of the area (%) and the wavelength (λ). Therefore, the emulsifiable concentrate of the seeds of *A. squamosa* present biopesticide action for the control of *P. xylostella*.

Keywords: Sweet sop. Diamondback. Phytosanitary formulation. Botanical extract. Phytochemical study.

3.1 Introdução

Os inseticidas botânicos podem apresentar uma menor persistência após a aplicação e menor tempo de conservação. Assim, o desenvolvimento tecnológico de formulados fitossanitários podem permitir a união do ingrediente ativo com elementos inertes, de modo a obter eficácia ao controle do inseto-praga, apropriada para manipulação, aplicação, dispersão, solubilidade, estabilidade e persistência do produto, além do menor custo econômico, minimização do impacto social e contaminação dos recursos ambientais. A falta de formulação e padronização é grande entrave para o uso e comércio desses produtos.

No contexto atual do Manejo Integrado de Pragas (MIP) os extratos vegetais vêm sendo aplicados de diferentes formas. Dentre elas, a formulação, à base aquosa, é a mais utilizada nos sistemas de produção orgânica, de fácil preparo, baixo custo, porém podem apresentar baixa eficiência na extração dos compostos bioativos. Outrora bases de solventes polares ou apolares químicos, são testados na pesquisa agropecuária para área da proteção de plantas.

A emulsão é um tipo de formulação que consiste na mistura entre dois líquidos imiscíveis, utilizando métodos como agitação e adição de homogeneizadores (BAJPAI; GIRI, 2002).

As Annonaceae compreendem um grande número de gêneros e espécies, com cerca de 140 e 2.500, respectivamente (CHATROU et al., 2004; BRAGA SOBRINHO, 2010), sendo a maioria nativa das regiões tropicais e subtropicais. Entre as espécies, destacam-se as *Annona squamosa* e *A. mucosa* L., com potencial inseticida (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009; KRINSKI et al., 2014).

A pinheira, *A. squamosa* é possivelmente originária das terras baixas da América Central, mais precisamente da Ilha de Trinidad, nas Antilhas, sendo levada inicialmente para o México e depois introduzida no Oriente, nas Filipinas e na Austrália. Esta fruteira tem grande importância na Índia, pelas populações espontâneas em número e abundância, acreditou-se a princípio que seria nativa daquele país (MOSCA; CAVALCANTE; DANTAS, 2006). No Brasil, a *A. squamosa* tem sido cultivada em quase todo o país, mas é na região

nordeste que o seu cultivo tem se disseminado mais intensamente, apresentando mais de 90% de toda área cultivada do país (LEMOS, 2014).

Os metabólicos secundários apresentam uma distribuição restrita, sendo produzidos por uma espécie vegetal ou um grupo de espécies (TAIZ; ZEIGER, 2009), podendo variar entre os órgãos, tecidos e até mesmo entre as células das plantas (LACHER, 2000). Os estudos fitoquímicos das anonáceas se concentram mais nas acetogeninas (ACGs) que são compostos extremamente bioativos, únicos desta família, descritas mais de 450, todas com estruturas diversificadas, atuam como inibidor do transporte de elétrons mitocondriais e afetam a ação da NADH-ubiquinona oxidoreductase (ÁLVAREZ et al., 2007). A esquamocina das principais ACGs na espécie *A. squamosa* (BERMEJO et al., 2005), presentes em grandes quantidades nas sementes (YANG et al., 2009; CHAMPY, 2011), sendo promissora para o controle de artropódes (ÁLVAREZ-COLOM et al., 2010; HOE et al., 2010; TOLOSA et al., 2012), porém, outros estudos atribuem a ação bioinseticida desta família aos terpenos (COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012), alcalóides (KABIR, 2010) e aos flavonóides.

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) é considerado a principal espécie-praga da família brassicaceae e o seu ataque pode ser fator limitante das áreas de cultivos no mundo (ZALUCKI et al., 2012), associado ao desequilíbrio biológico causado pelo uso excessivo do controle químico. Dependendo da região pode totalizar até 20 pulverizações, com até 4 aplicações semanais de acordo com a época de produção da cultura (VILLAS BÔAS et al., 2004). As perdas econômicas ocasionadas por *P. xylostella* podem chegar a 1 bilhão de dólares por ano (IRAC, 2016).

Em 2017 foram registrados 862 casos em todo mundo de resistência à inseticidas a *P. xylostella*, no qual abrange 95 ingredientes ativos, sendo destes 14 casos no Brasil, com registros nos Estados da Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco (IRAC:APRD, 2017), como também, à quase todos os grupos de inseticidas utilizados (RIDLAND; ENDERSBY, 2011), incluindo novos compostos, como à classe química das diamidas antranílicas (WANG; WU, 2012).

O emprego de substâncias extraídas de plantas silvestres com ação bioinseticida apresenta algumas vantagens quando comparada aos sintéticos: são renováveis, facilmente

degradáveis, ou seja, não contaminam o meio ambiente; possuem compostos de diferentes grupos químicos, principalmente as pertencentes às famílias Annonaceae, Solanaceae e Meliaceae; a seleção de populações resistentes de insetos a estas substâncias é lenta, pois o produto natural geralmente apresenta diversos compostos com ação inseticida o que reduz o processo de seleção; além de não deixarem resíduos nos alimentos e no solo, são seguros aos operadores; e de baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores (OLIVEIRA et al., 2007; CASTILLO-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ-OSORNIO; DELGADO-HERRERA, 2010). Assim, para o controle de *P. xylostella* a formulação de produtos com base em extratos vegetais de Annonaceae pode ser interessante especialmente para sistemas orgânicos, um mercado que cresce mundialmente.

Tendo em vista a importância do cultivo de brássicas e uso de extratos botânicos dentro do MIP, esta pesquisa teve por objetivo obter uma formulação a base de emulsão estável do extrato hexânico de sementes de *A. squamosa*, avaliar as características organolépticas e estabilidade a longo e curto prazo. Estimar as concentrações letais para avaliação do efeito inseticida nas diferentes fases da praga, como efeito ovicida, preferência de oviposição e instares larvais, assim como, analisar a persistência da emulsão em condições de semicampo, com folhas destacadas e planta inteira, além do estudo fitoquímico das classes de composto bioativos.

3.2 Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia: - Controle Alternativo de Pragas (LECAP), no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais (LPqRN) e em casa-de-vegetação do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em Rio Largo e Maceió, AL, Brasil, respectivamente.

3.2.1 Condução da cultura

As mudas de couve manteiga da variedade Geórgia (*Brassica oleracea* var. *acephala*) foram adquiridas da estufa SEMEAR[®], em Arapiraca-AL. Foram transplantadas em local definitivo, situado na área externa de campo do LECAP, foram adotados as recomendações de adubação, nutrição vegetal e tratos culturais conforme Filgueira (2008), exceto adubação química e o controle químico para as plantas espontâneas e insetos-praga. Folhas de couve foram utilizadas para os experimentos a partir de 40 dias após o transplântio.

3.2.2 Criação de *Plutella xylostella*

A criação e multiplicação de *P. xylostella* foi realizada no LECAP, sob condições de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h, de acordo com metodologia estabelecida por Torres et al. (2006).

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

Lagartas neonatas, oriundas de posturas realizadas nos discos de couve, foram transferidas para recipientes plásticos (20 cm de comprimento x 10 cm de largura x 5 cm de altura) contendo folhas de couve. As folhas foram substituídas diariamente até as lagartas atingirem a fase de pupa. As pupas foram transferidas para tubos de vidro de fundo chato (8,5

cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro), fechados com filme plástico transparente. Pequenos furos foram realizados no filme plástico para que houvesse as trocas gasosas. Após 72 horas, emergiam os adultos, que foram transferidos para as gaiolas, reiniciando o ciclo.

3.2.3 Obtenção das sementes e preparo de extrato hexânico de *Annona squamosa*

As sementes de *A. squamosa* foram obtidas do banco de germoplasma do CECA/UFAL, safra 2015/2016, acondicionadas em sacos de papel Kraft, secas em estufa com circulação de ar a 50°C por 48 horas, moídas em moinho tipo Wiley até obter a granulometria de pó fino (malha 2,5 mm) e acondicionado em recipiente de vidro hermeticamente fechado.

O preparo do extrato bruto foi realizado no LECAP, onde 2,8 kg de pó da semente de *A. squamosa* foi submetido à extração à frio com 3,0 L do solvente hexano [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], sob temperatura ambiente (25 - 27°C), em percolador de aço inoxidável, sendo que a extração foi rápida com duração de 4 horas e em seguida filtrada. O solvente foi removido por destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 50°C, com rendimento de 255 gramas de peso líquido, acondicionado em recipiente hermeticamente fechado e etiquetado.

3.2.4 Preparo da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS)

Para o preparo das emulsões, a água destilada (ADE), EHAS (fase oleosa), Span e Tween foram pré-aquecidos separadamente em banho Maria a uma temperatura de 60°C por 10 minutos, logo após a fase oleosa recebeu o tensoativo monoleato de sorbitano (Span[®] 60) e a fase aquosa recebeu o componente hidrossolúvel monoleato de polioxietilnossorbitano (Tween 80) para um novo aquecimento por mais 15 minutos em banho Maria, realizado no LECAP (SENHORINI, 2010). Foram testadas diferentes concentrações do Tween e do Span para verificar o tratamento com melhor estabilidade da emulsão (Tabela 1). As emulsões foram agitadas manualmente por 10 minutos em temperatura ambiente e colocadas em repouso em tubos de vidro para a observação da estabilidade por um período de 24 horas.

Tabela 1 - Proporção de homogeneizadores utilizados para o preparo das emulsões do extrato hexânico de *Annona squamosa* (EHAS), adaptado SENHORINI, 2010

Emulsão	Span® 60 (g)	Tween 80 (g)	Extrato (g)	H ₂ O (g)
1	4,0	1,0	10	85
2	3,5	1,5	10	85
3	3,0	2,0	10	85
4	0,0	5,0	10	85
5	3,5	2,0	10	85

Fonte: Autor, 2018

3.2.5 Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis

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

Foram realizados testes de estabilidade normais em longo prazo e acelerados de curto prazo. Todos os testes foram feitos em triplicata e após 24 horas do preparo de todas, observado a estabilidade das formulações.

3.2.5.1 Testes de estabilidade normais em longo prazo

Nos testes de estabilidade normais, 3 frascos de vidro contendo 6 mL foram postos em ambiente sob a direta ação solar, 3 frascos em ambiente com sol indireto e 3 em ambiente escuro, para formulação que apresentou uma melhor estabilidade em um período de 24 horas. O teste para ambiente com sol indireto foi realizado no interior do laboratório de pesquisa, o teste em ambiente escuro foi realizado uma em caixa escura, o teste da luz direta foi realizado em casa-devegetação deixada sobre bancada à luz do sol todos os dias. Todo dia, durante três meses, os frascos foram observados, com exceção dos que permaneceram em ambiente

escuro, e as características desejáveis, citadas anteriormente, foram observadas (SENHORINI, 2010).

3.2.5.1.1 Caracterização das emulsões por microscopia óptica

A avaliação da estabilidade das emulsões EHAS estáveis, foi realizada por meio de microscopia ótica (ZANIN et al., 2002). As emulsões do óleo de *A. squamosa* foram espalhadas sobre uma lâmina de vidro e, em seguida, uma lamínula foi posta sobre o material. Para visualização das amostras foi utilizado um microscópio ótico Olympus, com lente objetiva de 40x. O registro das imagens ocorreu pela utilização de uma câmera fotográfica Sony. As emulsões foram analisadas por microscopia ótica logo após o seu preparo e ao terceiro mês para as condições de estabilidade normais à longo prazo para condições em ambiente sob a direta ação solar, em ambiente com sol indireto e em ambiente escuro.

3.2.5.2 Testes de estabilidade acelerados em curto prazo

Nos testes de estabilidade acelerados, 3 frascos de vidro contendo 6 mL da formulação do extrato de *A. squamosa* foram postos em estufa a 50°C por 24 horas, 3 frascos de vidro foram colocados em geladeira a 10°C durante 24 horas e 3 frascos foram submetidos a centrifugação durante 50 minutos a 3500 rpm. Decorrido o tempo requerido, as mesmas características citadas acima foram observadas (SENHORINI, 2010).

3.2.6 Estimativa das concentrações letais da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) sobre *Plutella xylostella*

Foram realizados pré-testes de atividade inseticida com a EHAS (apresentou melhores características de estabilidade após 24 horas do preparo) em diferentes concentrações para determinar valores próximos do Limite Superior (LS) e Limite Inferior (LI) das emulsões e observar qual seria mais viável.

Determinados os limites da EHAS, foram estimadas seis concentrações através da fórmula de Bliss (1934):

$$q = (a_n \div a_1)^{1 \div n+1}$$

Onde q é a razão da progressão geométrica (PG); n = número de concentrações a extrapolar; a_n e a_1 = limites superior e inferior, respectivamente, da pg (concentrações que provocam mortalidade de cerca de 95% e semelhante à testemunha, respectivamente determinadas através de testes preliminares).

A solução da EHAS foi solubilizada em água destilada, avaliadas as seguintes concentrações: 0,00061; 0,0018; 0,0051; 0,0146; 0,0420 e 0,1209 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, correspondentes à sequência a_1 , $a_1.q$, $a_1.q^2$, $a_1.q^3$, $a_1.q^4$ e $a_1.q^5$, de acordo com a fórmula Bliss (1934).

Foram confeccionados discos foliares de couve 8 cm, pulverizados com a solução da EHAS em diferentes concentrações, utilizando-se torre de Potter System[®] (POTTER, 1952). A aplicação foi realizada a uma pressão de 5 psi/pol² utilizando-se um volume de calda de 1,7 mL, o que corresponde a um depósito de $1,9 \pm 0,37$ mg cm⁻². Esta quantidade aplicada está de acordo com o recomendado pela IOBC/WPRS (International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section) e representa o que ocorre no campo (GUEDES et al., 1995; REIS et al., 1998).

Os discos tratados com a EHAS foram distribuídos sobre uma superfície coberta com papel toalha, onde permaneceram ao ar livre para evaporação do excesso de água. Lagartas neonatas foram colocadas em placas de Petri de 8 cm de diâmetro, contendo um disco tratado sobre papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, mantidos em laboratório (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h). A partir do terceiro dia de montagem do bioensaio, foi feita a avaliação da mortalidade larval.

O experimento de toxicidade da EHAS foi conduzido em DIC, composto por 7 tratamentos, sendo 6 (concentrações) mais a testemunha e 5 repetições, cada repetição com 10 lagartas. Para estimativa das concentrações letais, CL_{50} e CL_{99} , respectivamente, foi utilizado Probit Procedure do software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2000).

3.2.7 Efeito ovicida da emulsão do extrato hexânico de *Annona squamosa* (EHAS) na fase embrionária de *Plutella xylostella*

Para o bioensaio de efeito ovicida, dois casais da traça-das-crucíferas com até 12 h de idade emergida foram selecionados para a oviposição e colocados em gaiolas plásticas. Foram colocados discos de folha de couve com 8 cm diâmetro nas gaiolas e após 24 horas de exposição aos adultos, foram retirados, de acordo com a metodologia de Torres et al. (2006), cortou-se os discos para que ficassem com 20 ovos em cada repetição, em seguida foram pulverizados utilizando-se torre de Potter System[®] (POTTER, 1952), de acordo com os tratamentos: testemunha ADE + Tween (1,5%), CL₅₀ e CL₉₉ da EHAS, Azamax 1.2 CE[®] (200 ml 100 L⁻¹ água) e Decis 25 CE[®] (30 ml. 100 L⁻¹ água) (AGROFIT, 2017).

Foram utilizados 5 tratamentos e 10 repetições, cada repetição com 20 ovos, em DIC. No 5º dia após a aplicação dos tratamentos, realizou-se a contagem do número de lagartas eclodidas em cada repetição, para a determinação da viabilidade de ovos. Utilizou-se nas avaliações uma lupa estereoscópica de 10x.

Para o experimento de fase embrionária de *Plutella xylostella*, a análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.2.8 Efeito da emulsão do extrato hexânico de *Annona squamosa* (EHAS) na preferência de oviposição em *Plutella xylostella*

Para os testes com chance de escolha para avaliação da preferência de oviposição de fêmeas adultas de *P. xylostella*, discos de folhas de couve variedade Geórgia com 8 cm de diâmetro foram pulverizados na torre de Potter System[®] (POTTER,1952), com a solução testemunha ADE + Tween (1,5%), CL₅₀ e CL₉₉ do EHAS, Azamax 1.2 CE[®] (200 ml 100 L⁻¹ água), Decis 25 CE[®] (30 ml 100 L⁻¹ água (AGROFIT, 2017), e postos sobre papel toalha para secagem ao ar livre; em seguida, divididos em partes, obtendo-se quatro círculos menores (3 cm de diâmetro) com dimensões semelhantes.

Foi formado um conjunto, constituído por 5 discos dispostos equidistantes sobre pote com esponja umedecida com ADE colocada em gaiola (14 x 11 x 5 cm). Três casais de *P. xylostella* emergidos com até 12 horas de idade, provenientes da criação, foram introduzidos em cada gaiola e mantidos por 24 horas para oviposição sendo alimentados com solução

açucarada a 10%, embebida em esponja presa na parte superior da gaiola, após retirados os discos foram registrados.

A deterrência à oviposição foi calculada com a seguinte fórmula (PASCUAL-VILLALOBOS; ROBLEDO, 1998), e o efeito da emulsão hexânica foi dado na porcentagem da incubação de ovos estimado:

$$\text{Deterrência a oviposição} = \left[1 - \frac{NEt}{NEc}\right] \times 100$$

Onde **NEt** é o número de ovos no tratamento e **NEc** é o número de ovos no controle.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco gaiola-repetição. Para o experimento de preferência de oviposição de *Plutella xylostella*, a análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.2.9 Efeito da emulsão do extrato hexânico de *Annona squamosa* (EHAS) em diferentes estádios larvais de *Plutella xylostella*

Discos foliares de couve com 8 cm de diâmetro, foram pulverizados com os seguintes tratamentos: testemunha ADE + Tween (1,5%), CL₅₀ e CL₉₉ do EHAS, Azamax 1.2 CE[®] (200 ml 100 L⁻¹ água), Decis 25 CE[®] (30 ml 100 L⁻¹ água (AGROFIT, 2017); concentrações letais, CL₅₀ e CL₉₉ da EHAS, utilizando a torre de Potter System[®] (POTTER, 1952) e postos sobre papel toalha para secagem ao ar livre; posteriormente os discos de couve tratados foram colocadas em placas de Petri de 8cm de diâmetro, sobre disco de papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, mantidos em laboratório (temperatura de 25 ± 2°C, UR de 60 ± 10% e fotofase de 12h) e colocados lagartas de *P. xylostella* no 1°, 2°, 3° e 4° instar. No 3° dia após a montagem do bioensaio, foi feita a avaliação da mortalidade larval.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 x 4 +1), 10 repetições, cada repetição com 10 lagartas. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.2.10 Avaliar a persistência da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) sobre *Plutella xylostella* em condições de semicampo com folhas destacadas e planta inteira

Para avaliar a persistência da EHAS com as concentrações leitais, CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente, testemunda ADE + Tween (1,5%) e Azamax[®] grupos de 10 plantas contendo em média 4 folhas, foram pulverizadas no mesmo dia, na face adaxial e abaxial, com os diferentes tratamentos e acondicionadas em casa-de-vegetação até o final dos bioensaios.

No primeiro experimento as folhas das plantas foram destacadas levadas ao laboratório, cortadas em discos de 8 cm de diâmetro e oferecidas a lagartas neonatas em placas de Petri.. No segundo experimento, as lagartas foram inoculadas nas folhas da planta inteira, cobertas com um tecido “voil” branco para evitar a fuga das lagartas, permanecendo em casa-de-vegetação. Os intervalos de avaliação do efeito residual da EHAS foram de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 dias, sendo o tempo zero as plantas pulverizadas no mesmo dia.

Para ambos os bioensaios o delineamento estatístico foi DIC, em esquema fatorial (4 x 22), 10 repetições, cada repetição com 10 lagartas. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.2.11 Estudo fitoquímico de extratos de *Annona squamosa*

3.2.11.1 Partição líquido-líquido do extrato bruto hexânico de *Annona squamosa*

O extrato bruto hexânico de *A. squamosa* (250,0 g) foi submetido ao processo de partição com solventes de polaridades crescentes (hexano e acetato de etila). Primeiramente foi suspenso em metanol e extraído com hexano (4 x 400 mL). Depois com a porção metanólica foi acrescida de água até obtenção de uma mistura metanol: água (1;1; v/v). A solução foi particionada à temperatura ambiente (25-27°C), sucessivamente, com acetato de etila (4 x 400 mL), obtendo-se assim, respectivamente, as frações em acetato de etila (FACT) (138,0 g) e hexano (9,75 g) (FH) após remoção dos solventes em evaporador rotatório da marca BUCHI[®], à pressão reduzida, até a secura e a massa do resíduo foi determinada, no

laboratório do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2.11.2 Bioensaios para testar as frações da partição líquido-líquido de *Annona squamosa*

As frações obtidas foram testadas em lagartas recém-eclodidas de *P. xylostella* seguindo mesmo procedimento experimental do item 3.2.6.

O delineamento estatístico utilizado para os testes inseticidas com as frações foi o inteiramente casualizado contendo 8 repetições. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.2.11.3 Fracionamento da partição biotiva do extrato bruto hexânico de *Annona squamosa*

Mediante os resultados obtidos no bioensaio inseticida anterior, as FACT e FH mais ativa da partição líquido-líquido de *A. squamosa* foram solubilizadas em seus respectivos solventes e submetidas ao CLAE-DAD.

As frações foram acondicionado em Beckers, com 250 mg FACT + 25 ml de CH₃CH₂OH (P.A.) e 250 mg FH + 25 ml de CH₃CH₂OH (P.A.), cada e levadas ao ultrassom para solubilizar. A FACT foi adicionada 10 ml de água Mili-Q e levado à centrifugação por 10 min (2500 rpm; temp. 1°C), posteriormente foi retirado uma alíquota para CLAE. Na FH foi adicionada 25 ml de CH₃CH₂OH (P.A.) e colocado no ultrassom, depois retirado uma alíquota para CLAE.

3.2.11.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As corridas cromatográficas analíticas foram realizadas com solventes ultrapuros grau CLAE. Na fase móvel foi utilizada água Mili-Q, obtida em equipamento MILLIPORE Simplicity UV® e álcool (70%). As amostras injetadas no cromatógrafo líquido foram previamente filtradas em filtro seringa, com membrana de nylon 0,45 µm x 47 mm com sistema SUPELCO, próprio para filtração de solventes.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu® (Tokyo, Japão), constituído de 2 bombas de alta pressão, modelo LC-20ADXR®, autoinjeter modelo SIL-20AXR®, detector UV-DAD modelo SPDM-20A®; forno para coluna modelo CTO-20A, que armazenou uma coluna cromatográfica C18, da Phenomenex, modelo Júpiter e um processador de comunicação modelo CBM-20A.

Todas as frações, antes de injetadas no cromatógrafo, foram filtradas em filtro de seringa MILLIPORE® Millex – HV 0,45 µm PVDF (Polifluoreto de vinilideno). As duas frações analisadas foram FACT e FH.

3.2.11.4.1 Identificação de acetogeninas (ACG) de *Annona squamosa*

Visando detectar a presença de ACG, a FACT e FH obtido das sementes de *A. squamosa* foram submetidos a análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Como fase móvel, foi utilizado acetonitrila (A) e água Mili-Q (B), sendo que as condições da eluição estão descritas na Tabela 2. A coluna utilizada foi a C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm), modelo Júpiter® da Phenomenex® detecção no UV em λ 205, 215, 231 e 280 nm, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura de 35°C.

Tabela 2 - Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD das frações obtido da *Annona squamosa*.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Acetonitrila (A) (%)	Água Mili-Q (B) (%)
0	1,0	85	15
14	1,0	85	15
23	1,0	100	0
30	1,0	85	15
31	1,0	85	15

Fonte: Autor, 2018.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Emulsão

Quanto à estabilidade e ao aspecto, a emulsão 5 foi a única estável, homogênea, ausente de grumos e aparência leitosa e cremosa, considerado um resultado excelente (Tabela 3). O resultado de estabilidade observado para emulsão hexânica do óleo de *A. squamosa* (EHAS) foi semelhante aos encontrados por Senhorini (2010) quando utilizou mesmo protocolo de preparo das emulsões para o óleo de *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae).

Tabela 3 - Emulsões preparadas com óleo de sementes de *Annona squamosa* com Span 60 e Tween 80 em proporções diferentes, Rio Largo-AL

Emulsão	Span® 60 (g)	Tween 80 (g)	Observação após 24 h	Aspecto	Resultado
1	4,0	1,0	Instável	Separado	Ruim
2	3,5	1,5	Instável	Separado	Ruim
3	3,0	2,0	Instável	Separado	Ruim
4	0,0	5,0	Instável	Separado	Ruim
5	3,5	2,0	Estável	Homogêneo	Excelente

Fonte: Autor, 2018 - Adaptado de SENHORINI, 2010

As demais emulsões apresentaram-se alterações físico-químicas nas variáveis analisadas, ou seja, todas instáveis após 24 horas do preparo, separação das fases, presença de grumos, considerado uma emulsão ruim (Tabela 3). Estudos foram realizados para melhorar a estabilidade em relação à adição de estabilizantes, dentre-os destacam Schmaltz; Santos; Guterres (2005), Schimidts et al., (2009); Senhorine (2010), IQBAL et al., (2013).

Dentre os estabilizantes utilizados nos preparos de formulados emulsionáveis, Pemulen (1990) recomenda o uso do Span[®] 80, para aumentar a estabilidade de emulsões, mas, é preciso ajustar a proporção do Span no desenvolvimento dos formulados, como apresentado na tabela 3. Para Tadros (2004), o uso do estabilizante, promoverá diminuição do tamanho do glóbulo por reduzir a tensão na interface óleo em água (O/A).

Lima et al. (2008) desenvolveu emulsão estável do tipo O/A viável comercialmente com óleo de babaçu, quando adicionou 0,4% (p/p) de Span[®] 80, ao passo que, no presente estudo o Span[®] 60 (3,5% p/p) foi entre as proporções testadas a que apresentou resultado excelente.

Estes estudos exprimem a importância do desenvolvimento tecnológico de formulações fitossanitárias, visando contornar a baixa solubilidade de alguns extratos vegetais para protocolos que os tornem solúveis, de acordo com Cox (1999) permitam ao ingrediente ativo uma concentração apropriada para manipulação, aplicação e dispersão do produto, além de melhorar a sua eficácia contra a espécie alvo a ser controlada.

3.3.2 Avaliação organoléptica e teste de estabilidade da emulsão estável: testes normais em longo prazo e acelerados em curto prazo

3.3.2.1 Testes de estabilidade normais em longo prazo

A estabilidade física da emulsão, em termos de aparência e de aspecto, tanto expostas em ambiente escuro e com sol indireto apresentaram a mesma estabilidade durante os três meses estudados, quanto a não separação de fases oleosa e aquosa (O/A). Quando a emulsão foi exposta em ambiente com sol direto a sua qualidade foi alterada, tornando-a heterogênea, ou seja, com separação das fases O/A, com brilho opaco, maciez, aparência fina e

opalescente, apresentando três defeitos não aceitáveis para um tipo de formulação, corroborando com Zanin et al., (2001) (Tabela 4).

Tabela 4 - Estudo da estabilidade em ambiente com sol indireto, sol direto e em ambiente escuro, entre os meses de dezembro de 2016 a março de 2017, Rio Largo, AL

Características avaliadas	Ambiente escuro		Sol indireto	Sol direto
	Homogeneidade	Homogêneo	Homogêneo	Heterogêneo
Brilho		Brilhante	Brilhante	Opaco
Macio		Macio	Macio	Macio
Fino		Fino	Fino	Fino
Opacidade		Perolado	Perolado	Opalescente

Fonte: Autor, 2018.

De acordo com Zanin et al., (2001) quando pretende-se avaliar um tipo de formulação de um produto fitossanitário, deve-se definir um conjunto de características que se deseja avaliar quanto ao aspecto ou aparência do produto final. As características organolépticas desejadas para as emulsões como qualidades aceitáveis são: homogeneidade, brilho, macio, fino e opacidade. Dentro destas qualidades, o produto final que se apresentar heterogêneo, opaco, fibroso, grosso e opalescente, são considerados defeitos sérios encontrados nas emulsões formuladas.

Quanto às condições de armazenamento avaliadas (Tabela 4), a emulsão estocada em ambiente com sol direto, foi à única com as características físicas do produto com resultado ruim, certamente essa exposição do produto formulado a ação direta do sol e a elevadas temperaturas, provocaram alterações da estabilidade física. Scott; Kaushik (2000) observaram que o extrato de azadiractina em exposição à luz do sol, apresentou redução da bioatividade, demonstrando sensibilidade do fitoquímico, podendo ser reduzido a 60 % após quatro horas de exposição ao sol.

São crescentes as pesquisas para desenvolvimento de formulações oleosas estáveis para uso na agricultura no controle dos insetos-praga (SILVA; PEREIRA; BENTO, 2007; ARAÚJO JÚNIOR; MARQUES; OLIVEIRA, 2009; COSTA et al., 2010), visando proteger

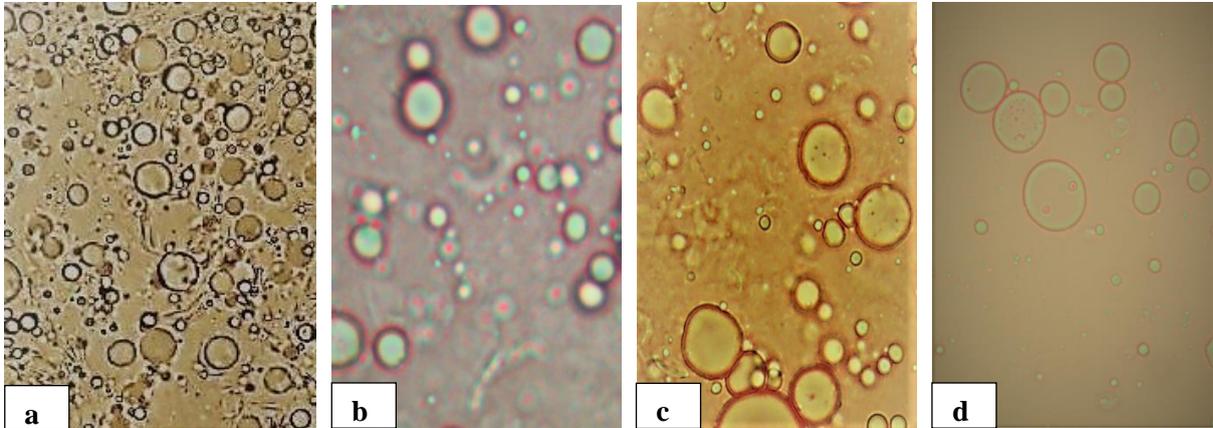
as moléculas naturais ou sintéticas, mantendo a ação inseticida desses produtos em condições de campo e armazenamento, já que os processos de degradação, de intensidade variável ao longo do tempo, estão expostas aos fatores abióticos como a temperatura, umidade e radiação.

Desta forma, sugere-se que a EHAS não deve ser armazenada sob essas condições, pois pode comprometer não só a estabilidade, mas também, ocorrer à degradação do princípio ativo do extrato botânico.

3.3.2.2 Caracterização das emulsões por meio da microscopia óptica

Através da avaliação em microscopia óptica (Figura 1) revelou-se perfil semelhante para as figuras dos tratamentos após o preparo (Fig. 1a), após 3 meses sob ambiente escuro (Fig. 1b) e após 3 meses sob sol indireto (Fig. 1c), com glóbulos de óleo de *A. squamosa* bem formados e definidos. A presença de glóbulos maiores persistindo ao longo do tempo de avaliação foi observado após 3 meses sob ambiente escuro (Fig. 1b) e após 3 meses sob sol indireto (Fig. 1c), assim, as mesmas não apresentaram alteração da estabilidade. Já o tratamento logo após o preparo apresentou agregados de glóbulos maiores e menores predominantes bem distribuídos nos espaços, qualidade atribuída à estabilidade para as características avaliadas. Quando comparado à emulsão após o preparo (Fig. 1a) o tratamento que foi submetido ao ambiente com sol direto (Fig. 1d) há permanência dos glóbulos maiores, porém, com poucos glóbulos menores do óleo de *A. squamosa*, apresentando alteração da estabilidade e conseqüentemente diminuição do tempo de armazenamento.

Figura 1 - Fotografias correspondentes a emulsão 5 por meio da microscopia óptica. a) após o preparo; b) após três meses sob ambiente escuro; c) após três meses sob sol indireto e d) após três meses sob sol direto



Fonte: Autor, 2018.

De acordo com Senhorini (2010) a presença de glóbulos mais homogêneos em diâmetro, agregação e distribuição são sinais visíveis de estabilidade da emulsão.

3.3.2.3 Testes de estabilidade acelerados à curto prazo

Os testes de estabilidade acelerados em curto prazo sob diferentes estresses, mostraram que a estabilidade física das emulsões avaliadas, em termos de aparência e de aspecto foi alterada quando expostas a centrifugação (3500 rpm) e ao aumento drástico na temperatura no sistema em estufa (50°C) (Tabela 5). Estas alterações sofridas quanto as suas características avaliadas são consideradas como defeitos sérios e não aceitáveis, como já descrito, nos testes de estabilidade normais em longo prazo.

Tabela 5 - Avaliação das propriedades organolépticas das emulsões em curto prazo sob diferentes estresses, Rio Largo-AL

Características avaliadas	Curto prazo			
	Geladeira à 10 °C		Centrífuga à 3500 rpm	
	Estufa à 50 °C	Estufa à 50 °C	Estufa à 50 °C	Estufa à 50 °C
Homogeneidade	Homogêneo	Heterogêneo	Heterogêneo	Heterogêneo
Brilho	Brilhante	Opaco	Opaco	Brilhante
Macio	Macio	Macio	Macio	Fibroso
Fino	Fino	Fino	Fino	Fino
Opacidade	Perolado	Opalescente	Opalescente	Opalescente

Fonte: Autor, 2018.

Na condição de teste sob estresse imposto na refrigeração controlada em geladeira (10°C) foram conservados as características desejáveis da emulsão, como citado por Bordes; Pollet; Avérous (2009), os quais enfatizam que as formulações devam apresentar propriedades úteis, tais como a rigidez, a permeabilidade, a cristalinidade, estabilidade térmica a solubilidade e biodegradabilidade.

Senhorini (2010) realizou teste de preparo de emulsões sob as mesmas condições com extrato de *C. guianensis* e constatou as mesmas alterações obtidas no presente estudo com a emulsão 5 do extrato hexânico de *A. squamosa*, para o aspecto da aparência quando submetidas as rotações sob a centrifugação e a altas temperatura.

Buscar a uniformidade da emulsão consiste em dizer que as gotículas do líquido disperso no outro apresentam diâmetros iguais, em sua grande maioria, armazenadas sob condições visando conservar as características químicas do produto formulado. Quanto menor o tamanho das gotas dispersas e maiores a densidade e a viscosidade da fase contínua, maior e melhor será a estabilidade cinética da emulsão (SAMAVATI et al., 2011).

Para o presente estudo a condição de estocagem e armazenagem sob condição em ambiente geladeira (10°C) foi a desejável para as características avaliadas (Tabela 5).

3.3.4 Estimativa das concentrações letais da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) no controle de *Plutella xylostella*

A emulsão hexânica de *A. squamosa* apresentou toxicidade a *P. xylostella*, se ajustando ao modelo de Probit com o valor de $P = 0,38$. As CL_{50} e CL_{99} estimadas foram de 2,76 e 212,52 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentrações letais (CL_{50} e CL_{99}) da emulsão hexânica da semente de *Annona squamosa* sobre lagartas neonatas de *Plutella xylostella*, Rio Largo-AL

Tratamento	n ¹	GL ²	Inclinação ±EP	CL ₅₀ ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) (IC 95%) ³	CL ₉₉ ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) (IC 95%) ³	X ² ⁴	P ⁵
Emulsão hexânica	350	5	1,23 ± 0,12	2,76 (2,00 – 3,80)	212,52 (100,88 – 625,20)	4,20	0,38

EP: Erro-padrão; CL: Concentração letal.

¹ Número de lagartas utilizadas no teste..

² Grau de liberdade do qui-quadrado.

³ Intervalo de confiança.

⁴ Significância >0,05

Fonte: Autor, 2018.

Essa promissora ação tóxica, pode ser atribuída ao fato de espécies da família Annonaceae apresentar efeito fitotóxico, fagodeterrentes, inibidores de crescimento ou outros mecanismos de ação que inibam o desenvolvimento e/ou provoquem a morte de insetos-praga (OLIVEIRA; PEREIRA, 2009; BLESSING et al., 2010; KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014; ANSANTE et al., 2015; GOMES et al., 2016; TRINDADE et al., 2011, 2018).

A atividade bioinseticida dos extratos botânicos para o controle de insetos-praga poderá está dependente da espécie e da parte ou órgão da planta, como também, do solvente usado na extração (VANICHPAKORN; DING; CEN, 2010), por isso os estudos com as estimativas das concentrações letais é de grande importância.

Laetemia; Isman (2004c) avaliaram a eficácia de extratos de sementes de *A. squamosa* sobre larva de *P. xylostella*, alimentadas com folhas de repolho. Foram realizados três ensaios em estufa utilizando extratos aquosos e etanólico. O extrato etanólico na concentração de 0,5% (p/v) foi 2,5 vezes mais eficaz do que o inseticida botânico comercial de rotenona à 1%. Extratos aquosos e etanólicos de sementes de *A. squamosa* foram tóxicos para *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae), inibitórios para o crescimento larval de *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) a uma concentração dietética de 250 ppm (0,025% em peso), respectivamente (LAETEMIA; ISMAN, 2004a,b).

Seffrin et al., (2010) avaliaram efeitos tóxicos, antideterrente e inibição do crescimento de extratos de semente de *A. squamosa* e *A. atemoya* em larvas do terceiro instar de *T. ni* em diferentes bioensaios. O extrato metanólico de *A. squamosa* foi 10 vezes mais ativo (167,5 ppm) com ação deterrente em relação ao extrato de *A. atemoya* (382,4ppm). Em relação à inibição do crescimento o extrato de *A. squamosa* foi mais ativo do que o *A. atemoya* (38 ppm versus 117 ppm, respectivamente). Rao; Sharma; Sharma (2005) concluíram efeito tóxico de extratos de acetato de etila e hexano de semente de *A. squamosa* para larvas neonatas e de terceiro instar de *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae).

Com resultados de toxicidade do extrato hexânico de *A. squamosa* sobre *P. xylostella*, procedeu-se a continuidade nos bioensaios para variáveis biológicas em testes laboratoriais e de semicampo.

3.3.5 Efeito ovicida da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) sobre *Plutella xylostella*

Na Tabela 7 são apresentados os dados da ação ovicida onde é analisada a viabilidade dos ovos de *P. xylostella* para o efeito do EHAS, tendo os resultados se mostrados diferentes significativamente a 5% de probabilidade para os testes de Tukey (F=231, 42; p<0,005).

Na variável viabilidade dos ovos foi observado o menor número de lagartas eclodidas para a emulsão na CL₉₉ (28%) diferindo dos tratamentos CL₅₀ (60%), Azamax 1.2 CE[®] (55%), Decis 25 CE[®] (95%) e testemunha (98%), visto não haver diferença significativa (p > 0,05) entre a emulsão CL₅₀ (60%) e Azamax 1.2 CE[®] (55%), podendo ser inserido a concentração subletal a outras táticas de controle integrado no manejo integrado da *P. xylostella*, ao passo, que apenas o tratamento Decis 25 CE[®] (95%) não diferiu estatisticamente (p > 0,05) da testemunha. (Tabela 7).

Tabela 7 - Viabilidade dos ovos (Média \pm DP) de *Plutella xylostella* tratados com extrato hexânico de sementes de *Annona squamosa*, Rio Largo-AL

Tratamentos	Viabilidade dos ovos (%) \pm (DP)*
CL ₉₉	28,0 \pm 5,8 a
CL ₅₀ ***	60,0 \pm 7,8 b
Azamax 1.2 CE®	55,0 \pm 7,4 b
Decis 25 CE®	95,0 \pm 4,7 c
Testemunha	98,0 \pm 3,5 c
CV%**	9,03

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

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

Fonte: Autor, 2018

Para Machado; Silva; Oliveira (2007) o efeito ovicida pode variar de acordo com a espécie do inseto e com as características das substâncias utilizadas, pois algumas plantas que apresentam atividade inseticida ocasionam baixo ou nenhum efeito ovicida. Em contrapartida, neste estudo, a eficácia da emulsão do extrato hexânico de sementes de *A. squamosa* foi comprovada, conseguindo interferir na fase embrionária do inseto *P. xylostella*, com maior eficiência que os inseticidas sintéticos, Decis 25CE® e Azamax 1.2CE® de marca comercial registrada (AGROFIT, 2017).

A explicação da ação ovicida da CL₉₉ do extrato hexânico de *A. squamosa* pode ser explicada por Torres et al. (2006), que através de observações microscópicas, verificaram microporos com 0,8 μ m, responsáveis pelas trocas gasosas do embrião, o que permitiu ação ovicida dos extratos nas concentrações *A. indica* (0,06% m/v), *M. azedarach* (12,5% m/v) e *A. pryrifolium* (7% m/v) sobre *P. xylostella*, impedindo sua eclosão. Os orifícios foram encontrados em número de três, localizados em uma das extremidades do ovo de *P. xylostella*. Pode-se observar ainda que o córion possui uma textura rugosa, podendo ser favorável à fixação ou retenção dos extratos vegetais, o que mantém os extratos mais aderidos à superfície do ovo. Apesar dos orifícios nos ovos de *P. xylostella*, Decis 25 CE® (deltametrina) não apresentou efeito ovicida significativo (5%), no qual o modo de ação desse inseticida sintético

pertence ao grupo 3A (Moduladores dos canais de sódio – Piretroides), que age por ação de contato e ingestão, com atuação no sistema nervoso e muscular do inseto (IRAC-APRD, 2017).

3.3.6 Efeito na preferência de oviposição da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) sobre *Plutella xylostella*

Quando analisado a preferência de oviposição para a variável número de ovos (Tabela 8) foi constatado que a CL₉₉ da emulsão, Decis 25 CE[®] e Azamax 1.2 CE[®] interferiram na escolha de folhas de couve tratadas para oviposição *P. xylostella*, como consequência proporcionaram menor oviposição, 67,2 (25,58%); 67,4 (25,36%) e 62,5 (30,79%) ovos, respectivamente, porém, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da CL₅₀ da emulsão e testemunha, 88,40 (2,11%) e 90,3 ovos, respectivamente. Os resultados evidenciam a ação de fitoquímicos da emulsão CL₉₉ do extrato hexânico de *A. squamosa* para repelência a oviposição de *P. xylostella*.

Estudos anteriores de deterrência à oviposição de muitos extratos de plantas em *P. xylostella* foram investigados (PIPITHSANGCHAN et al., 2004; SELJASEN; MEADOW, 2006; TORRES et al., 2006; TRINDADE et al., 2008; DEQUECH et al., 2009; ABBASIPOUR et al., 2010; KODJO et al., 2011; JESUS et al., 2011).

Kodjo et al. (2011) detectaram que fêmeas adultas da traça-das-crucíferas fazem claramente distinção entre plantas pulverizadas com a emulsão de *R. communis* e com água para preferência a oviposição. Kusari; Verma; Lamshoeft. (2012) destacam que os produtos de origem vegetal com ação repelente a oviposição produzem estimulações específicas nos quimiorreceptores gustativos dos indivíduos expostos, desencadeando interferência na percepção de outros quimiorreceptores também presentes na região periférica do aparelho bucal.

Tabela 8 - Preferência da oviposição (Média ± DP) de *Plutella xylostella* tratados com emulsão do extrato hexânico de sementes de *Annona squamosa*, Rio Largo-AL

Tratamentos	Número de ovos ±(DP)
CL ₉₉	67,2 ± 32,5 a
CL ₅₀ ***	88,4 ± 27,6 b
Azamax 1.2 CE®	62,5 ± 32,9 a
Decis 25 CE®	67,4 ± 16,1 a
Testemunha	90,3 ± 9,80 b
CV%**	9,15

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); * DP= Desvio padrão; **CV%= Coeficiente de variação; ***CL₅₀ e CL₉₉ = concentração subletal e letal.

Fonte: Autor, 2018

A ação repelente para oviposição de *P. xylostella* do EHAS apresenta efeito tanto quanto os resultados obtidos para as marcas comerciais para controle químico, Decis 25 CE® e orgânico, Azamax 1.2 CE®, demonstrando ação inseticida. Pode-se inferir que o menor número de ovos colocados por *P. xylostella* nas superfícies tratadas com a EHAS tenha sido decorrente da ação repelente dos compostos voláteis ou ocasionado pela irritabilidade das fêmeas em contato com as superfícies tratadas por ocasião da oviposição. O efeito repelente se acentua com a quantidade de substâncias bioativas concentradas de acordo com as concentrações letais determinadas (TORRES et al., 2006; KODJO et al., 2011; KUSARI et al., 2012; NANSEN et al., 2016).

3.3.7 Efeito da emulsão do extrato hexânico de *Annona squamosa* (EHAS) em diferentes estádios larvais de *Plutella xylostella*

O experimento que avaliou a atividade bioinseticida da emulsão do extrato EHAS sobre diferentes estádios larvais de *P. xylostella* diferiu estatisticamente para os fatores tratamentos ($F=258,89$; $p < 0,05$), instares ($F=49,57$; $p < 0,05$) e interação tratamentos e instares ($F=10,99$; $p < 0,05$).

Em relação aos ínstars, a CL₉₉ e Azamax 1.2 CE® não diferiram ($p > 0,05$) para os diferentes instares (exceto no 3º instar), ao passo que ambos, diferiram ($p < 0,05$) da marca

comercial Decis 25 CE[®] em todos os ínstaes; CL₉₉ diferiu ($p < 0,05$) em todos os ínstaes da CL₅₀, ao passo que o Azamax 1.2 CE[®] não diferiu ($p > 0,05$) no 3^o e 4^o ínstar. Vê-se que a CL₉₉ sempre mostrou maior bioatividade, seguidamente do Azamax 1.2 CE[®], CL₅₀ e Decis 25 CE[®] (Tabela 9).

O Decis 25 CE em condições de laboratório apresentou média de 26,5% de mortalidade para os diferentes ínstaes quando comparado aos demais tratamentos, ou seja, baixa eficiência na presente pesquisa. Fato também foi constatado por Thuler; Bortoli; Barbosa (2007) quando avaliaram a toxicidade de diferentes inseticidas químicos e produtos vegetais, dentre-os a deltametrina (Decis 25 CE[®]) não ultrapasou 22% de mortalidade para nenhuma das concentrações testadas. A deltametrina está inserida dentre os princípios ativos registrados em todo o mundo com resistência inseticida a *P. xylostella* (IRAC: APRD, 2017). No Brasil, Castelo Branco; Gatehouse (1997), registrou resistência a diferentes grupos químicos, piretroides, organofosforados e *B. thuringienses* para a traça das crucíferas. Já Oliveira et al. (2011) e Silva et al. (2012) observaram resistência de *P. xylostella* para os grupos químicos oxadiazinas, benzoilureias e piretróides, nos Estados de Pernambuco e Espírito Santo, Brasil. Castelo Branco et al. (2003) adota previamente nas avaliações laboratoriais que o potencial inseticida eficiente será aquele com a mortalidade \geq de 90% das larvas.

Tabela 9 - Média \pm DP de diferentes ínstaras de lagartas *Plutella xylostella* depositados em folhas de couve tratadas com emulsão do extrato hexânico de semente de *Annona squamosa* (EHAS), Rio Largo-AL

Tratamentos	Mortalidade (%)			
	1º Instar	2º Instar	3º Instar	4º Instar
CL ₉₉	98,0 \pm 4,2 aA	67,0 \pm 11,6 aB	59,0 \pm 5,6 aB	56,0 \pm 15,7 aB
CL ₅₀	50,0 \pm 8,2 bA	41,0 \pm 7,4 bAB	41,0 \pm 5,7 bAB	33,0 \pm 8,2 bcB
Azamax 1.2 CE [®]	99,0 \pm 3,3 aA	56,0 \pm 17,4 aB	44,0 \pm 17,9 bB	46,0 \pm 11,1 abB
Decis 25 CE [®]	29,0 \pm 17,9 cA	29,0 \pm 18,5 bA	26,0 \pm 11,7 cA	22,0 \pm 9,1 cA
Testemunha	2,0 \pm 4,2 dA	1,0 \pm 3,1 cA	2,0 \pm 4,2 dA	1,0 \pm 3,1 dA
CV %	26,9			

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

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

Fonte: Autor, 2018

A CL₉₉ teve efeito semelhante à Azamax 1.2 CE[®] à medida que os ínstaras avançaram ambos diferindo da CL₅₀ (exceto no 4º instar). Tanto a CL₉₉ quanto Azamax 1.2 CE[®] apresentaram redução significativa no efeito inseticida à medida que o inseto passou do 1º estágio larval, para os seguintes estágios (2º, 3º e 4º ínstaras). Na CL₅₀ a redução de efeito significativa só é observado entre o 1º e 4º instar, ao passo que o Decis 25 CE[®] não há diferença significativa para os diferentes estágios larvais.

Estudos realizados por Picanço et al. (1997) e por Bacci et al. (2002), quais verificaram que, quanto maior o volume corporal, maior é a área específica e, uma maior exposição aos inseticidas (YU, 1988). Porém, observa-se uma rápida metabolização do inseticida por enzimas, eficaz contra inseticidas prontamente degradáveis (CHEN; MAYER, 1985). Segundo Fukuto; Mallipudi (1983) o mecanismo de detoxificação permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente para prevenir a ação no sítio-alvo, essa degradação poderá ocorrer por vários processos metabólitos, nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto.

Estudos foram realizados com espécies de anonas para avaliar ação bioinseticidas, Leatemia; Isman (2004c) atestaram toxicidade larvicida sobre *P. xylostella* e *T. ni* do extrato aquoso de *A. squamosa*. Isman (2006) comprovou que os extratos etanólicos e aquosos de sementes de *A. squamosa* coletados em vários locais no leste da Indonésia apresenta ação inseticida para *P. xylostella*. Seffrin et al. (2010) confirmaram atividade bioinseticida do extrato metanólico de *A. squamosa*, quais apresentaram fagodeterrência, redução do desenvolvimento larval e toxicidade sobre larvas de 3º instar de *T. ni*.

A ação larvicida dos bioativos da EHAS sobre *P. xylostella*, verificada neste estudo, poderá está associados aos flavonoides, alcaloides e ACGs.

338 Efeito residual da emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) sobre *Plutella xylostella* em condições de semicampo com folha destacada e planta inteira.

O experimento de persistência da EHAS diferiu estatisticamente para os fatores tratamento ($F=1452,80$; $p < 0,05$), tempo ($F=109,60$; $p < 0,05$) e interação tratamento e tempo ($F=17,19$; $p < 0,05$) na condição semicampo com folha destacada (Tabela 10). Para o fator tempo os tratamentos CL₅₀, CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] diferiram entre si ($p < 0,05$) apresentando maiores porcentagens de mortalidade até o 18º, 16º e 18º dia, respectivamente (Tabela 10).

A mortalidade causada pela CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] não diferiram entre si ($p > 0,05$) até o 14º dia, porém, diferiram da CL₅₀ durante todo período, exceto ao 22º dia quando CL₅₀ foi igual à testemunha.

Na tabela 11 é analisada a persistência da EHAS, qual diferiu estatisticamente para os fatores tratamentos ($F=2856,12$; $p < 0,05$), tempo ($F=273,64$; $p < 0,05$) e interação tratamentos e tempo ($F=41,33$; $p < 0,05$) na condição semicampo com planta inteira. Para o fator tempo os tratamentos diferem da testemunha durante todo o período; os tratamentos CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] não diferem entre si ($p > 0,05$), com exceção do 8º dia, apresntando ótimo potencial inseticida, com média 88 e 93% de efeito tóxico, respectivamente, mas diferem da CL₅₀ durante todo o período exceto no 8º dia; na CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] vão com o mesmo efeito até o 18º dia, quando reduz significativamente; enquanto a CL₅₀ apresenta efeito tóxico até o 18º dia, com decréscimo da persistência significativo.

A tecnologia de aplicação de agrotóxicos deve reunir todos os conhecimentos científicos que proporcionem a correta colocação do produto biologicamente ativo no alvo, em quantidade necessária, de forma econômica, com mínimo de contaminação de outras áreas (GARRIDO et. al, 2017).

São escassos estudos com formulados de extratos vegetais que avaliam a persistência da atividade bioinseticida. Parihar; Undirwade; Wadaskar (2017) avaliaram a persistência dos inseticidas *Beauveria bassiana* (1,15% WP), *Metarhizium anisopliae* (1,15% WP), *Bacillus thuringiensis* (0,5% WP), Azadiractina (300ppm) e Spinosad (45 SC) para o 2º instar das larvas de *P. xylostella* na condição da folha tratada destacada da planta e fornecida ao inseto-praga e constataram: o efeito residual tóxico médio foi Spinosad (86,8%), *B. bassiana* (70,6%), *M. anisopliae* (60,8%), *B. thuringiensis* (57,4%) e Azadirachtina (48,5%); a ação da persistência da toxicidade foi de 10 e 14 dias para *M. anisopliae* e ao grupo: Spinosad, Azadirachtina, *B. thuringiensis* e *B. bassiana*, respectivamente. Em outro estudo concluíram que o formulado comercial NeemAzal® para larvas do estágio de 3º instar de *P. xylostella* apresentou máxima mortalidade larval até o 10º dia e posteriormente o controle continuou com redução da atividade bioinseticida (YADAV et al., 2009).

Tabela 10 - Mortalidade \pm DP larval de 1º instar de *Plutella xylostella* em condições de semicampo com folha destacada das plantas tratadas com a emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) ao longo do tempo, Rio Largo-AL

Tratamentos	Dias após aplicação (Mortalidade %)										
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Testemunha	2 \pm 4,2 cA	2 \pm 4,2 cA	1 \pm 3,1 cA	1 \pm 3,1 cA	2 \pm 4,2 cA	3 \pm 4,8 cA	1 \pm 3,2 cA	2 \pm 4,2 dA	1 \pm 3,2 dA	1 \pm 3,2 cA	2 \pm 4,2 bA
CL ₅₀	53 \pm 8,2 bA	53 \pm 9,5 bA	49 \pm 9,2 bAB	42 \pm 7, 4 bABCD	44 \pm 10,1 bABC	42 \pm 10, 4 bABCD	39 \pm 7,4 bBCD	34 \pm 8,4 cCDE	30 \pm 9,4 cCD	12 \pm 4,2 bE	5 \pm 5,3 abE
CL ₉₉	75 \pm 10,8 aA	76 \pm 6,9 aA	75 \pm 7,1 aA	85 \pm 7,1 aA	87 \pm 6,4 aA	85 \pm 12,7 aA	82 \pm 7,9 aA	75 \pm 13,5 bA	61 \pm 19,1 bB	38 \pm 9,9 aC	13 \pm 9,8 aD
Azamax®	81 \pm 11,8 aA	83 \pm 9,5 aA	81 \pm 11,0 aA	81 \pm 7,4 aA	86 \pm 9,7 aA	84 \pm 18,4 aA	82 \pm 16,2 aA	91 \pm 12,9 aA	84 \pm 11,7 aA	38 \pm 10,3 aB	15 \pm 5,3 aC
CV (%)	20,28										

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

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

Fonte: Autor, 2018

Tabela 11: Mortalidade \pm DP larval de 1º instar de *Plutella xylostella* em condições de semicampo da planta inteira tratadas com emulsão hexânica de *Annona squamosa* (EHAS) ao longo do tempo, Rio Largo-AL

Tratamentos	Dias após aplicação (Mortalidade %)										
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Testemunha	2 \pm 4,2 cA	1 \pm 3,2 cA	1 \pm 3,1 cA	2 \pm 4,2 cA	1 \pm 3,2 cA	2 \pm 4,2 cA	2 \pm 4,2 cA	2 \pm 4,2 cA	2 \pm 4,2 cA	2 \pm 4,2 cA	1 \pm 3,2 cA
CL ₅₀	52 \pm 5,2 bA	52 \pm 7,9 bA	50 \pm 6,7 bA	47 \pm 8,2 bA	44 \pm 9,7 bAB	43 \pm 6,7 bAB	34 \pm 5,2 bBC	25 \pm 7,1 bC	13 \pm 4,3 bD	7 \pm 8,2 bDE	2 \pm 4,2 bE
CL ₉₉	84 \pm 7,9 aBC	89 \pm 8,8 aABC	84 \pm 10,7 aBC	82 \pm 10,3 bC	94 \pm 5,2 aAB	96 \pm 6,9 aA	92 \pm 7,9 aAB	88 \pm 12,3 aABC	57 \pm 6,7 aD	31 \pm 7,4 aE	14 \pm 6,9 aF
Azamax®	92 \pm 8,7 aA	97 \pm 4,8 aA	93 \pm 8,2 aA	96 \pm 5,1 aA	96 \pm 6,9 aA	95 \pm 5,3 aA	89 \pm 8,7 aA	93 \pm 8,2 aA	59 \pm 11,0 aB	35 \pm 7,1 aC	11 \pm 7,4 aD
CV (%)	15,16										

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

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

Fonte: Autor, 2018

Trindade et al. (2011) concluíram que o extrato etanólico de *A. muricata* na concentração de 5 mg.mL⁻¹ causou 100% de mortalidade em lagartas de *P. xylostella*, quando expostas por até 12 dias.

O potencial inseticida da EHAS apresentou efeito residual tóxico, tanto em condições da folha destacada (76,09 e 73,27%) e na planta inteira (73,73 e 77,82%), com resultados semelhantes ao Azamax[®], respectivamente.

O formulado inseticida comercial Azamax[®] possui adjuvante que confere estabilidade da molécula sintética no concentrado emulsionável e proteção aos fatores abióticos, tais, a temperatura, umidade, raios ultravioleta, pH entre outros. Fato constatado para o formulado emulsionável O/A do extrato hexânico de *A. squamosa*, cujos adjuvantes promoveram a estabilidade e durabilidade do potencial inseticida com persistência até o 22º dia e efeito residual médio para ambas as condições avaliadas de 74,91% para a CL₉₉.

Para Oliveira et al., (2007) o emprego de substâncias extraídas de plantas com poder inseticida apresenta algumas vantagens quando comparada aos sintéticos: são renováveis, facilmente degradáveis, não contaminam o meio ambiente e de baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores. Importante, ressaltar que ora a vantagem da degradação rápida dos extratos botânicos na proteção dos sistemas de produção, incidindo diretamente no período de carência, pode ser um entrave, pois, a persistência do princípio ativo sofrerá com a variabilidade dos fatores bióticos (principalmente relacionados aos fatores climáticos).

O formulado emulsionável hexânico de *A. squamosa* alcançou o objetivo da toxicidade, estabilidade e persistência da ação sobre *P. xylostella*, podendo ser utilizado como tática de controle botânico para o inseto-alvo, inserindo-se ao manejo integrado de insetos nos sistemas de produção das brássicas. Cabe destacar que a parte da planta protegida, da família Brassicaceae, através da tecnologia de aplicação de agrotóxico, são as folhagens e flores, parte então colhida e comercializada pelos produtores rurais, necessitar-se-á de tempo de carência de pelo menos 25 dias.

339 Avaliação da atividade inseticida de frações da partição líquido-líquido de *Annona squamosa* sobre *Plutella xylostella*

As frações acetato de etila (FACT) e hexano (FH) de *A. squamosa* apresentaram atividade inseticida na CL₃₅ (0,27 µL mL⁻¹) sobre lagartas neonatas de *P. xylostella*, com mortalidade de 62,5 e 67,5%, respectivamente (Tabela 12).

Os constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário (alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos e ACGs) conferem a planta ação inseticidas. Essas substâncias detêm diferentes graus de polaridade, sendo solúveis em diferentes solventes, o que explica a diferença de concentração de compostos ativos e, conseqüentemente, de atividade. Provavelmente, os biativos das ACGs estão presentes em maior concentração na FH e menor presença na FACT.

Tabela 12 - Média \pm DP da mortalidade de lagartas neontas de *Plutella xylostella*, submetidas a CL₃₅ tratados com as frações da partição líquido-líquido de *Annona squamosa*, Rio Largo-AL

Tratamentos	Mortalidade (%) \pm (DP)
Testemunha	2,50 \pm 4,63 b
Fração acetato de etila	31,25 \pm 9,91 a
Fração hexano	32,50 \pm 8,86 a
CV% **	36,81

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

*DP= Desvio padrão; **CV%= Coeficiente de variação.

Fonte: Autor, 2018

3.3.10 Identificação de acetogeninas (ACG) de *Annona squamosa*

A presença de ACGs na espécie *A. squamosa* é relatada por diversos estudos (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990; FANG et al., 1993; BERMEJO et al., 2005; YANG et al., 2009; CHAMPY, 2011; CHEN et al., 2013).

As frações FACT e FH obtidas do particionamento do extrato hexânico (EH) obtido das sementes de *A. squamosa* foram submetidas a análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês: high performance liquid chromatography, HPLC). Os cromatogramas obtidos sugerem a presença de ACGs. Evidencia-se que na fração acetato de etila (FACT) estão constituídas possivelmente por vários tipos de ACGs (Tabela 13).

Tabela 13: Análise cromatográfica por CLAE da fração acetato de etila de sementes de *Annona squamosa*, comprimento de onda (205 nm)

Pico	T _R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 205 nm			Classe de composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	3,75	17,42	194	225	262	Acetogeninas
2	4,08	2,19	194	227	262	Acetogeninas
3	4,87	1,61	196	236	357	Acetogeninas
4	7,79	3,53	196	257	347	Acetogeninas
5	10,78	3,48	194	249	390	Acetogeninas
6	14,62	2,92	199	223	267	Acetogeninas
7	26,89	25,59	198	224	357	Acetogeninas
8	27,25	7,22	194	238	357	Acetogeninas
9	28,89	9,57	194	219	243	Acetogeninas
Total		73,53				

¹T_R – (tempo de retenção)

Fonte: Autor, 2018

Na figura 2 a identificação preliminar de ACG foi realizada analisando absorvância máximos UV para cada banda cromatográfica presente nos cromatogramas obtidos, na faixa de comprimento de onda 205 nm, onde a composição acetonitrila (ACN) e água Mili-Q (85:15, v/v) se trata da fase móvel eficaz na separação de compostos no tempo de retenção (TR) entre 3 - 5 min. e 25 – 30 min., fato constatado por Lima (2007).

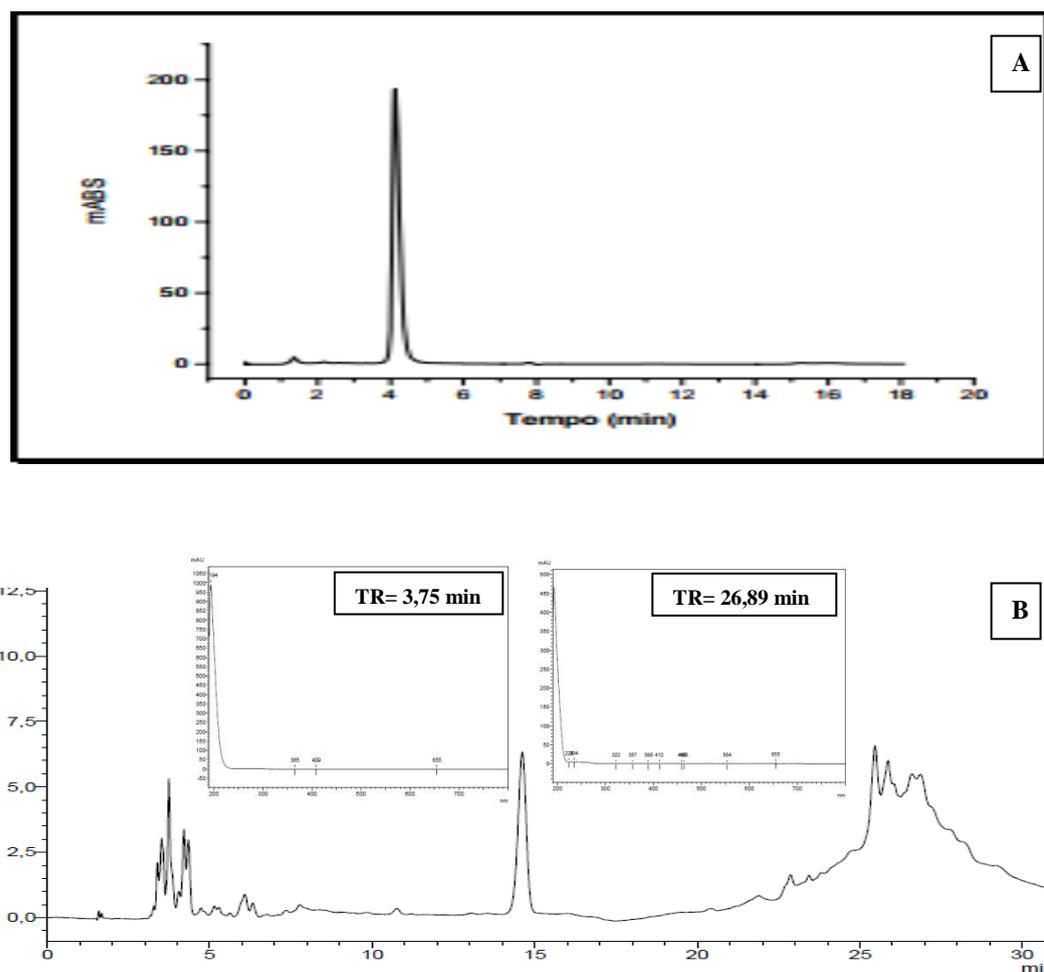
De acordo com a tabela 14, foram identificados 9 bandas cromatográficas com concentração de área (%) variável, totalizando 73,53% de áreas prováveis de ACGs, indicando que durante a partição líquido-líquido realizada não houve perdas consideráveis, mantendo-as presente na FACT.

Os compostos que eluam no CLAE analítico no TR entre 3 e 5 min., para a espécie de *A. squamosa*, apresentaram condições de isolamento para ACGs (Figura 2A), fato comprovado por Lima (2007) para a mesma espécie botânica. Na figura 2B, no cromatograma a absorvância máxima UV para cada banda cromatográfica, se evidencia a presença de possíveis ACGs na FACT, com destaque as que eluam nos tempos de retenção máxima 3,75 e 26,89 min., com comprimento de onda 194, 225, 262 e 198, 224, 357 (λ = nm), concentração de área 17,42 e 26,89 (%), respectivamente.

Figura 2 - Perfis cromatográficos e espectros de UV no extrato das sementes de *Annona squamosa*, composto isolado ASS2A [Condições de análise: C₁₈ THERMOHypersil® (5 µm; 4,6 x 150 mm), fase móvel ACN/H₂O, fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, λ= 205 nm, adaptado Lima, (2007)] (A); fração acetato de etila, λ= 205 nm (B), presença de esquamocina

Condição: Coluna Jupiter C₁₈, (5 µm; 4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 25°C (A)

Fase móvel: t=0, 7 e 14 min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ, t=23 min: 100% acetonitrila, t= 30 e 31min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ (A)



Fonte: Autor, 2018.

Na tabela 14 evidencia-se que na fração hexano (FH) estudada estão constituídas por possíveis classes de composto ACGs.

De acordo com a tabela 14, foram identificados 6 bandas cromatográficas com concentração de área (%) variável, totalizando 63,94% de áreas prováveis de ACGs presente na FH. Lima (2007) constatou no TR 3 a 5 min. possíveis ACGs nas condições estudadas (Figura 2A), como no presente estudo, foi observado na absorvância máxima UV para cada

banda possíveis ACGs nos tempos de retenção máxima (TR) destacado 4,36 e 14,55 min., com comprimento de onda 194, 227, 254 e 198, 232, 262 ($\lambda = \text{nm}$), concentração de área 24,39 e 10,62 (%), respectivamente (Figura 3).

Tabela 14 - Análise cromatográfica por CLAE da fração hexano de sementes de *Annona squamosa*, comprimento de onda (280nm)

Pico	T_R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 280 nm			Classe de composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	3,53	5,84	194	227	254	Acetogeninas
2	3,64	7,43	195	236	254	Acetogeninas
3	4,06	4,98	194	225	255	Acetogeninas
4	4,36	24,39	201	231	275	Acetogeninas
5	4,60	10,68	195	246	274	Acetogeninas
6	14,55	10,62	198	232	262	Acetogeninas
Total		63,94				

¹ T_R – (tempo de retenção)

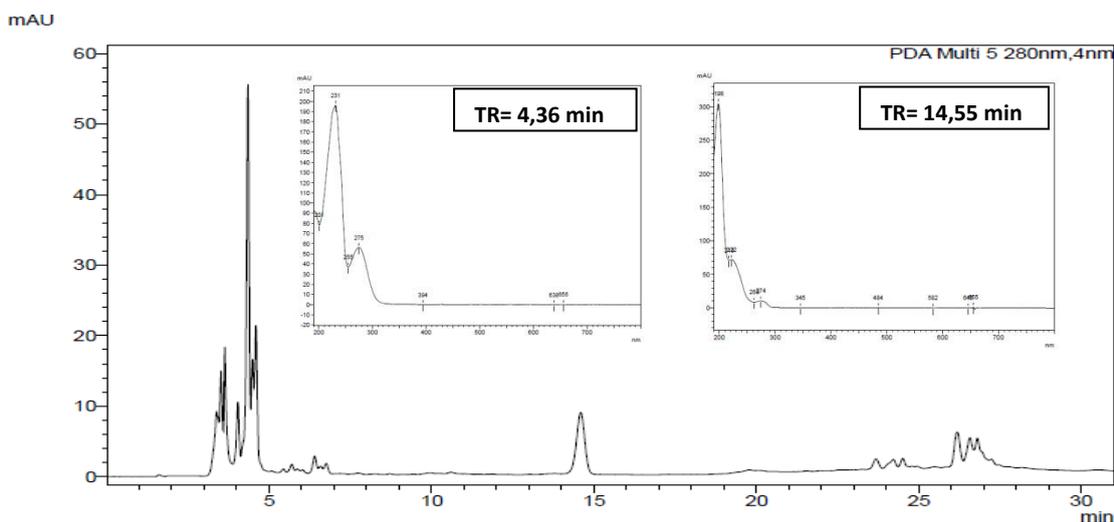
Fonte: Autor, 2018.

Lima (2007) identificou a esquamocina A ou anonina I, uma ACG bis-THF, através do espectro de massa do composto ASS3, marcador da banda para o extrato em etanol das sementes de *A. squamosa*, provavelmente essa mesma ACG está presente nas FACT e FH no atual estudo, com atividade bioinseticida sobre *P. xylostella*, como apresentado em ensaios acima.

Figura 3 - Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das sementes de *Annona squamosa*, fração hexano, $\lambda= 280$ nm

Condição: Coluna Jupiter C₁₈, (5 μ m; 4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 25°C

Fase móvel: t=0, 7 e 14 min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ, t=23 min: 100% acetonitrila, t= 30 e 31min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ



Fonte: Autor, 2018

A presença de possível ACG em sementes da *A.squamosa* evidenciou atividade inseticida para *P. xylostella*, sendo a classe de composto com constituinte bioativo potencial sobre o inseto-praga, indicando ser considerada promissora no MIP.

3.4 CONCLUSÕES

Das cinco amostras testadas da emulsão do extrato hexânico de *A. squomosa* apenas a emulsão 5 mostrou estabilidade e apropriada ao longo dos testes de curta e longa duração para ser utilizada como produto inseticida;

A CL_{99} da EHAS na concentração de $212,52 \mu\text{L.mL}^{-1}$ apresenta efeito ovicida e repelente para oviposição;

A CL_{50} $2,76 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e CL_{99} $212,52 \mu\text{L.mL}^{-1}$ da EHAS apresentam eficiência no estágio larval do 1º instar, porém, diminuem a toxicidade nos demais instares;

A persistência da toxicidade do EHAS em condição de semicampo com folha destacada é de até 18 e 16 dias para CL_{50} e CL_{99} , respectivamente;

A persistência da toxicidade do EHAS em condição de semicampo na planta inteira é de 16 dias para CL_{50} e CL_{99} ;

As partições da FACT e FH foram tóxicas a *P. xylostella*;

Através das análises por CLAE-DAD se evidencia a presença de acetogeninas na EHAS por meio da concentração da área (%) e do comprimento de onda (λ).

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação geral de agrotóxicos e afins/DFIA/DAS. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br>, acesso em 09 de junho 2017.
- ANSANTE, T. F. et al. Secondary metabolites from neotropical Annonaceae: Screening, bioquidated fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v.74, p.969-975, 2015.
- ARAÚJO JÚNIOR, J. M.; MARQUES, E. J.; OLIVEIRA, J. V. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e de óleo de nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae), **Neotropical Entomology**, v.38, n.4, p.520-525, 2009.
- ÁLVAREZ, O. et al. Toxic effects annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal Pesticide Science**, v.81, p.85-89, 2007.
- ÁLVAREZ-COLOM, O. et al. Insecticidal, mutagenic and genotoxic evaluation of annonaceous acetogenins. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 3, p. 391-394, 2010.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, n.3, p.504-540, 1999.
- BACCI, L.; PICANÇO, M. C.; GUSMÃO, M. R.; BARRETO, R. W.; GALVAN, T. L. Inseticidas seletivos à tesourinha Doru luteipes (Scudder) utilizados no controle do pulgão verde em brássicas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 174-179, 2002.
- BAJPAI, A.K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. **Reactive and Functional Polymer**, v. 53, p. 125-141, 2002
- BENICHOU, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysacchande complexes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.294, n.1-3, p.20-32, 2007.
- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**. v.22, n.2, p.269-303, 2005.
- BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L., Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**. v.34, 125–155, 2009.
- BRAGA SOBRINHO, R. Potencial de exploração de annonaceas no Nordeste do Brasil. EMBRAPA Agroindústria Tropical. XII Agroflores – 17ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria. 2010.

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

BLISS, C.I. The method of probits. **Science**, Washington, v.79, p.38-39, 1934.

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

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

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A.G. Inseticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p.75-79, 1997.

COSTA, E.V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v.16, p.9714-9720, 2011.

COSTA, J.R.V. et al. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, v.39, n.5, p.757-766, 2010.

CORREIA, A.A. et al. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 83-91, 2009.

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

CHAMPY, P. Acetogenins from the seeds of the custard apple (*Annona squamosa* L.) and their health outcomes. In V.R. Preedy; R.R. Watson & V.B. Patel (Eds). Nuts and seeds in health and disease prevention. **Elsevier**, p.429-437, 2011.

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

CHEN, Y. et al. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**, v.58, p.394-400, 2013.

CHEN, A. C.; MAYER, R.T. Insecticides: effects on the cuticle. *Insect Phys. Bioch. Pharm.* v.12, p.57-77.1985.

DEQUECH, S. T. B. et al. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 551-554, 2009.

DEGLI ESPOSTI, M. et al. Natural substances (acetogenins) from the Family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). **Biochemical Journal**, v.301, p.161-167, 1994.

DONADIO, L.C.; DURIGAN, J.F. Biribá. In: Fruits of tropical and subtropical origin. Flórida, p.127-130, 1992.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system, versão 5.6. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliça. 3.ed., Viçosa:UFV, 421p., 2008.

FUKUTO, T. R.; N. M. MALLIPUDI. Suppression of metabolic resistance through chemical structure modification, p. 557-578. In: G. P. Georghiou & T. Saito (ed.). Pest resistance to pesticides: challenges and prospects. Plenum Press, New York, United States of America. 1983.

GALLARDO, T. et al. Semisynthesis of antitumoral acetogenins: SAR of functionalized alkyl-chain bis-tetrahydrofuranic acetogenins, specific inhibitors of mitochondrial complex I. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, n.25, p4793-4800, 2000.

GARRIDO, L.R. et al., Sistema de produção 3. Disponível em: <<http://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/pessego;pessegodememesaregiaosrragaucha;defensi.html>>. Acesso em: 11 jul. 2017.

GOMES, I. B. et al. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. **Ciência Rural**, v.46, n.5, p.771-775, 2016.

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

HEINZ, C.A., ZANGERL, A.R., BERENBAUM, M.R.. Effects of natural and synthetic neuroactive substances on the growth and feeding of cabbage looper. *Trichoplusia ni*. Entomol. **Exp. Appl.** v.80, p.441-451, 1996.

IRAC-APRD – Arthropod pesticide resistance database. Disponível em: <www.pesticideresistence.org>. Acesso em: 30 out.2017.

IRAC – Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas. Disponível em: <www.irac-br.org>. Acesso em: 12 dez. 2016.

IQBAL, S. et al. Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. **Food Research International**, v.54, p. 1613-1620, 2013.

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

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

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

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tribiraca limbiventris* (Hemiptera, Pentatomidae). V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae. v.36, edição especial, p.217-224, 2014.

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

KUSARI, S.; VERMA, V. C. E.; LAMSHOEFT, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces Azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1287-1294, 2012.

KODJO, T. A.; et al. Bio-insecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinius communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions, **Journal of Applied Biosciences**, v.43, p.2899-2914, 2011.

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

LEATEMIA J. A.; ISMAN M. B. Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp. (Annonaceae), *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* (Meliaceae) against lepidopteran larvae. **Phytoparasitica** v.32, p.32–37,2004b.

LEATEMIA J.A.; ISMAN M.B. Efficacy of crude seed extracts of *Annona squamosa* against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. in the greenhouse. *Int J Pest Manag* v.50, p.129–133, 2004c.

LACHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RIMA, 519p., 2000.

LIMA, M. D. Perfil cromatográfico dos extratos brutos de sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, 102 p., 2007.

LIMA, C.G. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.89, n.3, p.239-245, 2008.

MACHADO, L.A.; SILVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Instituto Biológico**, v.69, n.2, p.103-106, 2007.

MARTINEZ, S.S. (Ed.). **O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 142p., 2002.

MORATÓ, M. G. Plagas y enfermedad en el cultivo de coliflor. Descripción e control. **Vida Rural**, v. 8, n. 107, p. 1-5, 2000.

NANSEN C. et al. Behavioral Avoidance - Will Physiological Insecticide Resistance Level of Insect Strains Affect Their Oviposition and Movement Responses? **PLoS ONE** v.11, n.3: e0149994. doi:10.1371/journal.pone.0149994, 2016.

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

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

OLIVEIRA, M.S.S. et al. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agroecologia**, v.31, n.2, p.326-331, 2007.

PARIHAR, A.M.; UNDIRWADE, D.B.; WADASKAR, R.M. Studies on persistence of biorationals against diamondback moth, *Plutella xylostella* L. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.5, n.3, p.686-689, 2017.

PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; ROBLEDO, A. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. **Ind. Crops Prod.**, v.8, n.3, p.183-194, 1998.

PIPITHSANGCHAN, S. et al. Effects of extracts from thiem seeds on diamondback moth (*Plutella xylostella* Linn.). Songklanakarin. **Journal Science Technologic**, v.26, p.221-232, 2004.

PEMULEN, Introducing pemulen polymeric emulsifiers. Technical Literature. September, Cleveland, 1999.

POTTER, C. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. **Annals Applied Biology**, v. 38, n.1, p.1-12, 1952.

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

REIS, P. R. et al. Seletividade de agroquímicos ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 265-274, 1998.

RIBEIRO, L.P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.55, p.6-14, 2013.

RIDLAND, P.M.; ENDERSBY, N.M. Some australian populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) show reduced susceptibility to fipronil. The Sixth International Workshop on Management of the Diamondback Moth and Other Crucifer Insect Pests. p.21-25, 2011.

RIOS, M.Y., CASTREJUN, F., ROBLEDO, N., LEÓN, I., ROJAS, G., NAVARRO, V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cheromola* (Annonaceae). **Journal Mex. Chemical. Soc.** V. 47, p.134-14, 2003.

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

SAS® Statistical Analysis System, version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000.

SAMAVATI, V. et al. Stability and rheology of dispersions containing polysaccharide, oleic acid and whey protein isolate. **Journal of Texture Studies**, 2011.

SEFFRIN, R.C. et al. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, v.29, n.1, p.20-24, 2010.

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

SELJASEN, R.; MEADOW, R. Effects of nem on oviposition and egg and larval development of *Mamestra brassicae* L.: Dose response, residual activity, repellent effect and systemic activity in cabbage plants, **Crop Protection**, v.25, p.338-345, 2006.

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

SILVA, E.J. et al. Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection**, v. 35, p.97-101. 2012

SCHMIDT, T. et al. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.338, n.1, p.184-192, 2009.

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

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

TAÍZ, L. ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p., 2009.

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

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advance Colloid Interface Science**, v.108, p.109-227, 2004.

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

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

TORMO, R.J. et al. Specific Interaction of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Chemico- Biological Interactions**: v.122, p.171-183, 1999.

TRINDADE, R.C.P. et al. Toxicity of soursop extracts to diamondback moth. **Bioscience Journal**, v.34, n.1, p.104-111, 2018.

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

TRINDADE, R.C.P. et al. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyriformis* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1813-1816, 2008.

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

THULER, R. T., BORTOLI, S. A., HOFFMANN-CAMPO, C. B. Classificação de cultivares de brássicas com relação à resistência à traça-das-crucíferas e à presença de glucosinolatos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, p. 467-474, 2007.

VANICHPAKORN, P.; DING, W.; CEN, XIAO-XI. Insecticidal activity of five Chinese medicinal plants against *Plutella xylostella* L. larvae, **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.13, p.169-173, 2010.

VILLAS BÔAS, G.L. et al. Inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas e impactos sobre a população natural de parasitóides. **Horticulture Brasileira**, v.22, n.4, p.696-699, 2004.

WANG, X.; WU, Y. High levels of resistance to chlorantraniliprole evolved in field populations of *Plutella xylostella*. **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.3, p.1019-1023, 2012.

WILLER, H.; KILCHER, L. The world of organic agriculture: statistics and emerging trends. Bonn:IFOAM, v.12, 2009.

YADAV N.; KUMAR A.; YADAV R.; YADAV R.; KUMAR M. Persistence of different neem based pesticides against diamondback moth, *Plutella xylostella* Linn. **International Journal of Plant Protection**. v.2, n.1, p.17-19, 2009.

YANG, H. et al. New nonadjacent bis-THF ring acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v.80, p.177-181, 2009.

ZALUCKI M. Y.; SHABBIR A.; SILVA R.; ADAMSON D.; LIU SHU-SHENG L.; FURLONG M. J. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.4, p.1115–1129, 2012.

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

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

4 ESTUDO FITOQUÍMICO E EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Annona mucosa* Jack. (Annonaceae) NO CONTROLE DE *Plutella xylostella* (L.,1758) (Lepidoptera: Plutellidae)

RESUMO

O manejo de insetos-praga com a utilização de métodos de controle alternativos, especificamente os extratos vegetais, vem sendo estudado. Desta maneira, buscou-se pesquisar o potencial inseticida da família Annonaceae como tática de controle alternativo para o manejo integrado da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). O estudo teve por objetivo avaliar o extrato etanólico de *A. mucosa* Jacq (Annonaceae), estimar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₉) e avaliar a atividade inseticida na capacidade de oviposição, nos estádios larvais, persistência do extrato em condição de semicampo e realizar a prospecção dos constituintes químicos. A estimativa da CL₅₀ e CL₉₉ foi determinada através da fórmula de Bliss (1934) realizada por análise Probit. Para *A. mucosa* a CL₅₀ e CL₉₉ do extrato etanólico de *A. mucosa* (EEAM) estimadas foram de 51,64 e 616,2 µL.mL⁻¹, respectivamente; a CL₉₉ do EEAM apresenta efeito ovicida, repelente para oviposição e eficiência no estágio larval do 1º instar; CL₅₀ do EEAM apresenta efeito ovicida e eficiência no estágio larval do 1º instar; a persistência da toxicidade do EEAM apresenta efeito residual de até 8 e 12 dias para CL₉₉ e CL₅₀, respectivamente, em condição de semicampo com folha destacada e com planta inteira é de até 6 e 12 dias para CL₉₉ e CL₅₀, respectivamente; as partições das FHAL, FACT e FCLF foram as mais tóxicas sobre *P. xylostella*; através das análises por CLAE-DAD se evidencia a presença de acetogeninas e alcalóides, constatado por meio da concentração da área (%) e do comprimento de onda (λ) e presença de flavonóides orientina e rutina. Concluiu que a espécie de *A. mucosa* apresentam ação inseticida para o controle de *P. xylostella*.

Palavras-chave: Biribá. Traça-das-crucíferas. Formulação fitossanitária. Extrato botânico. Flavonóides. Acetogeninas.

ABSTRACT

The management of insect pests with the use of alternative control methods, specifically the vegetal extracts, has been studied. The objective of this research was to investigate the insecticidal potential of the Annonaceae family as an alternative control tactic for the integrated management of the diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). The objective of this study was to evaluate the ethanolic extract of *A. mucosa* Jacq (Annonaceae), to estimate the lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₉) and to evaluate the insecticidal activity in the oviposition capacity, in the larval stages, the persistence of the extract in semi-field and prospecting of chemical constituents. The estimation of LC₅₀ and LC₉₉ was determined using the Bliss formula (1934) performed by Probit analysis. For *A. mucosa* the LC₅₀ and LC₉₉ of the ethanolic extract of *A. mucosa* (EEAM) estimated were 51.64 and 616.2 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; the eeg LC₉₉ shows ovicidal, oviposition repellent and efficiency effects in the 1st instar larval stage; eeg LC₅₀ has ovicidal effect and efficiency in the 1st instar larval stage; the persistence of EEA toxicity shows residual effect of up to 8 and 12 days for LC₉₉ and LC₅₀, respectively, in semi-field condition with detached leaf and with whole plant is of up to 6 and 12 days for LC₉₉ and LC₅₀, respectively; the FHAL, FACT and FCLF partitions were the most toxic on *P. xylostella*; through the analysis by CLAE-DAD, the possibility of acetogenins and alkaloids, is evidenced by the concentration of the area (%) and the wavelength (λ) and the presence of flavonoids orientin and rutin. It was concluded that species of *A. mucosa* present insecticidal action for the control of *P. xylostella*.

Keywords: Biribá. Diamondback. Phytosanitary formulation. Botanical extract. Flavonoids. Acetogenins.

4.1 Introdução

Os extratos botânicos podem ser alternativa interessante especialmente para sistemas orgânicos e agroecológicos, um mercado com potencial exponencial. O manejo de insetos-praga com a utilização de métodos de controle alternativos, especificamente os extratos vegetais, vem sendo estudado para minimizar o impacto do uso do inseticida químico sintético (MAZZONETTO; CORBANI; DALRI, 2013). A detecção de novas fontes de compostos inseticidas a partir da flora de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento constitui, ainda, uma das principais lacunas a serem preenchidas (ANSANTE et al., 2015).

A família botânica Annonaceae compreende um grande número de gêneros e espécies, a maioria nativa das regiões tropicais e subtropicais, constituída por cerca de 140 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (CHATROU et al., 2004; BRAGA SOBRINHO, 2010), tendo já sido registrados no Brasil 29 gêneros, o que compreende cerca de 388 espécies (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2014).

As acetogeninas (ACGs) são compostos extremamente bioativos das anonáceas, únicos desta família, descritas mais de 450, todas com estruturas diversificadas, que atuam como inibidor do transporte de elétrons mitocondriais e afetam a ação da NADH-ubiquinona oxidoreductase (ÁLVAREZ et al., 2008), porém, estudos atribuem a ação bioinseticida aos terpenos (COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2012) e aos alcalóides (KABIR, 2010). Souza et al. (2017) e Ansante et al. (2015) utilizaram diferentes técnicas cromatográficas no isolamento da ACG bis-THF rolliniastatina-1, identificado como o composto primário mais ativo das frações *A. mucosa*.

Pesquisas de diferentes partes da planta da espécie *A. mucosa* destacam potencial fitoquímico para o controle de insetos de importância agrícola e médica, dentre-as *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae) (COSTA et al. 2013; 2016; 2017), *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) (ANSANTE et al., 2015; RIBEIRO; ANSANTE; VENDRAMIM, 2016), *Sitophilus zeamais* Mots, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) (RIBEIRO et al., 2013; 2016), *Trichoplusia ni* Hüb, 1803 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Myzus persicae* Sulzer, 1776 (Hemiptera: Aphididae) (RIBEIRO et al, 2014), *Tibraca limbativentris* Stal. (Hemiptera: Pentatomidae) (KRINSKI; MASSAROLI, 2014), *Euschistus heros* Fabr. (Hemiptera: Pentatomidae) (TURCHEN et al., 2016) e *Panonychus citri* McGregor, 1916 (Acari: Tetranychidae), (RIBEIRO et al., 2014).

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) é considerado a principal espécie-praga da família brassicaceae e o seu ataque pode ser fator limitante das áreas de cultivos no mundo (ZALUCKI et al., 2012), associado ao desequilíbrio biológico causado pelo uso excessivo do controle químico. Dependendo da região pode totalizar até 20 pulverizações, com até 4 aplicações semanais de acordo com a época de produção da cultura (VILLAS BÔAS et al., 2004). As perdas econômicas ocasionadas por *P. xylostella* podem chegar a 1 bilhão de dólares por ano (IRAC, 2016).

Tendo em vista a importância do cultivo de brássicas e uso de extratos botânicos dentro do manejo integrado de pragas (MIP) e manejo ecológico de pragas (MEP), esta pesquisa teve por objetivo estimar as concentrações letais do extrato etanólico de folhas de *A. mucosa*, avaliar o efeito inseticida nas diferentes fases da praga, como efeito ovicida, preferência de oviposição e instares larvais, assim como, analisar a persistência do extrato em condições de semicampo, com folhas destacadas e planta inteira, além do estudo fitoquímico.

4.2 Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório Entomologia: Controle Alternativo de Pragas (LECAP), no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais (LPqRN) e em casa-de-vegetação do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em Rio Largo e Maceió, AL, Brasil, respectivamente.

4.2.1 Condução da cultura

As mudas de couve manteiga da variedade Geórgia (*B. oleracea* var. *acephala*) foram adquiridas da estufa SEMEAR[®], em Arapiraca-AL, posteriormente transplantadas para local definitivo, adotados as recomendações de adubação, nutrição vegetal e tratamentos culturais conforme Filgueira (2008), exceto adubação química e o controle químico para as plantas espontâneas e insetos-praga. Folhas de couve foram utilizadas para os experimentos a partir de 40 após o transplante.

4.2.2 Criação de *Plutella xylostella*

A criação e multiplicação de *P. xylostella* foi realizada no LECAP, sob condições de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h, segundo Torres et al. (2006).

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

Lagartas neonatas, oriundas de posturas realizadas nos discos de couve, foram transferidas para recipientes plásticos (20 cm de comprimento x 10 cm de largura x 5 cm de altura) contendo folhas de couve. As folhas foram substituídas diariamente até as lagartas atingirem a fase de pupa. As pupas foram transferidas para tubos de vidro de fundo chato (8,5 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro), fechados com filme plástico transparente. Pequenos furos foram realizados no filme plástico para que houvesse as trocas gasosas. Após 72 horas, emergiam os adultos, que foram transferidos para as gaiolas iniciando o ciclo.

4.2.3 Obtenção das folhas e preparo de extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM)

As folhas de *A. mucosa* foram coletadas em dezembro de 2015, na estação da primavera, obtidas do banco de germoplasma do CECA/UFAL, acondicionadas em sacos de papel Kraft, secas em estufa com circulação de ar a 50°C por 48 horas, moídas em moinho tipo Wiley até obter a granulometria de pó fino (malha 2,5 mm) e acondicionado em recipiente de vidro hermeticamente fechado.

O preparo do extrato bruto foi realizado no LECAP, onde 2,2 kg do pó das folhas de *A. mucosa* foi submetido à extração a frio com etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), à temperatura ambiente ($25\text{-}27^\circ\text{C}$), em percolador de aço inoxidável. Foram utilizados 6,0 L de etanol em 2,2 kg de pó, três ciclos por intervalos de 24 horas a cada coleta do solvente. O solvente foi removido por destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 50°C , com rendimento de 167 gramas de peso líquido, acondicionado em recipiente hermeticamente fechado e etiquetado.

4.2.4 Estimativa das concentrações letais do extrato etanólico da folha de *Annona mucosa* (EEAM) sobre *Plutella xylostella*

Foram realizados pré-testes de atividade inseticida com o EEAM de *A. mucosa* em diferentes concentrações para determinar valores próximos do Limite Superior (LS) e Limite Inferior (LI) dos extratos e observar qual seria mais viável.

Determinados os limites da EEAM, foram estimadas seis concentrações através da fórmula de Bliss (1934), $q=(a_n/a_1)^{1/n+1}$, onde q = razão da progressão geométrica (PG); n = número de concentrações a extrapolar; a_n e a_1 = limites superior e inferior, respectivamente, da pg (concentrações que provocam mortalidade de cerca de 95% e semelhante à testemunha, respectivamente determinadas através de testes preliminares).

As soluções do EEAM foram solubilizadas em água destilada (ADE + Tween 1%), avaliadas as seguintes concentrações: 0,062; 0,098; 0,155; 0,244; 0,385 e 0,606%, correspondentes à sequência a_1 , $a_1.q$, $a_1.q^2$, $a_1.q^3$, $a_1.q^4$ e $a_1.q^5$, de acordo com a fórmula Bliss (1934).

Foram confeccionados discos foliares de couve com 8 cm de diâmetro, que foram pulverizados com a solução dos EEAM em diferentes concentrações, utilizando-se torre de Potter System[®] (POTTER, 1952). A aplicação foi realizada a uma pressão de 5 psi/pol² utilizando-se um volume de calda de 1,7 mL, o que corresponde a um depósito de $1,9 \pm 0,37$ mg.cm⁻². Esta quantidade aplicada está de acordo com o recomendado pela IOBC/WPRS (International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section) e representa o que ocorre no campo (REIS et al., 1998).

Os discos tratados com os extratos foram distribuídos sobre uma superfície coberta com papel toalha, onde permaneceram ao ar livre para evaporação do excesso de água. Lagartas neonatas foram colocadas em placas de Petri, contendo um disco tratado sobre papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, mantidos em laboratório (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h). Após três dias da montagem do bioensaio avaliou-se a mortalidade larval.

O experimento de toxicidade do EEAM foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto por sete tratamentos, sendo seis (concentrações) mais a testemunha e cinco repetições, cada repetição com dez lagartas neonatas. Para estimativa das

concentrações letais, CL_{50} e CL_{99} , foi utilizado Probit Procedure do software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2000).

4.2.5 Efeito da CL_{50} do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) na fase embrionária de *Plutella xylostella*

Para o bioensaio da fase embrionária, dois casais da traça-das-crucíferas com até 12 h de idade emergida foram selecionados para a oviposição e colocados em gaiolas plásticas. Foram colocados discos de folha de couve com 8 cm diâmetro nas gaiolas e após 24 horas de exposição aos adultos, foram retirados e, de acordo com a metodologia de Torres et al. (2006), cortou-se os discos para que ficassem com 20 ovos em cada repetição, seguidamente foram pulverizados utilizando-se torre de Potter System[®] (POTTER, 1952), de acordo com os tratamentos, testemunha ADE + Tween (1,0%), CL_{50} e CL_{99} da EEAM, Azamax 1.2 CE[®], Decis 25 CE[®] (concentração recomendada para cada produto comercial) (AGROFIT, 2017).

Foram 5 tratamentos e 10 repetições, cada repetição com 20 ovos, em DIC. No 5º dia após a aplicação dos tratamentos, realizou-se a contagem do número de lagartas eclodidas em cada repetição, para a determinação da viabilidade de ovos. Utilizou-se nas avaliações uma lupa estereoscópica de 10x. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições.

Para os experimentos fase embrionária de *Plutella xylostella* a análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

4.2.6 Efeito do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) na preferência de oviposição em *Plutella xylostella*

Para os testes com chance de escolha para avaliação da preferência de oviposição de fêmeas adultas de *P. xylostella*, discos de folhas de couve variedade Geórgia com 8 cm de diâmetro foram pulverizados na torre de Potter System[®] (POTTER, 1952), com a solução testemunha ADE + Tween (1,5%), CL_{50} e CL_{99} do EEAM, Azamax 1.2 CE[®] (200ml 100L⁻¹ água), Decis 25 CE[®] (30ml.100L⁻¹ água) (AGROFIT, 2017), e postos sobre papel toalha para secagem ao ar livre; em seguida, divididos em partes, obtendo-se quatro círculos menores (3 cm de diâmetro) com dimensões semelhantes.

Foi formado um conjunto, constituído por cinco discos dispostos equidistantes sobre pote com esponja umedecida com ADE colocada em gaiola (14 x 11 x 5 cm). Três casais de *P. xylostella* emergidos com até 12 horas de idade, provenientes da criação, foram introduzidos em cada gaiola e mantidos por 24 horas para oviposição sendo alimentados com solução açucarada a 10%, embebida em esponja presa na parte superior da gaiola, após retirados os discos foram registrados.

A deterrência à oviposição foi calculada com a seguinte fórmula (PASCUAL-VILLALOBOS; ROBLEDO, 1998), e o efeito do extrato etanólico foi dado na percentagem da incubação de ovos estimado:

$$\text{Deterrência a oviposição} = \left[1 - \frac{NEt}{NEc} \right] \times 100$$

Onde *NEt* é o número de ovos no tratamento e *NEc* é o número de ovos no controle.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco gaiola-repetição. Para o experimento de preferência de oviposição de *Plutella xylostella*, a análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

4.2.7 Efeito do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) em diferentes estádios larvais de *Plutella xylostella*

Os discos foliares de couve com 8 cm de diâmetro confeccionados, foram pulverizados de acordo com cada tratamento: testemunha ADE + Tween (1,0%); Azamax 1.2 CE[®]; Decis 25 CE[®] (concentração recomendada para cada produto comercial) (AGROFIT, 2017); concentrações subletais e letais CL₅₀ e CL₉₉ do EEAM, utilizando a torre de Potter System[®] (POTTER, 1952) e oferecidos para alimentação das lagartas de *P. xylostella* no 1º, 2º, 3º e 4º instar. No terceiro dia após o experimento, avaliou-se a mortalidade larval.

O delineamento estatístico foi DIC, em esquema fatorial (4 x 4 + 1), 10 repetições, cada repetição com 10 lagartas. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

4.2.8 Avaliar a persistência do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) sobre *Plutella xylostella* da folha destacada e planta inteira em condição de semicampo

Para avaliar a persistência do EEAM com as concentrações subletais e letais, CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente, testemunda ADE + Tween (1,5%) e Azamax[®] grupos de 10 plantas contendo em média 4 folhas, foram pulverizadas no mesmo dia, na face adaxial e abaxial, com os diferentes tratamentos e acondicionadas em casa-de-vegetação até o final dos bioensaios.

No primeiro experimento as folhas das plantas foram destacadas levadas ao laboratório, cortadas em discos de 8cm de diâmetro e oferecidas as 10 lagartas neonatas em placas de Petri acondicionadas em laboratório/repetição. No segundo experimento, as lagartas foram inoculadas nas folhas da planta inteira, sem serem destacadas, cobertas com um tecido “voil” branco para evitar a fuga das lagartas, permanecendo em casa-de-vegetação. Os intervalos de avaliação do efeito residual da EEAM foram de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias, sendo o tempo zero as plantas pulverizadas no mesmo dia.

Para ambos os bioensaios o delineamento estatístico foi DIC, em esquema fatorial (4 x 22), 10 repetições, cada repetição com 10 lagartas. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

4.2.9 Estudo fitoquímico de extratos de *Annona mucosa*

4.2.9.1 Partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico de *Annona mucosa*

O extrato bruto etanólico de *A. mucosa* (270,0 g) foi suspenso em metanol e extraído com hexano (4 x 400 mL). Depois com a porção metanólica foi acrescida de água até obtenção de uma mistura metanol: água (1:1; v/v). A solução foi particionada à temperatura ambiente (25-27°C), sucessivamente, com acetato de etila (4 x 400 mL), clorofórmio (4 x 400 mL) e etanol (4 x 400 mL), obtendo-se assim, respectivamente, as frações em acetato de etila (FACT) (86,17 g), clorofórmio (FCLF) (53,06 g) hexano (77,75 g) (FH) e hidroalcoólico (FHALC) (5,66 g), após remoção dos solventes em rotaevaporador, à pressão reduzida, até a secura e a massa do resíduo foi determinada.

4.2.9.2 Bioensaios para testar as frações da partição líquido-líquido de *Annona mucosa*

As frações obtidas foram testadas em lagartas recém-eclodidas de *P. xylostella* seguindo mesmo procedimento experimental do item 4.2.4.

O delineamento estatístico utilizado para os testes inseticidas com as frações foi o inteiramente casualizado contendo 8 repetições. A análise foi feita por comparação de médias pelo teste de Tukey utilizando o SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

4.2.9.3 Fracionamento da partição biotiva do extrato bruto etanólico de *Annona mucosa*

Mediante os resultados obtidos no bioensaio inseticida anterior, as FACT, FCLF, FH e FHALC ativas da partição líquido-líquido de *A. mucosa* foram solubilizadas em seus respectivos solventes e submetidas ao cromatografo líquido de alta eficiência (CLAE).

As frações foram acondicionado em Beckers, com 250 mg FACT + 25 mL de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (P.A.) sucessivamente, e levadas ao ultrassom para solubilizar. Nas FACT e FCLF foram adicionadas 10 mL de água Mili-Q, posteriormente adicionado 40 mL de acetato de etila (P.A.) em cada fração e posto em funil de separação; na FACT foi adicionada 10 mL de água Mili-Q e levado à centrifugação por 10 min (2500 rpm; temp. 1°C), posteriormente foi retirado uma alíquota para CLAE; na FCLF foi adicionada 25 mL de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (P.A.) e 20 mL de água Mili-Q, posteriormente filtrado e retirado uma alíquota para CLAE; para as FH e FHALC foram adicionadas 25 mL de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (P.A.), colocado em ultrassom e posteriormente foram retirados uma alíquota.

4.2.9.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As corridas cromatográficas analíticas foram realizadas com solventes ultrapuros grau CLAE. Na fase móvel foi utilizada água Mili-Q, obtida em equipamento MILLIPORE Simplicity UV[®] e álcool (70%). As amostras injetadas no cromatógrafo líquido foram previamente filtradas em filtro seringa, com membrana de nylon 0,45 μm x 47 mm com sistema SUPELCO, próprio para filtração de solventes.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu[®] (Tokyo, Japão), constituído de 2 bombas de alta pressão, modelo LC-20ADXR[®], autoinjeter modelo SIL-20AXR[®], detector UV-DAD modelo SPDM-20A[®]; forno para coluna modelo CTO-20A, que

armazenou uma coluna cromatográfica C18, da Phenomenex, modelo Júpiter e um processador de comunicação modelo CBM-20A.

Todas as frações, antes de injetadas no cromatógrafo, foram filtradas em filtro de seringa MILLIPORE® Millex – HV 0,45 µm PVDF (Polifluoreto de vinilideno). As quatro frações analisadas foram FACT, FCLF, FH e FHALC.

4.2.9.5 Identificação de acetogeninas (ACG) de *Annona mucosa*

Visando detectar a presença de ACG, a FACT, FCLF, FH e FHALC obtidas das folhas de *A. mucosa* foram submetidos a análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Como fase móvel, foi utilizado acetonitrila (A) e água MiliQ (B), sendo que as condições da eluição estão descritas na Tabela 1. A coluna utilizada foi a C18 (5µm, 4,6 x 250 mm), marca Phenomenex®, modelo Júpiter detecção no UV em λ 205, 215, 231 e 289 nm, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura de 35°C.

Tabela 1 - Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos para acetogeninas por CLAE-DAD das frações obtido da *Annona mucosa*

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Acetonitrila (A) (%)	Água MiliQ (B) (%)
0	1,0	85	15
14	1,0	85	15
23	1,0	100	0
30	1,0	85	15
31	1,0	85	15

Fonte: Autor, 2018

4.2.9.6 Identificação de flavonoides de *Annona mucosa*

Visando detectar a presença de flavonoides, as FACT, FCLF, FH e FHALC obtidas das folhas de *A. mucosa* foram submetidos à análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Tabela 2). Como fase móvel, foi utilizado acetonitrila (B) e água MiliQ (A), sendo que as condições da eluição

estão descritas na Tabela 2. A coluna utilizada foi a C18 (5 μ m, 4,6 x 250 mm), marca Jupiter[®], detecção no UV em λ 205, 215, 231, 244, 255, 347 e 354 nm, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e temperatura de 35°C.

Tabela 2 - Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos para flavonoides por CLAE-DAD das frações obtido da *Annona mucosa*

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Acetonitrila (B) (%)	Água MiliQ (A) (%)
0	1,0	3	97
2	1,0	3	97
4	1,0	6	94
6	1,0	9	91
8	1,0	12	88
10	1,0	15	85
12	1,0	18	82
14	1,0	21	79
16	1,0	30	70
20	1,0	30	70
23	1,0	60	40
30	1,0	60	40
33	1,0	75	25
35	1,0	75	25
37,5	1,0	3	97
40	1,0	3	97

Fonte: Autor, 2018.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Estimativa das concentrações letais do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) no controle de *Plutella xylostella*

O EEAM apresentou toxicidade a *P. xylostella*, pois se ajustou ao modelo de Probit com o valor de $P = 0,68$. A CL_{50} e CL_{99} estimada foi de 51,6 e 616,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Concentrações letais (CL_{50} e CL_{99}) do extrato etanólico da folha de *Annona mucosa* sobre lagartas neonatas de *Plutella xylostella*, Rio Largo-AL

Tratamento	n ¹	GL ²	Inclinação ±EP	CL ₅₀ ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) (IC 95%) ³	CL ₉₉ ($\mu\text{L.mL}^{-1}$) (IC 95%) ³	X ² ⁴	P ⁵
Extrato Etanólico	300	5	2,16 ± 0,26	51,64 (42,12 – 61,24)	616,2 (392,64 – 1,261)	2,30	0,68

EP: Erro-padrão; CL: Concentração letal.

¹ Número de lagartas utilizadas no teste..

² Grau de liberdade do qui-quadrado.

³ Intervalo de confiança.

⁴ Significância >0,05

Fonte: Autor, 2018

As formulações inseticidas a partir dos extratos vegetais das espécies das famílias Apocinaceae, Annonaceae, Anacardiaceae, Meliaceae, Mimosaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Piperaceae, Chenopodiaceae apresentam potencial no controle de traça-das-crucíferas *P. xylostella* L. (MEDEIROS; BOIÇA JÚNIOR; TORRES, 2005; BOIÇA JUNIOR et al., 2005; COVARRUBIAS et al., 2015; GOMES et al., 2016; TRINDADE et al., 2018). Essa ação inseticida é explicada pela presença de metabólitos secundários, que são compostos cuja função está relacionada com a defesa química das plantas contra herbivoria.

Ansante et al. (2015) avaliaram extratos etanólicos de diferentes espécies de anonáceas por screening sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e concluíram que o extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* foi o mais ativo, causando toxicidade aguda ($CL_{50} = 842,9 \text{ mg.kg}^{-1} = 8,429\%$). Além disso, extrato etanólico *A. mucosa* (CL_{90}) mostrou eficácia semelhante aos inseticidas comerciais, Azamax[®] 1.2 CE e Premio[®] 20 SC[®], que foram testadas na concentração registrada para *S. frugiperda*. O resultado da presente pesquisa mostra que a CL_{50} foi de 51,6 (0,00516%) para *P. xylostella*, assim, verifica-se que a concentração estimada apresenta alta toxicidade em baixa concentração, mesmo os insetos-praga estudados sendo da mesma ordem Lepidoptera, porém, de espécies diferentes

(ANSANTE et al., 2015). Ressalta-se a especificidade em determinar a ação tóxica da espécie botânica para cada espécie de inseto-praga estudado. Nota-se também que os metabólitos secundários desses dois estudos estão distribuídos em diferentes partes da *A. mucosa*, demonstrando o potencial da espécie da família Annonaceae para o controle de artrópodes, como destacado por Bermejo et al. (2005).

Pesquisas anteriores, da atividade larvicida de extratos de plantas para o controle da traça-das-crucíferas e outros insetos-praga de importância social e econômica foram investigados, citam-se os de Ferreira (2016) estimou as CL_{50} (40 mg.mL^{-1}) e CL_{99} (50 mg.mL^{-1}) do extrato etanólico de sementes de *A. mucosa* sobre lagartas de 1º instar de *P. xylostella*; Turchen et al. (2016) avaliaram várias concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80 mg.mL^{-1} do extrato de folhas e sementes de *A. mucosa* sobre ninfas de 3º instar de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae), quais concluíram que o extrato etanólico de sementes possui bioatividade com ação ninficida a depender da concentração, ao passo, que o extrato etanólico de folhas não possui atividade contra ninfas de *E. heros*. Krinski; Massaroli (2014) determinaram que o extrato de sementes de *A. mucosa* apresentou toxicidade sobre *Tibraca limbativentris* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae).

Diante do resultado de toxicidade do extrato etanólico da folha de *A. mucosa* sobre *P. xylostella*, procedeu-se a continuidade nos bioensaios para variáveis biológicas em testes laboratoriais, de semicampo e prospecção dos constituintes químicos.

4.3.1.1 Efeito ovicida do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) sobre *Plutella xylostella*

Na Tabela 4 são apresentados os dados da ação ovicida onde é analisada a viabilidade dos ovos de *P. xylostella* para o efeito do EEAM. O resultado mostra diferença significativa a 5% de probabilidade para os tratamentos no bioensaio ($F=147,96$; $p<0,005$).

Quanto à viabilidade dos ovos, foi observado o número de lagartas eclodidas da fase embrionária que o extrato etanólico CL_{99} proporcionou o menor número de eclosão (34%) diferindo dos tratamentos CL_{50} (51%), Azamax® (54%), Decis 25 CE® (96%) e testemunha (98%), visto não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre a CL_{50} (51%) e Azamax® (54%), sendo que apenas o tratamento Decis 25 CE® (96%) não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) da testemunha, que apresentou (98%) de lagartas eclodidas (Tabela 4).

Tabela 4: Viabilidade dos ovos (Média ± DP) de *Plutella xylostella* tratados com extrato etanólico da folha de *Annona mucosa*, Rio Largo-AL

Tratamentos	Viabilidade dos ovos (%)*
CL ₉₉	34,0 ± 8,4 a
CL ₅₀ ***	51,0 ± 11,9 b
Azamax 1.2 CE®	54,0 ± 6,4 b
Decis 25 CE®	96,0 ± 4,7 c
Testemunha	98,0 ± 2,4 c
CV%**	11,27

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

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

Fonte: Autor, 2018

A ação do extrato etanólico de folhas de *A. mucosa* conseguiu interferir no ciclo biológico do inseto-alvo, fase embrionária, mais eficientemente que o inseticida químico e orgânico de marca comercial registrado (AGROFIT, 2017). A explicação da ação ovicida do estudo corrobora-se com o estudo de Torres et al. (2006) que através de observações microscópicas, verificaram microporos com 0,8 µm, responsáveis pelas trocas gasosas do embrião, o que pode explicar a ação ovicida dos extratos nas concentrações *A. indica* (0,06% m/v), *M. azedarach* (12,5% m/v) e *A. pryrifolium* (7% m/v) e da morte dos embriões de *P. xylostella* impedindo sua eclosão. Os orifícios foram encontrados em número de três, localizados em uma das extremidades do ovo de *P. xylostella*. Pode-se observar ainda que o córion possui uma textura rugosa, podendo ser favorável à fixação ou retenção dos extratos vegetais, o que mantém os extratos mais aderidos à superfície do ovo.

O efeito ovicida pode variar de acordo com a espécie do inseto e com as características das substâncias utilizadas, pois algumas plantas que apresentam atividade inseticida ocasionam baixo ou nenhum efeito ovicida (MACHADO; SILVA; OLIVEIRA, 2007), como os extratos aquosos (10% p/v) de *C. ambrosioides*, *C. citriodora*, *C. leucanthemum* e *A. indica* que não apresentaram ação ovicida sobre *S. frugiperda* (MAZZONETTO; CORBANI; DALRI, 2013). A inviabilidade da fase embrionária da ação ovicida do EEAM correlaciona-se com o aumento da concentração do extrato bruto, reduzindo significativamente a possibilidade de chegarem à fase adulta, haja vista, o poder bioinseticida na concentração letal de 66% nesta fase.

4.3.1.2 Efeito do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) sobre a preferência à oviposição de *Plutella xylostella*

Na Tabela 5 são apresentados os dados da preferência de oviposição de *P. xylostella* onde é analisado o efeito do EEAM. O resultado mostra diferença significativa a 5% de probabilidade para os tratamentos no bioensaio ($F=2,79$; $p<0,005$). Os tratamentos CL₉₉, CL₅₀, Decis 25 CE[®] e Azamax 1.2 CE[®] interferiram na escolha de folhas de couve tratadas para oviposição de *P. xylostella*, como consequência proporcionaram menor oviposição, 54,3 (52,72%), 84,9 (82,43%), 82,8 (80,39%) e 66,3 (64,37%) ovos, respectivamente, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da testemunha. Os resultados evidenciam a ação de fitoquímicos para as CL₅₀ e CL₉₉ do EEAM para repelência a postura de *P. xylostella*.

Tabela 5 - Número de ovos (Média \pm DP) da preferência da oviposição de *Plutella xylostella* tratados com extrato etanólico da folha de *Annona mucosa*, Rio Largo-AL

Tratamentos	Número de ovos
CL ₉₉	54,3 \pm 6,2 a
CL ₅₀ ***	84,9 \pm 6,2 ab
Azamax 1.2 CE [®]	82,8 \pm 7,2 ab
Decis 25 CE [®]	66,3 \pm 7,9 ab
Testemunha	103,0 \pm 5,7 b
CV% **	9,16

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

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

Fonte: Autor, 2018.

Kodjo et al. (2011) detectaram que fêmeas adultas da traça-das-crucíferas fazem claramente distinção entre plantas pulverizadas com a emulsão de *R. communis* e com água para preferência a oviposição. Kusari et al. (2012) destaca que os produtos de origem vegetal com ação repelente a oviposição produzem estimulações específicas nos quimiorreceptores gustativos dos indivíduos expostos, desencadeando interferência na percepção fagoestimulante de outros quimiorreceptores também presentes na região periférica do aparelho bucal. Desta forma a CL₉₉ do EEAM na concentração (616,2 μ L.mL⁻¹) apresentou

efeito para repelência de 52,72% menos ovos quando comparado à testemunha, efeito estratégico no controle do ciclo biológico de *P. xylostella*.

Outros estudos destacaram o efeito de diferentes extratos botânicos sobre a preferência a oviposição de insetos-praga, quais as pesquisas de Ribeiro et al. (2015) constataram que o extrato etanólico da semente de *A. mucosa* (224,92 mg. L⁻¹) reduziu significativamente o número de ovos de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Jesus et al. (2011) avaliaram a não-preferência para oviposição de *P. xylostella* em discos de couve tratados com os extratos *A. indica*, *S. saponaria*, Nim+Piretro+Rotenona, *D. mollis* e *S. adstringens*, na concentração de 10%, onde todos os extratos proporcionaram efeito deterrente na oviposição quando comparado a testemunha e consequentemente redução na oviposição. Abbasipour et al. (2010) estudaram ação deterrente do extrato etanólico de sementes de *Peganum harmala* L. para postura de *P. xylostella* e constataram 93% de redução na concentração de 40 mg.mL⁻¹. Dequech et al. (2009) mostraram efeito deterrente de pelo menos 50% para oviposição de *P. xylostella* quando as folhas foram tratadas com extratos aquosos à 10% com pó-de-fumo, cinamomo e DalNeem[®] quando comparado a testemunha. Torres et al. (2006) obtiveram repelência superior para oviposição de *P. xylostella* 62,7 e 76,3% para as CL₅₀ (2,17%) e CL_{letal}, respectivamente, para o extrato aquoso da casca de *A. pyrifolium*. Charleston et al. (2005) avaliaram extrato de cinamomo e nim sobre a escolha de oviposição de *P. xylostella*, no qual o extrato de cinamomo diferiu da testemunha com 75% de deterrência.

A evasão comportamental para oviposição de *P. xylostella* para o extrato EEAM apresenta-se eficaz, demonstrando potencial inseticida. Corroborando com estudos de Kodjo et al. (2011), Kusari et al (2012) e Nansen et al (2016), pode-se inferir que o menor número de ovos colocados por *P. xylostella* nas superfícies tratada com o EEAM tenha sido decorrente da ação repelente dos compostos voláteis ou ocasionado pela irritabilidade das fêmeas em contato com as superfícies tratadas por ocasião da oviposição. O efeito repelente se acentua com a quantidade de substâncias bioativas concentradas de acordo com as concentrações letais determinadas.

4.3.1.3 Efeito do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) em diferentes estádios larvais de *Plutella xylostella*

O experimento que avaliou a atividade bioinseticida do extrato EEAM sobre diferentes estádios larvais de *P. xylostella* diferiu estatisticamente para os fatores tratamentos

($F=1359,26$; $p < 0,05$), instares ($F=120,82$; $p < 0,05$) e interação tratamentos e instares ($F=20,80$; $p < 0,05$) (Tabela 6).

No 1º e 4º instar a CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] não diferiu ($p > 0,05$), ao passo que ambos, diferem ($p < 0,05$) no 2º e 3º instar. A CL₉₉ e o Azamax 1.2 CE[®] diferem ($p < 0,05$) da marca comercial Decis 25 CE[®] e da CL₅₀, nos estádios larvais avaliados. A CL₅₀ diferiu ($p < 0,05$) do inseticida químico Decis 25 CE[®], no 1º e 2º instar, não diferindo ($p > 0,05$) no 3º e 4º instar.

A CL₉₉ apresentou maior bioatividade média, com mortalidade média de 80,0%, seguidamente do Azamax 1.2 CE[®] 74,0%, CL₅₀ 35,75% e Decis 25 CE[®] 28,75% em condições de laboratório para os diferentes instares. O inseticida químico sintético Decis 25 CE[®] quando comparado aos demais tratamentos, ou seja, apresentou baixa eficiência na presente pesquisa. Thuler; Bortoli; Barbosa (2007) quando avaliaram a toxicidade de diferentes inseticidas químicos e produtos vegetais, dentre-os a deltametrina (Decis 25 CE[®]) não ultrapasou 22% de mortalidade para nenhuma das concentrações testadas. Atualmente são 862 casos registrados em todo mundo de resistência a inseticida a *P. xylostella*, abrangendo 95 ingredientes ativos, sendo 14 casos no Brasil, no qual a deltametrina está inserida dentre os princípios ativos (IRAC-APRD, 2017). No Brasil, Castelo Branco; Gatehouse (1997), registrou resistência a diferentes grupos químicos, piretroides, organofosforados e *B. thuringiensis* para a traça das crucíferas. Já Oliveira et al. (2011) e Silva et al. (2012) observaram resistência de *P. xylostella* para os grupos químicos oxadiazinas, benzoilureias e piretroides, nos Estados de Pernambuco e Espírito Santo, Brasil.

Tabela 6 - Média \pm DP de diferentes ínstaes de lagartas *Plutella xylostella* depositados em folhas de couve tratadas com extrato etanólico das folhas de *Annona mucosa* (EEAM), Rio Largo-AL

Tratamentos	Mortalidade (%)			
	1º Instar	2º Instar	3º Instar	4º Instar
Testemunha	2,0 \pm 4,0 dA	1,0 \pm 3,4 eA	2,0 \pm 4,0 dA	2,0 \pm 4,0 cA
CL ₉₉	97,0 \pm 4,6 aA	86,0 \pm 4,8 aB	72,0 \pm 6,0 aC	65,0 \pm 5,0 aD
CL ₅₀	50,0 \pm 6,3 bA	38,0 \pm 4,0 cB	25,0 \pm 5,0 cC	30,0 \pm 6,3 bC
Decis 25 CE®	31,0 \pm 7,0 cA	28,0 \pm 7,5 dA	28,0 \pm 6,3 cA	28,0 \pm 4,0 bA
Azamax 1.2 CE®	98,0 \pm 4,0 aA	77,0 \pm 6,4 bA	60,0 \pm 6,0 bB	61,0 \pm 5,4 aB
CV %	12,74%			

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

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

Fonte: Autor, 2018

A CL₉₉ apresentou redução no efeito inseticida à medida que o inseto passou do 1º estágio larval, para os seguintes estádios (2º, 3º e 4º ínstaes), ao passo que, Azamax 1.2 CE® e CL₅₀ não há redução do efeito no 3º e 4º instar. Para Decis 25 CE® não há diferença significativa para os diferentes estádios larvais.

Picanço et al. (1997) e por Bacci et al. (2002), realizaram estudos, os quais verificaram que, quanto maior o volume corporal, maior é a área específica e, uma maior exposição aos inseticidas (YU, 1988) e consequentemente uma rápida metabolização do inseticida por enzimas, e mais eficaz contra inseticidas prontamente degradáveis (CHEN; MAYER, 1985). Segundo Fukuto; Mallipudi (1983) o mecanismo de detoxificação permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente para prevenir a ação no sítio-alvo, essa degradação poderá ocorrer por vários processos metabólitos, nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto.

4.3.1.4 Efeito residual do extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) sobre *Plutella xylostella* em condições de semicampo com da folha destacada e planta inteira

O experimento de persistência do EEAM diferiu estatisticamente para os fatores tratamentos (F=369,71; p < 0,05) e interação tratamentos e tempo (F=12,89; p < 0,05) na

condição semicampo com folha destacada (Tabela 7). Para o fator tempo os tratamentos CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] não diferiram entre si ($p > 0,05$), exceto no 6º e 10º dia; CL₉₉ e CL₅₀ não diferiram entre si ($p > 0,05$) após o 10º dia, ao passo que, Azamax 1.2 CE[®] e CL₅₀ não diferiram entre si ($p > 0,05$) no 12º dia.

Quando analisado a ação inseticida ao longo do tempo, a CL₉₉ não diferiu entre si ($p > 0,05$) até o 6º dia, porém, diferiu ($p < 0,05$) a partir do 8º dia com diminuição da bioatividade, com mortalidade de 24,3% no 16º dia; Azamax 1.2 CE[®] não diferiu entre si ($p > 0,05$) até 10º dia, com mortalidade média de 75,68%, ao passo, que atividade inseticida foi sendo reduzida com o passar dos dias, com mortalidade de 32,9% no 16º dia; CL₅₀ não diferiu entre si ($p > 0,05$) até o 14º dia, com diminuição da ação, apresentando mortalidade 14,3% no 16º dia.

Na tabela 8 é analisada a persistência do EEAM, qual diferiu estatisticamente para os fatores tratamentos ($F=662,16$; $p < 0,05$) e interação tratamentos e tempo ($F=13,67$; $p < 0,05$) na condição semicampo com planta inteira. Para o fator tempo os tratamentos diferem da testemunha durante todo o período; os tratamentos CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] não diferem entre si ($p > 0,05$) até o 8º dia, com 85,5 e 83,25% de efeito tóxico, respectivamente, mas diferem da CL₅₀ ($p < 0,05$) no mesmo período, ao passo que, CL₅₀ e Azamax 1.2 CE[®] não diferem entre si ($p > 0,05$) para o 10º, 12º, 14º e 16º dias; já CL₉₉ e CL₅₀ diferem ($p < 0,05$) ao longo dos dias.

Quando analisado o efeito do tratamento ao longo dos dias, foi verificado para a CL₅₀ não diferiu entre si ($p > 0,05$) até o 12º dia, porém, diferiu ($p < 0,05$) para o 14º dia com diminuição da bioatividade, acentuando até o 16º dia, com mortalidade de 14%; a CL₉₉ não diferiu entre si ($p > 0,05$) até o 6º dia, porém, diferiu ($p < 0,05$) a partir do 8º dia com diminuição da bioatividade, apresentando mortalidade de 33% no 16º dia; Azamax 1.2 CE[®] não diferiu entre si ($p > 0,05$) até 8º dia, ao passo, que atividade inseticida foi sendo reduzida com o passar dos dias, com mortalidade de 30% no 16º dia. A atividade de persistência média para o período avaliado para CL₅₀, CL₉₉ e Azamax 1.2 CE[®] foram de 40,5%, 69,63% e 60,88% de mortalidade sobre *P. xylostella* (Tabela 8).

Estudo de Yadav et al. (2009) concluíram que o formulado comercial NeemAzal[®] apresentou máxima mortalidade larval até o 10º dia e posteriormente e o controle continuou com redução da atividade bioinseticida para larvas de 3º instar de *P. xylostella*. Trindade et al. (2011) concluíram que o extrato etanólico de *A. muricata* na concentração de 5 mg.mL⁻¹ causou 100% de mortalidade em lagartas de *P. xylostella*, quando expostas por até 12 dias. O

potencial inseticida da EEAM apresentou efeito residual tóxico, tanto em condições da folha destacada (58,21 e 61,41%) e na planta inteira (69,63 e 60,88%), com resultados semelhantes ao Azamax[®], respectivamente, todos com durabilidade do potencial inseticida persistindo até o 16º da avaliação, apresentando efeito tóxico para CL₉₉ e Azamax[®], em semicampo com folha destacada (24,3; 32,9%) e planta inteira (33,0; 30,0%), respectivos. Supondo-se que se o EEAM tivesse sido formulado por uma tecnologia de preparo que protegesse dos fatores abióticos, tais, a temperatura, umidade, raios ultravioleta, pH entre outros, poderia ter o seu potencial de durabilidade prolongado, podendo apresentar superioridade quando comparados com os inseticidas formulados acima.

O emprego de substâncias extraídas de plantas com poder inseticida apresenta algumas vantagens quando comparada aos sintéticos: são renováveis, facilmente degradáveis, não contaminam o meio ambiente, de baixo custo, tornando-se acessível aos pequenos produtores. Importante, ressaltar que ora a vantagem da degradação rápida dos extratos botânicos na proteção dos sistemas de produção, incidindo diretamente no período de carência, pode ser um entrave, pois, a persistência do princípio ativo sofrerá com a variabilidade dos fatores bióticos (principalmente relacionados aos fatores climáticos) (OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, é significativa a persistência do EEAM, com ação tóxica, estabilidade e persistência sobre *P. xylostella*, podendo ser utilizado como tática de controle botânico para o inseto-praga, inserindo-se ao manejo integrado de insetos nos sistemas de produção das brassicas.

Tabela 7 - Mortalidade \pm DP larval de 1º instar de *Plutella xylostella* em condições de semicampo com folha destacada tratadas com extrato etanólico de *Annona mucosa* (EEAM) ao longo do tempo, Rio Largo-AL

Tratamentos	Dias após aplicação (Mortalidade %)							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Testemunha	1,4 \pm 3,8 cA	2,9 \pm 4,9 cA	2,9 \pm 4,9 dA	1,4 \pm 3,8 cA	2,9 \pm 4,9 cA	1,4 \pm 3,7 bA	1,4 \pm 3,7 cA	1,4 \pm 3,7 cA
CL ₅₀	64,3 \pm 13,9 bA	51,4 \pm 13,5 bAB	44,3 \pm 13,9 cBC	30,0 \pm 0 bcDE	41,4 \pm 17,7 bBC	35,7 \pm 5,3 aBCD	20,0 \pm 5,7 bDE	14,3 \pm 5,3 bcE
CL ₉₉	97,1 \pm 4,8 aA	98,6 \pm 3,8 aA	92,8 \pm 3,8 aA	48,7 \pm 8,9 aB	40,0 \pm 5,7 bBC	37,1 \pm 4,8 aBC	27,1 \pm 7,4 abC	24,3 \pm 5,3 abC
Azamax1,2CE®	84,3 \pm 7,9 aA	84,2 \pm 19,8 aA	75,7 \pm 19,8 bAB	60,0 \pm 10 aBC	74,2 \pm 32,0 aAB	42,9 \pm 4,8 aCD	37,1 \pm 4,8 aD	32,9 \pm 7,5 aD
CV (%)	26,7							

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

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

Fonte: Autor, 2018

Tabela 8 - Mortalidade \pm DP larval de 1º instar de *Plutella xylostella* em condições de semicampo da planta inteira tratadas com extrato etanól *Annona mucosa* (EEAM) ao longo do tempo, Rio Largo-AL

Tratamentos	Dias após aplicação (Mortalidade %)							
	2	4	6	8	10	12	14	16
Testemunha	0,0 \pm 0 cA	0,0 \pm 0 cA	0,0 \pm 0 cA	0,0 \pm 0 cA	3,0 \pm 4,8 cA	1,0 \pm 3,7 cA	1,0 \pm 3,8 cA	1,0 \pm 3,8 cA
CL ₅₀	50,0 \pm 5,7 bA	47,0 \pm 4,9 bA	48,0 \pm 6,9 bA	48,0 \pm 8,9 bA	53,0 \pm 7,7 bA	40,0 \pm 8,2 bA	24,0 \pm 5,3 bB	14,0 \pm 5,3 bB
CL ₉₉	90,0 \pm 8,1 aA	94,0 \pm 7,9 aA	87,0 \pm 12,5 aA	71,0 \pm 17,7 aB	71,0 \pm 14,6 aB	60,0 \pm 10 aBC	51,0 \pm 8,9 aC	33,0 \pm 7,6 aD
Azamax [®]	80,0 \pm 5,7 aA	91,0 \pm 10,9 aA	84,0 \pm 15,1 aA	78,0 \pm 12,1 aA	50,0 \pm 18,3 bB	41,0 \pm 10,7 bBC	33,0 \pm 7,6 bC	30,0 \pm 5,8 aC
CV (%)	20,69							

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

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

Fonte: Autor, 2018

4.3.2 Avaliação da atividade inseticida de frações da partição líquido-líquido de *Annona mucosa* sobre *Plutella xylostella*

As frações acetato de etila (FACT), hexano (FH), clorofórmio (FCLF) e hidroalcoólico (FHAL) de *A. mucosa* apresentaram atividade inseticida na CL₃₅ (34,08 µL mL⁻¹) sobre lagartas neonatas de *P. xylostella*, com mortalidade de 68,75, 85,0, 66,25 e 66,25%, respectivamente, com destaque da FH com maior biatividade, seguidas das FACT, FCLF e FHAL (Tabela 9). Nota-se que ao utilizar uma concentração letal menor, a porcentagem de mortalidade de lagartas neonatas correspondeu significativamente.

Tabela 9 - Média ± DP da mortalidade de lagartas neontas de *Plutella xylostella*, submetidas a CL₃₃ tratados com as frações da partição líquido-líquido de *Annona mucosa*, Rio Largo-AL

Tratamentos	Mortalidade (%) ±(DP)
Testemunha	1,25 ± 3,53 c
Fração acetato de etila	15,00 ± 6,41 b
Fração hexano	31,25 ± 7,56 a
Fração clorofórmio	33,75 ± 5,17 a
Fração hidroalcoólico	33,75 ± 5,17 a
CV% **	28,86

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

*DP= Desvio padrão; **CV%= Coeficiente de variação,

Fonte: Autor, 2018.

4.3.2.1 Identificação de acetogeninas (ACG) de *Annona mucosa*

A presença de ACGs na espécie *A. mucosa* foi constatado por diversos estudos (ANSANTE et al., 2015; COSTA et al., 2013; 2016; 2017; RIBEIRO et al., 2013; 2014a,b; SOUZA et al., 2017).

Segundo Aslan et al. (2006), as frações hexano e clorofórmio apresentam compostos com baixa polaridade e em algumas espécies vegetais a maior concentração de compostos com atividade inseticida encontra-se principalmente nas frações de menor polaridade. Dentre os solventes orgânicos, as ACGs são mais solúveis em clorofórmio e diclorometano (ZENG et al., 1996). Esses solventes são utilizados a partir do pressuposto que as ACGs podem variar

de muito polar, tal como aqueles extraídos pela água, álcool etílico e metanol a não polares como os extraídos pelo hexano (BOBADILLA et al., 2005; COSTA et al., 2013; FERREIRA, 2016).

As frações FHAL, FACT e FCLF obtidas do particionamento do extrato etanólico (EE) obtido das folhas de *A. mucosa* foram submetidas a análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês: high performance liquid chromatography, HPLC). Os cromatogramas obtidos sugerem a presença de ACGs. Evidencia-se que na FHAL estudada estão presentes por possíveis classes de composto ACGs (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise cromatográfica por CLAE da fração hidroalcoólico de folhas de *A. mucosa*, comprimento de onda (205nm)

Pico	T _R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 205 nm			Classe de Composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	1,97	0,47	195	271	347	Acetogenina
2	3,13	95,12	202	266	349	Acetogenina
3	3,52	1,21	205	272	312	Acetogenina
4	5,39	2,16	204	264	338	Acetogenina
Total		98,96				

¹T_R – (tempo de retenção)

Fonte: Autor, 2018

A identificação preliminar de ACG foi realizada analisando absorvância máximos UV para cada área de pico presente nos cromatogramas obtidos, na faixa de comprimento de onda 205 nm (Figura 1).

Na tabela 10, foram identificados 4 bandas cromatográficas com concentração de área (%) variável para cada pico, totalizando 98,96% de áreas prováveis de ACGs, qual indica que durante a partição líquido-líquido realizada não houve perdas consideráveis, mantendo-as presente na FHAL.

Costa et al., (2016) e Ferreira (2016) identificaram a esquamocina C₃₇H₆₆O₇ por espectroscopia LC-RMN e UV-RMN de sementes de *A. mucosa*, com ação inseticida para *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *P. xylostella*, respectivamente. No estudo (Figura 1), foi constatado na abosrvância máxima UV presença de possíveis ACGs na FHAL da folha de *A. mucosa*, com destaque a possível ACG no tempo de retenção máxima (TR) 3,13 min., com maior intensidade. Apresentou um espectro de UV com comprimento de onda (λ) 202, 266 e 349 nm na concentração de área de 95,12 %.

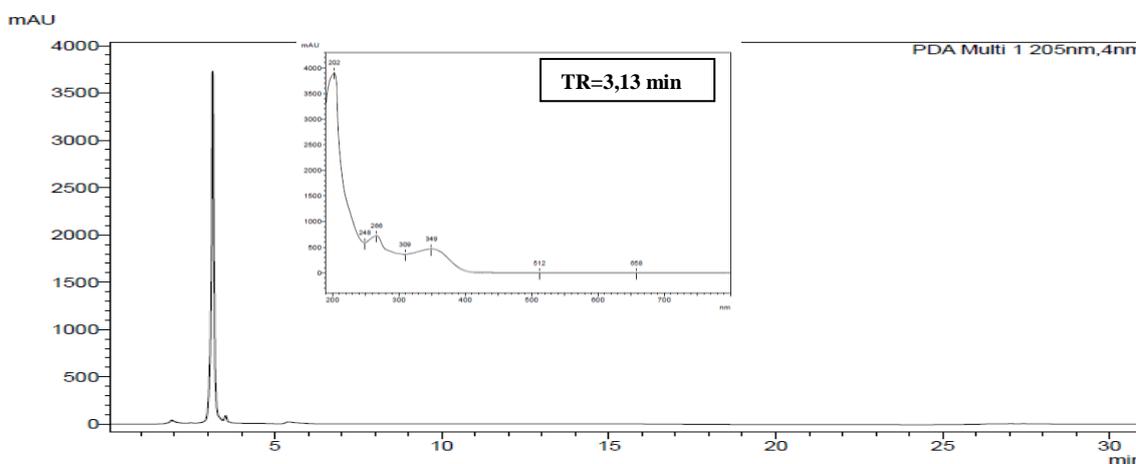
Em CLAE-DAD os compostos polares eluem mais rapidamente que as moléculas com caráter mediantemente polar ou pouco polar. Portanto, seria esperado que as possíveis ACGs no método usado saíssem na fase móvel no TR de 3 à 14 min (Figura 1).

De acordo com Miyoshi et al. (1998) e Costa et al. (2016) a ação tóxica da esquamocina pode ser devida à dois anéis de tetrahidrofurano (bis-THF), que tem alto efeito inibitório do complexo I (NADH – ubiquinona oxidoreductase) (TORMO et al., 1999) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, promovendo apoptose (morte celular programada) e levando à redução das taxas respiratórias e cardíacas (BARRACHINA et al., 2007).

Figura 1 - Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das folhas de *Annona mucosa*, fração hidroalcoólico, $\lambda = 205$ nm

Condição: Coluna Júpiter C18, (5 μm ; 4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 35°C

Fase móvel: t=0, 7 e 14 min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ, t=23 min: 100% acetonitrila, t= 30 e 32 min: 85% acetonitrila e 15% água milQ



Fonte: Autor, 2018.

Na tabela 11 evidencia-se mescla de possíveis classes de composto ACGs na FCLF. Destacam-se as bandas cromatográficas com concentração de área (%) variável, quais totalizam 91,13% de áreas prováveis de ACGs.

Tabela 11 - Análise cromatográfica por CLAE da fração cloroformico de folhas de *A. mucosa*, comprimento de onda (205nm)

Pico	T _R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 205 nm			Classe de composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	3,14	19,54	204	279	354	Acetogenina
2	3,40	10,46	198	223	275	Acetogenina
3	3,54	49,47	205	224	279	Acetogenina
4	3,66	11,66	199	228	277	Acetogenina
Total		91,13				

¹T_R – (tempo de retenção)

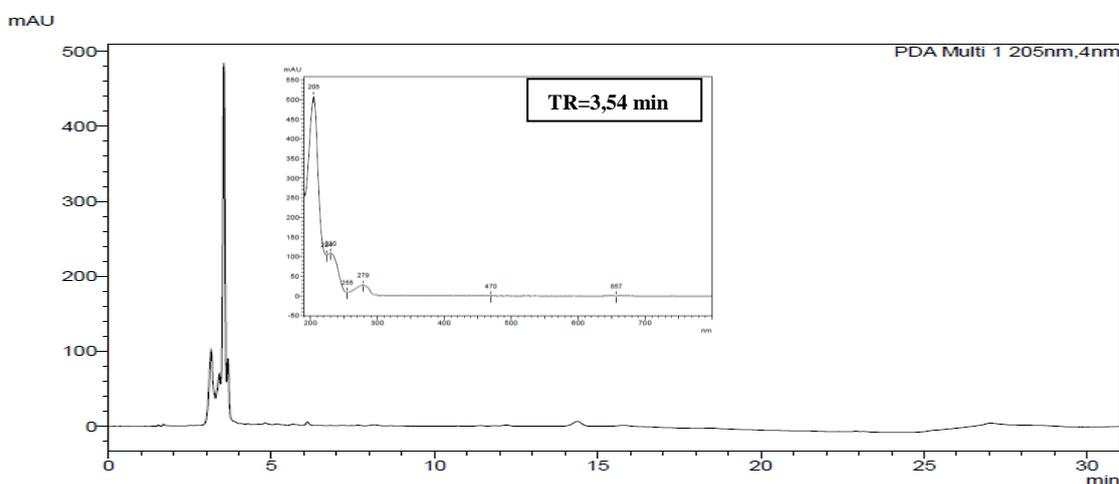
Fonte: Autor, 2018.

A absorvância máxima UV para cada banda (Figura 2) se evidencia a presença de possíveis ACGs na FCLF, com destaque a possível ACG no tempo de retenção máxima (TR) 3,54 min., com maior intensidade. Apresenta um espectro UV com comprimento de onda (λ) de 205, 224 e 279 nm, com maior concentração de área de 49,47 %.

Figura 2 - Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das folhas de *Annona mucosa*, fração cloroformico, λ= 205 nm

Condição: Coluna Júpiter C18, (5 μm;4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 35°C

Fase móvel: t=0, 7 e14 min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ, t=23 min: 100% acetonitrila, t= 30 e 31min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ



Fonte: Autor, 2018.

Na tabela 12 os resultados da presença de ACG na FACT, estão presentes por uma mescla de possíveis classes de composto.

Tabela 12 - Análise cromatográfica por CLAE da fração acetato de etila de folhas de *A. mucosa*, comprimento de onda (205nm)

Pico	T _R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 205 nm			Classe de composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	3,54	22,69	205	220	279	Acetogenina
2	4,80	3,46	197	273	332	Acetogenina
3	5,18	4,14	207	260	360	Acetogenina
4	5,70	4,08	209	260	335	Acetogenina
Total		34,37				

¹T_R – (tempo de retenção);

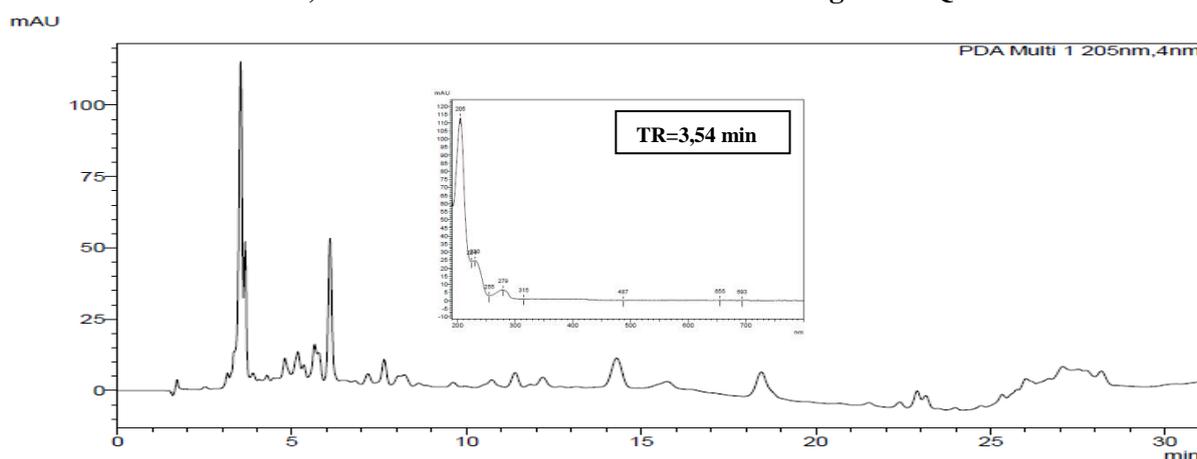
Fonte: Autor, 2018

Foram identificadas bandas cromatográficas com concentração de área (%) variável, totalizando 34,37% de áreas prováveis de ACGs presente na FACT. No cromatograma a absorvância máxima UV para cada banda no cromatografo (Figura 3) se evidencia a presença de possíveis ACGs, com destaque ao tempo de retenção máxima (TR) 3,54 min., com comprimento de onda 205, 220 e 279 (λ=nm), com a concentração de área de 22,69 % (Tabela 12).

Figura 3 - Perfis cromatográficos e espectros de UV para presença de acetogeninas no extrato das folhas de *Annona mucosa*, fração acetato de etila, λ= 205 nm

Condição: Coluna Júpiter C18, (5 µm;4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 35°C

Fase móvel: t=0, 7 e14 min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ, t=23 min: 100% acetonitrila, t= 30 e 31min: 85% acetonitrila e 15% água miliQ



Fonte: Autor, 2018.

A ação inseticida dos bioativos do extrato etanólico das folhas de *A. mucosa* sobre *P. xylostella*, supostamente estará associados às ACGs, no presente estudo. Estudos sobre o mecanismo de ação das acetogeninas em artrópodes-praga mostram que são potentes

inibidores respiratórios, essas substâncias agem como inibidoras do complexo I (NADH - ubiquinona oxidoreductase), induzindo a apoptose (morte celular programada) (GALLARDO et al., 2000). Estudos mais recentes levantaram a hipótese que a inibição mitocondrial do complexo I não é o único modo de ação das ACGs (BLESSING et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013.), considerando a gama de efeitos biológicos causados e os muitos átomos de carbono e grupos funcionais presentes nas suas estruturas. Costa et al. (2013; 2017) e Ferreira (2016) identificaram a esquamocina bis THP e esquamocina, em sementes de *A. mucosa* com potencial inseticida para *Aedes aegypti* e *P. xylostella*, respectivamente.

No presente estudo a presença de possível ACG esquamocina em folhas da *A. mucosa* evidenciou atividade inseticida para *P. xylostella*, como também comprova rota metabólica foliar constituinte da classe do composto, no qual diferem da rota comprovada por Costa et al. (2013; 2017) e Ferreira (2016), além, de pode ser considerada uma estratégias promissora as táticas do MIP.

4.3.2.2 Identificação de flavonóides e alcalóides de *Annona mucosa*

São poucos os relatos de flavonóides em espécies de Annonaceae. Contudo, essa família se destaca pela biossíntese de derivados da via do chiquimato que é responsável pela produção da maioria dos derivados fenólicos produzidos por fontes vegetais (NUMES et al., 2012).

As frações FHAL, FACT, FCLF e FH obtidas do particionamento do extrato etanólico bruto (EE) obtido das folhas de *A. mucosa* foram submetidas a análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês: high performance liquid chromatography, HPLC).

Na tabela 13 apresenta-se a análise cromatográfica por CLAE-DAD da FHAL no comprimento de onda (λ) 354 nm, nos quais foram identificados os flavonóides orientina e rutina, como outros possíveis, enquanto, Rinaldi (2007) identificou o flavonoide rutina para a espécie de *Annona warmingiana*.

Tabela 13 - Análise cromatográfica por CLAE da fração hidroalcoólico de folhas de *A. mucosa*, comprimento de onda (354 nm)

Pico	T _R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 354 nm			Classe de composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	12,80	1,64	239	264	325	-
2	16,35	0,55	235	267	351	Orientina
3	17,32	9,64	204	256	354	-
4	17,45	24,52	204	256	353	Rutina
5	18,14	25,51	196	265	347	-
6	18,46	33,65	196	265	347	-
Total		95,51				

¹T_R – (tempo de retenção)

Fonte: Autor, 2018

De acordo com Harborne (1994) os flavonóides possuem intensa absorção UV, aproximadamente em 350 nm devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos. No presente estudo a identificação dos flavonóides foi realizada analisando absorvância máximos UV para cada área da banda cromatográfica dos cromatogramas obtidos, na faixa de comprimento de onda 354 nm, comparando com o cromatograma padrão do flavonoide rutina (Figuras 4A e 4B).

Na tabela 13, foram identificadas bandas cromatográficas com concentrações de áreas (%) variáveis para cada banda, totalizando 95,51% de áreas prováveis de flavonóides, o qual indica que durante a partição líquido-líquido realizada não houve perdas consideráveis, mantendo-as presente na FHAL.

Nas figuras 4C1 e 4C2, os flavonoides orientina e rutina estão nas absorvâncias máximas UV para as bandas nos tempos de retenções máximas (TR) 16,35 e 17,45 min, respectivamente. Apresentaram espectros de UV com comprimento de onda (λ) 235, 267, 351 e 204, 256 e 353 nm, com concentrações de áreas de 0,55 e 24,52 %, respectivamente, como também, nos demais picos do espectro UV que evidencia a presença de outros flavonoides, porém, não identificados por falta de padrão.

No estudo, no CLAE-DAD os compostos polares eluem mais rapidamente que as moléculas com caráter mediamente polar ou pouco polar, isto se justifica, que os flavonóides são ácidos fracos e, como são substâncias polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água (HARBORNE, 1994). Os flavonóides no método usado eluiu na fase móvel no TR de 16 à 20 min (Figura 4C).

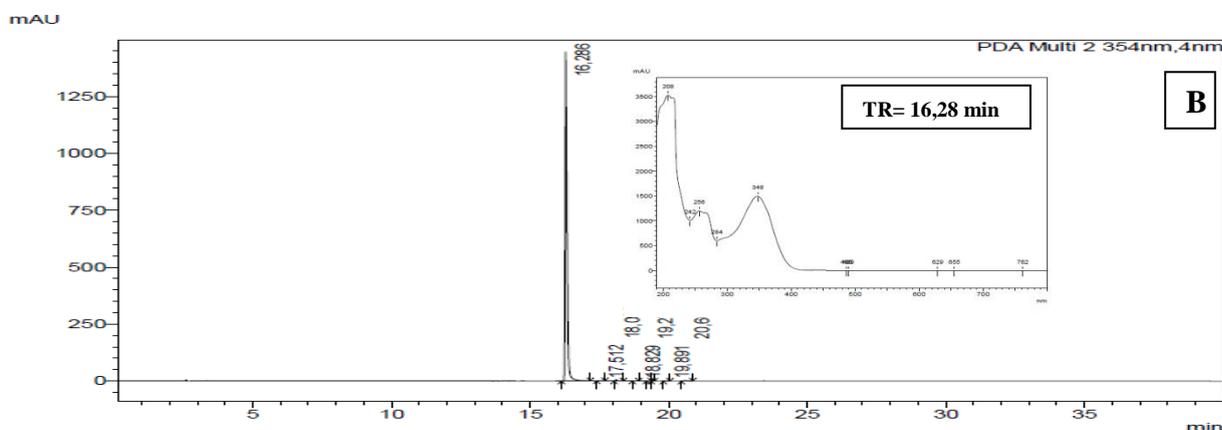
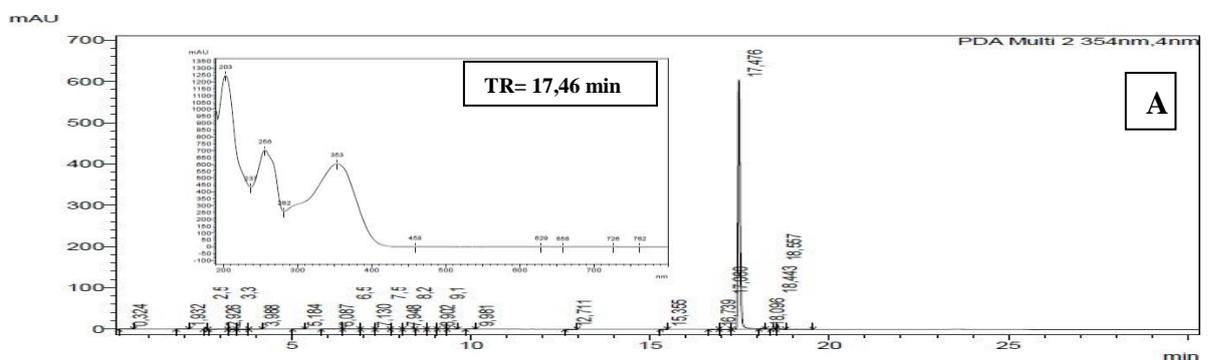
Já foram identificados flavonoides no gênero *Annona*. Santos; Salatino (2000) identificaram por CG-MS nas folhas *A. crassiflora* os flavonoides glicosilados: kaempferol-3-

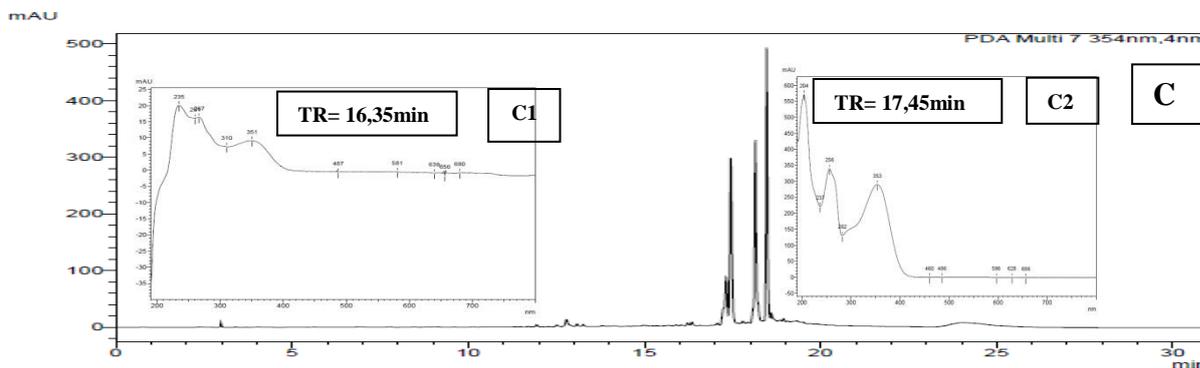
O-galactosídeo, kaempferol-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-arabinosídeo e quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo; os glicosídeos de quercetina, isoramnetina, kaempferol e luteolina foram detectados nas folhas de *Annona monticola*, *Annona warmingiana* e *Annona tomentos*. Rinaldi (2007) encontrou flavonas (luteonina) e flavonois (canferol, quercetina, ramnetina, rutina e isoramnetina) nas espécies de *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. dolichorcharpa*. Carollo et al. (2006) isolaram a isoramnetina da espécie de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae)

Figura 4 - Perfis cromatográficos e espectros de UV para padrões de flavonóides rutina (A), orientina (B) e no extrato das folhas de *Annona mucosa*, fração hidroalcoólico (C), presença de orientina (C1) e rutina (C2), $\lambda=354\text{ nm}$

Condição: Coluna Júpiter C18, (5 μm ;4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 35°C

Fase móvel: t= 0 e 2 min: 3% acetonitrila e 97% água miliQ, t= 4 min: 6% acetonitrila e 94% água miliQ, t=6 min: 9% acetonitrila e 91% água miliQ, t=8 min: 12% acetonitrila e 88% água miliQ, t=10 min: 15% acetonitrila e 85% água miliQ, t=12 min: 18% acetonitrila e 82% água miliQ, t=14 min: 21% acetonitrila e 79% água miliQ, t=16 e 20 min: 30% acetonitrila e 70% água miliQ, t= 23 e 30 min: 60% acetonitrila e 40% água miliQ, t= 33 e 35 min: 75% acetonitrila e 25% água miliQ, t= 37,5 e 40 min: 3% acetonitrila e 97% água miliQ





Fonte: Autor, 2018

Apresenta-se a análise cromatográfica por CLAE-DAD da FCLF no comprimento de onda (λ) 354 nm, com classe de composto flavonoide (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise cromatográfica por CLAE da fração clorofórmica de folhas de *Annona mucosa*, comprimento de onda (354 nm)

Pico	T_R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 354 nm			Classe de composto
			1	2	3	
1	17,45	8,30	253	275	353	Rutina
2	17,75	5,14	250	278	330	-
3	18,13	9,93	250	275	282	-
4	18,23	4,82	250	283	306	-
5	18,44	13,68	254	307	330	-
Total		41,87				

¹ T_R – tempo de retenção

Fonte: Autor, 2018

Na tabela 14, foram identificadas bandas cromatográficas com concentrações de áreas (%) variáveis para cada banda, totalizando 41,87% de áreas prováveis de flavonóides. Na figura 5B, a absorvância máxima UV para a banda no tempo de retenção máxima (T_R) 17,45 min. evidencia a presença do flavonóide rutina. Apresentou um espectro de UV com comprimento de onda (λ) 253, 275 e 353 nm, com concentração de área de 8,30 %, como também, nos demais bandas do espectro UV evidencia a presença de outros flavonoides, porém, não identificados por falta de padrão. Os flavonóides no método usado eluiu na fase móvel no T_R de 16 à 20 min (Figura 5B).

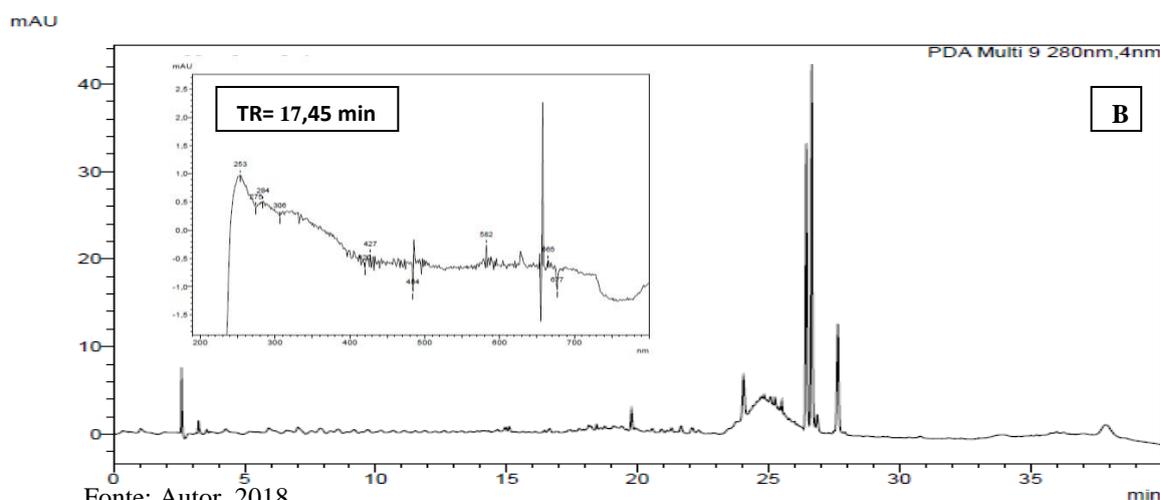
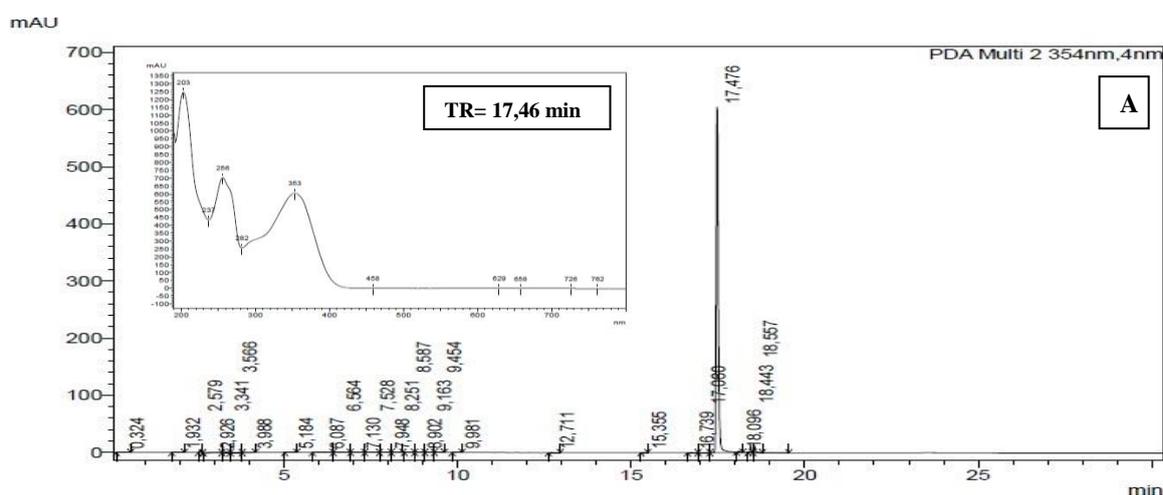
Na figura 5B, a absorvância máxima UV para a banda no intervalo do tempo de retenção máxima (T_R) 24,0 à 26,0 min. evidencia-se a presença de alcaloides. Rabêlo (2014) no período de T_R 24,0 à 27,0 min. identificou os constituintes majoritários para atemoia

(*Annona cherimólia* x *Annona squamosa*): sesquiterpenos biciclogermacreno, germacreno e cariofileno; monoterpeno linalol, além, (*E*)-cariofileno, β -elemeno e δ -elemeno.

Figura 5 - Perfis cromatográficos e espectros de UV padrão flavonóide rutina (A) e do extrato das folhas de *Annona mucosa*, presença de rutina (B), fração clorofórmico $\lambda = 354$ e 280 nm, respectivos

Condição: Coluna Júpiter C18, (5 μ m; 4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 35°C

Fase móvel: t= 0 e 2 min: 3% acetonitrila e 97% água miliQ, t= 4 min: 6% acetonitrila e 94% água miliQ, t=6 min: 9% acetonitrila e 91% água miliQ, t=8 min: 12% acetonitrila e 88% água miliQ, t=10 min: 15% acetonitrila e 85% água miliQ, t=12 min: 18% acetonitrila e 82% água miliQ, t=14 min: 21% acetonitrila e 79% água miliQ, t=16 e 20 min: 30% acetonitrila e 70% água miliQ, t= 23 e 30 min: 60% acetonitrila e 40% água miliQ, t= 33 e 35 min: 75% acetonitrila e 25% água miliQ, t= 37,5 e 40 min: 3% acetonitrila e 97% água miliQ



Fonte: Autor, 2018

Apresenta-se a análise cromatográfica por CLAE-DAD da FH no comprimento de onda (λ) 354 nm, no qual foi identificada classe de composto flavonoides (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise cromatográfica por CLAE da fração hexano de folhas de *Annona mucosa*, comprimento de onda (354nm)

Pico	T_R (min) ¹	Concentração da área (%)	λ máxima 354 nm			Classe de composto
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	
1	17,30	6,46	254	298	354	-
2	17,44	17,26	255	282	354	Rutina
3	18,12	22,52	267	281	347	-
4	18,42	33,11	244	265	347	-
Total		79,35				

¹ T_R – (tempo de retenção)

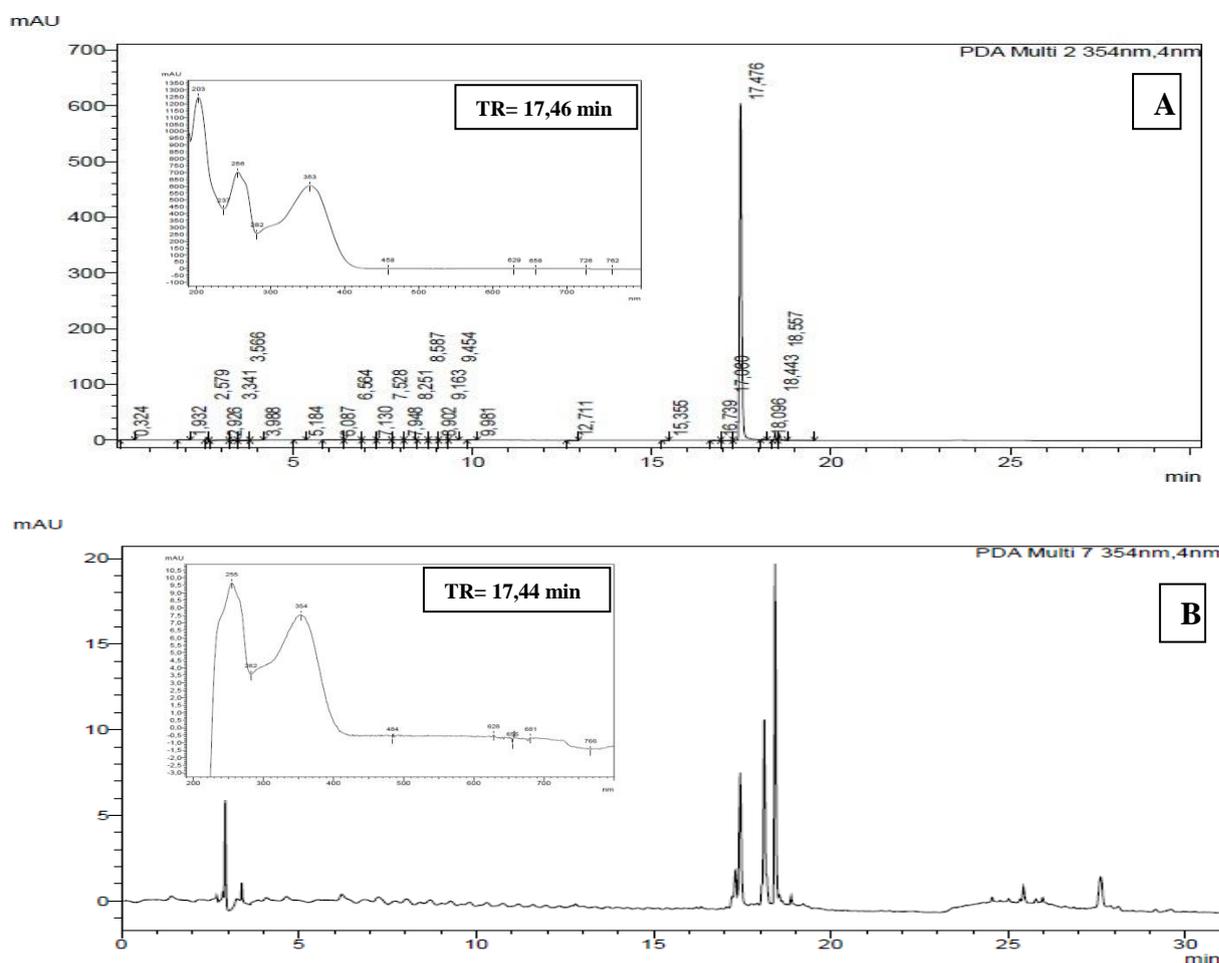
Fonte: Autor, 2018

Na tabela 15, foram identificadas bandas cromatográficas com concentrações de áreas (%) variáveis para cada banda, totalizando 79,35% de áreas prováveis de flavonoides. Na figura 6B, o flavonoide rutina está na abosrvância máxima UV para a banda no tempo de retenção máxima (TR) 17,44 min. Apresentou um espectro de UV com comprimento de onda (λ) 255, 282 e 354 nm, com concentração de área de 17,26 %, como também, nos demais picos do espectro UV evidencia a presença de outros flavonoides, porém, não identificados por falta de padrão. Os flavonoides no método usado saiu na fase móvel no TR de 16 à 20 min (Figura 6B).

Figura 6 - Perfis cromatográficos e espectros de UV padrão flavonóide rutina (A) e do extrato das folhas de *Annona mucosa*, presença de rutina (B), fração hexano $\lambda = 354$ nm

Condição: Coluna Júpiter C18, (5 μm ; 4,6 x 150 mm), fluxo= 1,0 mL.min⁻¹, temperatura 35°C

Fase móvel: t= 0 e 2 min: 3% acetonitrila e 97% água miliQ, t= 4 min: 6% acetonitrila e 94% água miliQ, t=6 min: 9% acetonitrila e 91% água miliQ, t=8 min: 12% acetonitrila e 88% água miliQ, t=10 min: 15% acetonitrila e 85% água miliQ, t=12 min: 18% acetonitrila e 82% água miliQ, t=14 min: 21% acetonitrila e 79% água miliQ, t=16 e 20 min: 30% acetonitrila e 70% água miliQ, t= 23 e 30 min: 60% acetonitrila e 40% água miliQ, t= 33 e 35 min: 75% acetonitrila e 25% água miliQ, t= 37,5 e 40 min: 3% acetonitrila e 97% água miliQ



Fonte: Autor, 2018

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, entre elas, atuam no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos como vírus, bactérias, fungos e insetos (MACHADO, 2005), e vem sendo estudada extensivamente a natureza química e sua aplicação na agricultura (WOO; JEONG; HAVES, 2005).

A presença de flavonoides em folhas da *A.mucosa* evidenciou atividade inseticida para *P. xylostella*, sendo o primeiro relato desta espécie botânica com constituinte químico bioativo para a área foliar, indicando que pode ser considerada promissora no MIP.

4.4 Conclusões

A CL₉₉ do EEAM na concentração de 616,2 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ apresenta efeito ovicida, repelente para oviposição e eficiência no estágio larval do 1º instar;

A CL₅₀ na concentração de 51,64 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ da EEAM apresenta efeito ovicida e eficiência no estágio larval do 1º instar;

A persistência da toxicidade do EEAM apresenta efeito residual de até 8 e 12 dias para CL₉₉ e CL₅₀, respectivamente, em condição de semicampo com folha destacada;

A persistência da toxicidade do EEAM em condição de semicampo com planta inteira é de até 6 e 12 dias para CL₉₉ e CL₅₀, respectivamente;

As partições das FHAL, FACT e FCLF foram as mais tóxicas sobre *P. xylostella*;

Através das análises por CLAE-DAD se evidencia a presença de acetogeninas na EHAM por meio da concentração da área (%) e do comprimento de onda (λ);

Os flavonoides orientina e rutina em folhas da *A. mucosa* apresenta efeito inseticida para *P. xylostella*;

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação geral de agrotóxicos e afins/DFIA/DAS. Disponível em:<<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 9 jun. 2017.
- ANSANTE, T.F. et al. Secondary metabolites from neotropical Annonaceae: Screening, bioquidated fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v.74, p.969-975, 2015.
- ABBASIPOUR, H.; MAHMOUDVAND, M.; RASTEGAR, F.; BASIJ, M. Insecticidal activity of *Peganum harmala* seed extract against the diamondback moth, *Plutella xylostella*, **Bulletin of Insectology**, v.63, n.2, p.259-263, 2010.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, n.3, p.504-540, 1999.
- ÁLVAREZ, O. et al. Toxic effects annonaceous acetogenins on *Oncopeltus fasciatus*. **Journal Pesticide Science**, v.81, p.85-89, 2008.
- BACCI, L.; PICANÇO, M. C.; GUSMÃO, M. R.; BARRETO, R. W.; GALVAN, T. L. Inseticidas seletivos à tesourinha Doru luteipes (Scudder) utilizados no controle do pulgão verde em brássicas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 174-179, 2002.
- BARRACHINA I.; ROYO I.; BALDONI H.A.; CHAHBOUNE N.; SUVIRE F.; DePEDRO N. New antitumoral acetogenin ‘Guanacone type’ derivatives: isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone. **BioorgMed Chemical**, v.15, p.4369–4381, 2007
- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v.22, n.2, p.269-303, 2005.
- BOIÇA JÚNIOR, A.L. et al. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.45-50, 2005.
- BRAGA SOBRINHO, R. Potencial de exploração de annonaceas no Nordeste do Brasil. EMBRAPA Agroindústria Tropical. XII Agroflores – 17ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria. 2010.
- BLESSING, L D.T. et al.. Antifeedant and toxic of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Pesticide Science**, v. 83, n. 3, p. 307-310, 2010.
- BLISS, C.I. The method of probits. **Science**, Washington, v.79, p.38-39, 1934.
- CAROLLO, C. A.; HELLMANN-CAROLLO, A.R. ; DE SIQUEIRA, J.M.; ALBUQUERQUE, S. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of

Duguetia furfuracea – Annonaceae. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 51, n. 2, p.837-841, 2006.

CASTELO BRANCO, M.; GATEHOUSE, A.G. Inseticide resistance in *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) in the Federal District, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p.75-79, 1997.

CAVÉ, A. et al. Acetogenius from Annonaceae. **Progress in the chemistry of organic natural products**, v.70, p.281-288, 1997.

COSTA, M.S. et al. Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. **Pest Management Science**, v.73, p.636-640, 2017.

COSTA, M.S. et al. Multiple modes of action of the squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v.11, n.8, p.1-13, 2016.

COSTA, M.S. et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, p.184-190, 2013.

COSTA, E.V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v.16, p.9714-9720, 2011.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae (soursop family). In N. Smith (Ed.), *Flowering of the neotropics*. Princeton: Princeton University Press, p.18-20, 2004.

CHARLESTON, D. S.; KFIR, R.; VET, L.E.; DICKE, M. Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. **Bulletin of Entomological Research**, v.95, p. 457-465, 2005.

CHEN, A. C.; MAYER, R.T. Insecticides: effects on the cuticle. *Insect Phys. Bioch. Pharm.* v.12, p.57-77.1985.

COVARRUBIAS, D.A.V. et al. Effects of five species of *Chenopodiaceae* on the development and reproductive potential of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae), v.98, n.1, p.80-85, 2015.

DEQUECH, S. T. B. et al. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.551-554, 2009.

FERREIRA, E. dos S. Estudo fitoquímico e atividade inseticida de *Annona crassiflora* Mart., *Annona mucosa* (Jacq.) Baill. (Annonaceae), *Dioscorea rotundata* Poir. (Dioscoreaceae) E *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). **Tese em Proteção de Plantas, CECA/UFAL**, 129p., 2016.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system, versão 5.6. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliça. 3.ed., Viçosa:UFV, 421p., 2008.

FUKUTO, T. R.; N. M. MALLIPUDI. Suppression of metabolic resistance through chemical structure modification, p. 557-578. In: G. P. Georgiou & T. Saito (ed.). Pest resistance to pesticides: challenges and prospects. Plenum Press, New York, United States of America. 1983.

GALLARDO, T. et al. Semisynthesis of antitumoral acetogenins: SAR of functionalized alkyl-chain bis-tetrahydrofuranic acetogenins, specific inhibitors of mitochondrial complex I. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, n.25, p4793-4800, 2000.

GARRIDO, L.R. et al., Sistema de produção 3. Disponível em: <<http://sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/pessego;pessegodemeresaregiaosrragaucha;defensi.html>>. Acesso em 11 jul.2017.

GOMES, I. B. et al. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. **Ciência Rural**, v.46, n.5, p.771-775, 2016.

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

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

IRAC-APRD – Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponível em: <www.pesticideresistance.org>. Acesso em: 30 out. 2017.

IRAC – Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas. Disponível em: <www.irac-br.org>. Acesso em: 12 dez. 2016.

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

KUSARI, S.; VERMA, V. C. E.; LAMSHOEFT, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces Azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1287-1294, 2012.

KODJO, T. A.; GBÉNONCHI, M.; SADATE, A.; KOMI, A.; YAOVI, G.; DIEUDONNÉ, M.; KOMLA, S. Bio-insecticidal effects of plant extracts and oil emulsions of *Ricinus communis* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae) on the diamondback, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) under laboratory and semi-field conditions, **Journal of Applied Biosciences**, v.43, p.2899-2914, 2011.

- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A. Nymphicidal effect of vegetal extracts of *Annona mucosa* and *Annona crassiflora* (Magnoliales, Annonaceae) against rice stalk stink bug, *Tribraea limbativentris* (Hemiptera, Pentatomidae). V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae. v.36, edição especial, p.217-224, 2014.
- MAAS, P.J.M.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae. In lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/fb110219>. Acesso em 17 de julho de 2015.
- MAZZONETTO, F.; CORBANI, R. Z.; DALRI, A.B. Biofumigation of plant species on *Sitophilus zeamais* in stored maize. **Applied Research & Agrotecnologia**, v.6, n.1, p.53-61, 2013.
- MACHADO, L.A.; SILVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Instituto Biológico**, v.69, n.2, p.103-106, 2007.
- MEDEIROS, C.A.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; TORRES, A.L. Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas em couve. **Bragantia**, v.64, n.2, p.227-232, 2005.
- MIYOSHI H.; OHSHIMA M.; SHIMADA H.; AKAGI T.; IWAMURA H.; MCLAUGHLIN J.L. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochim Biophys Acta Bioenerget**, v.1365, p443-452, 1998.
- NANSEN C. et al. Behavioral Avoidance - Will Physiological Insecticide Resistance Level of Insect Strains Affect Their Oviposition and Movement Responses? **PLoS ONE** v.11, n.3: e0149994. doi:10.1371/journal.pone.0149994, 2016.
- NUNES, C. dos R.; BERNARDES, N. R. B.; GLÓRIA, L. de L.; OLIVEIRA, D. B. Flavonóides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **VÉRTICES**, v.14, n.1, p. 39-57, 2012.
- OLIVEIRA, A.C. et al. Resistance of Brazilian diamondback moth populations to insecticides. **Scientia Agricola**, v.68, p.154-159, 2011.
- OLIVEIRA, M.S.S. et al. Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.326-331, 2007.
- PASCUAL-VILLALOBOS, M.J.; ROBLEDO, A. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. **Ind. Crops Prod.**, v.8, n.3, p.183-194, 1998.
- PICANÇO, M. C.; RIBEIRO, L. J.; LEITE, G. L. D.; ZANUNCIO, J. C. Seletividade de inseticidas a *Podisus nigrispinus* predador de *Ascia monuste orseis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 369-372, 1997.
- POTTER, C. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray fluids. **Annals Applied Biology**, v. 38, n.1, p.1-12, 1952.

RABÊLO, S. V. Revisão de alcaloides do gênero *Annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, 234p., 2014.

REIS, P. R. et al. Seletividade de agroquímicos ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma (Acari: Phytoseiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 265-274, 1998.

RIBEIRO, L.P.; ANSANTE, T.F; VENDRAMIM, J.D. Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. **Bragantia**, v.75, n.3, p.322-330, 2016.

RIBEIRO, L.P. et al. Searching for promising sources of grain protectors in extracts from neotropical Annonaceae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas**, v.15, n.4, p.215-232, 2016.

RIBEIRO, L. P., SANTOS, M. S., GONÇALVES, G. L. P. E VENDRAMIM, J. D. Toxicity of an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **The Florida Entomologist**, v.98, p.835-842, 2015.

RIBEIRO, L.P. et al. Comparative bioactivity of selected seed extracts from Brazilian annona species and na acetogenin – based comercial bioinsecticide against *Trichoplusia ni* and *Myzus persicae*. **Crop Protection**, v.62, p.100-106, 2014a.

RIBEIRO, L.P. et al. Comparative toxicity of an acetogenin – based extract and comercial pesticides against citrus red mite. **Experimental and Applied Acarology**, v.64, p.87-98, 2014b.

RIBEIRO, L.P. et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): a promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.55, p.6-14, 2013.

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

SAS[®] Satatical Analysis System, version 8, **Cary, NC**: SAS Institute Inc., 2000.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567 – 573, 2000.

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

SOUZA, C.M. et al. Lethal and growth inhibitory activities of neotropical Annonaceae – derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal Pesticide Science**, v.90, p.701-709, 2017.

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

TORMO JR, GONZÁLEZ M.C., CORTES D.; ESTORNELL E. Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Arch Biochem Biophys* v.369, p.119–126, 1999.

THULER, R. T.; BORTOLI, S.A.; BARBOSA, J.C. Eficácia de inseticidas químicos e produtos vegetais visando ao controle de *Plutella xylostella*. **Científica**, v.35, n.2, p.166-174, 2007.

TURCHEN, L.M. et al. Potencial phytoinsecticide of *Annona mucosa* (Jacq.) (Annonaceae) in the control of brown stink bug. **Bioscience Journal**, v.32, n.3, p.581-587, 2016.

TRINDADE, R.C.P. et al. Toxicity of soursop extracts to diamondback moth. **Bioscience Journal**, v.34, n.1, p.104-111, 2018.

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

VILLAS BÔAS, G.L. et al. Inseticidas para o controle da traça-das-crucíferas e impactos sobre a população natural de parasitóides. **Horticulture Brasileira**, v.22, n.4, p.696-699, 2004.

WILLER, H.; KILCHER, L. The world of organic agriculture: statistics and emerging trends. Bonn:IFOAM, v.12, 2009.

WOO, H.; JEONG, R.B.; HAWES, C.M. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. **Review Biotechnology Letters**. v.27, p. 365-374, 2005.

YADAV N.; KUMAR A.; YADAV R.; YADAV R.; KUMAR M. Persistence of different neem based pesticides against diamondback moth, *Plutella xylostella* Linn. **International Journal of Plant Protection**, v.2, n.1, p.17-19, 2009.

YU, S. J. Selectivity of insecticides to the spined bug (Heteroptera: Pentatomidae) and its lepidopterous prey. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 81, p. 119-122, 1988.

ZALUCKI M. Y.; SHABBIR A.; SILVA R.; ADAMSON D.; LIU SHU-SHENG L.; FURLONG M. J. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.4, p.1115–1129, 2012.