



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓSGRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação da atividade inseticida dos extratos de *Annona mucosa* (Jacq.)
(ANNONACEAE) sobre *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY (COLEOPTERA,
CURCULIONIDAE)**

UÁTYLA DE OLIVEIRA LIMA

**COARI, AMAZONAS
2017**

UÁTyla DE OLIVEIRA LIMA

**Avaliação da atividade inseticida dos extratos de *Annona mucosa* (Jacq.)
(ANNONACEAE) sobre *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY (COLEOPTERA,
CURCULIONIDAE)**

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração "Biotecnologias para a Área Agroflorestral", como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**COARI, AMAZONAS
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor(a).

L732a Lima, Uatyla de Oliveira
Avaliação da atividade inseticida dos extratos de *Annona mucosa*. (Jacq.) (ANNONACEAE) sobre *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE) / Uatyla de Oliveira Lima. 2017 59 f.: il.: 31 cm.

Orientador: Professor. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.

1. Annonaceae. 2. Gorgulho-do-milho. 3. Extrato de planta. 4. Inseticida vegetal. I. Veiga Júnior. Prof. Dr. Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas.

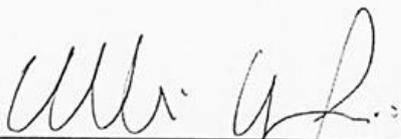
UÁTILA DE OLIVEIRA LIMA

**Avaliação da atividade inseticida dos extratos de *Annona mucosa* (Jacq.)
(ANNONACEAE) sobre *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY (COLEOPTERA,
CURCULIONIDAE)**

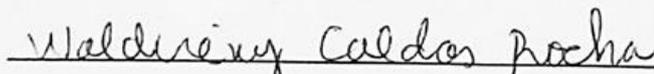
"Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração "Biotecnologias para a Área Agroflorestral", como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia".

Parecer: APROVADO em 21 de junho de 2017.

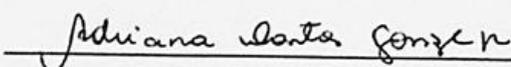
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Waldireny Caldas Rocha
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar minha sincera gratidão, a “DEUS” por ter me dado forças nos momentos em que os obstáculos pareciam intransponíveis.

Ao Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior pela orientação essencial à execução deste trabalho e principalmente pelo apoio.

À Profa. Dra Adriana Dantas Gonzaga pela orientação, e por todo o apoio e amizade.

Ao Professor Msc. Tiago Gonçalves Santos pelo apoio e amizade na elaboração deste trabalho.

A Profa. Dra. Waldireny Caldas Rocha, a Profa. Dra. Adriana Dantas Gonzaga pela disponibilidade em participar da banca de defesa e contribuições na finalização desta dissertação.

A todos os professores do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelos ensinamentos.

Aos colegas do grupo de pesquisa Química de Moléculas Bioativas da Amazônia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas que acompanharam essa jornada.

Aos amigos Michel Nasser, Ricardo Brito, Renato Reis e Sandro Rabelo que contribuíram para execução deste trabalho.

À minha esposa Josiana Lima da Costa e aos meus filhos Lucas Bernardo e Luan Francisco, que estiveram ao meu lado em todos os momentos desta jornada, sempre com muito apoio, amor e carinho.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram na busca para realização de meus sonhos.

“O conhecimento nos faz
responsáveis” (Che Guevara).

RESUMO

Nas últimas décadas tem aumentado o uso de inseticidas sintéticos, no controle de insetos pragas, porém a utilização desses produtos gera inúmeros impactos negativos como contaminação do solo, da água, do manipulador e do próprio alimento. Diante dessa problemática, tem-se buscado novas formas de controle, mais específicos e de menor impacto ao meio ambiente. Novas medidas alternativas estão sendo testadas com a utilização de plantas. Este estudo teve como objetivo, avaliar a ação inseticida do extrato e das frações das sementes de *Annona mucosa*, no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera:Curculionidae). Esta é considerada uma importante praga de grãos armazenados no País. O extrato foi obtido por meio de maceração em etanol, e as frações foram obtidas em solventes orgânicos por partição líquido-líquido (hexano e acetato de etila) em ordem crescente de polaridade. Foram realizados ensaios para verificar a bioatividade do extrato e das frações, neste sentido as frações em hexano de *A. mucosa*, foram as que apresentam maior efeito inseticida para o controle dos *S. zeamais*, em comparação com os demais tratamentos. As frações hexânicas tiveram melhores resultados de mortalidade por via de ingestão (100%), quando comparado ao contato por superfície contaminada (50%). A concentração letal mediana (CL₅₀= 2.824 e 4.738 ppm), apresentou maior mortalidade para o teste de ingestão e contato. Considerando-se os resultados obtidos, nas condições do presente estudo, pôde se concluir que as frações em hexano de *A. mucosa*, do extrato em etanol obtidas por partição líquido-líquido são promissores protetores de grãos contra *S. zeamais*, propiciando níveis satisfatórios de controle. Entretanto é fundamental analisar a fitoquímica das frações, determinando qual o princípio ativo mais atuante na mortalidade dos insetos, bem como avaliar a toxicidade das frações a fim de tornar os resultados deste estudo em um produto comercialmente viável.

Palavras chave: Annonaceae, Gorgulho-do-milho, Extrato de planta, Inseticida vegetal.

ABSTRACT

In recent decades the use of synthetic insecticides has increased in the control of insect pests, but the use of these products generates numerous negative impacts such as contamination of soil, water, manipulator and food itself. Faced with this problem, we have sought new forms of control, more specific and less impact on the environment. New alternative measures are being tested with the use of plants. The objective of this study was to evaluate the insecticidal action of the extract and fractions of *Annona mucosa* seeds in the control of *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). The extract was obtained by maceration in ethanol, and the fractions were obtained in organic solvents by liquid-liquid partition (hexane and ethyl acetate) in increasing order of polarity. In order to verify the bioactivity of the extract and the fractions, in this sense the fractions in hexane of *A. mucosa* were the ones with the highest insecticidal effect for the control of *S. zeamais*, in comparison to the other treatments. The hexanic fractions had better mortality results through ingestion (100%), when compared to contaminated surface contact (50%). The median lethal concentration (LC50 = 2,824 and 4,738 ppm) presented higher mortality for the ingestion and contact test. Considering the results obtained, in the conditions of the present study, it was possible to conclude that the fractions in hexane of *A. mucosa* from the ethanol extract obtained by liquid-liquid partition are promising grain protectors against *S. zeamais*, providing satisfactory levels of control. However, it is fundamental to analyze the phytochemistry of the fractions, determining the most active active principle in insect mortality, as well as to evaluate the toxicity of the fractions in order to make the results of this study into a commercially viable product.

Key words: Annonaceae, Corn Weevil, Plant Extract, Plant Insecticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Larvas de pulpa de <i>Sitophilus zeamais</i> . A) Larva, B) Pulpa.....	5
Figura 2: <i>Sitophilus zeamais</i> adulto. A) adulto dorsal, B) adulto lateral, C) adulto ventral.	6
Figura 3: Espécie vegetal de <i>Annona mucosa</i> . A) árvore. B) fruto verde. C) fruto maduro. D) sementes.....	12
Figura 4: Estrutura geral das acetogeninas.....	16
Figura 5: Criação de <i>S. zeamais</i> em frascos de plástico.....	17
Figura 6: Moinho de quatro facas tipo Willey.....	18
Figura 7: Filtração simples	19
Figura 8: Rotaevaporador	20
Figura 9: Liofilização dos extratos	20
Figura 10: Partição líquido-líquido.....	21
Figura 11: Placas de Petri com papel filtro no ensaio de superfície contaminada....	22
Figura 12: Desenho experimental do bioensaio de contato em superfície contaminada.....	23
Figura 13: Frascos plástico com grãos de milho tratados no ensaio de ingestão	24
Figura 14: Desenho do experimento, bioensaio de ingestão de grãos.....	25
Figura 15: Relação entre mortalidade de <i>Sitophilus zeamais</i> e a fração hexânica das sementes de <i>Annona mucosa</i> aplicados em superfície contaminada. 0 = controle.	34
Figura 16: Relação entre mortalidade de <i>Sitophilus zeamais</i> e a fração hexânica das sementes de <i>Annona mucosa</i> testados através de ingestão de grãos de milho contaminados. 0 = controle.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento do extrato orgânico obtido pelo processo de maceração, estrutura vegetal e espécie utilizada.	26
Tabela 2 - Rendimento das frações orgânicas obtidas pelo processo partição com hexano e acetato de etila.	27
Tabela 3 - Mortalidade-resposta para os solventes considerando as vias de exposição, contato por superfície contaminada utilizando o teste ANOVA.	28
Tabela 4 - Mortalidade-resposta para os solventes considerando as vias de exposição, ingestão utilizando o teste ANOVA.	29
Tabela 5 - Mortalidade de <i>S. zeamais</i> em bioensaios da atividade inseticida por superfície contaminada	30
Tabela 6 - Mortalidade de <i>Sitophilus zeamais</i> em bioensaios da atividade inseticida por ingestão de grãos.....	31
Tabela 7 - Resultado da estimativa do cálculo da Concentração Letal Média (CL ₅₀) das frações hexânica do extrato em etanol das sementes de <i>Annona mucosa</i> , por meio da análise de Probit.	35

LISTA DE UNIDADES, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

g - grama

kg - quilograma

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mmHg - milímetro de mercúrio

ppm - partes por milhão

(R²) - Coeficiente de determinação

°C - Centígrados

C₄H₈O₂ - Acetato de etila

C₆H₁₄ - Hexano

r - coeficiente de correlação

ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ACG - Acetogeninas

ANOVA - Análise de Variância Univariada

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bis-THF - Design of substituted bis-tetrahydrofuran

CL50 - Concentração Letal Mediana

DMSO - Dimetilsulfóxido

FAO - Food and Agriculture Organization

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MDS - Mínima Diferença Significativa

MF - maceração a frio

NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agropecuária

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky	5
3.2 Inseticidas Químicos	7
3.3 Inseticidas Vegetais	8
3.4 Família Annonaceae	10
3.4.1 Gênero <i>Annona</i>	11
3.4.2 <i>Annona mucosa</i> (Jacq.)	11
3.5 Atividade inseticida associada à família Annonaceae	13
3.6 Constituintes químicos da família Annonaceae	15
3.7 Acetogeninas	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Criação de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky, 1855.	16
4.2 Obtenção do material vegetal	17
4.3 Método de coleta	18
4.4 Obtenção dos extratos orgânicos	19
4.5 Partição líquido-líquido dos extratos	21
4.6 Testes preliminares	21
4.6.1 Bioensaios	22
4.6.2 Avaliação da atividade inseticida em superfície contaminada	22
4.6.3 Avaliação da atividade inseticida por ingestão de grãos tratados com extratos orgânicos.	23
4.7 Análises dos dados	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Avaliação do rendimento de extração	26
5.1.2 Avaliação do rendimento das frações	27
5.1.3 Avaliação do efeito dos solventes orgânicos sobre <i>S. zeamais</i>	28
5.2 Análises dos bioensaios de mortalidade	30

6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola brasileira se destaca no cenário mundial, ao longo de seu desenvolvimento sempre esteve associada ao setor econômico do país. O processo de industrialização da agricultura impulsionou o aumento da produção, no entanto contribuiu para a dependência do uso constante de insumos orgânicos e inorgânicos, maquinários, sistemas de irrigação mecanizado e produtos químicos de origem sintética (OLIVEIRA, 2010).

Entretanto os campos cultivados tornaram-se fontes de alimento para as mais variadas espécies de insetos e roedores, que também são atacados por fungos e bactérias. Essas espécies se multiplicaram rapidamente, devido à grande quantidade de alimentos passando a interferir no bem-estar das pessoas sendo, por isso consideradas pragas (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

O homem sempre buscou maneiras para combater as pragas que atacavam as plantações: desde rituais religiosos até o desenvolvimento dos agrotóxicos. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) são considerados agrotóxicos, qualquer substância ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga (organismo) (PERES; MOREIRA, 2003).

Para combater estes organismos, são utilizados produtos químicos, como inseticidas, fungicidas, acaricidas, nematicidas, bactericidas e vermífugos. O que se tem verificado é que a utilização de inseticidas sintéticos é um dos recursos mais utilizados pelos agricultores, para elevar a produtividade agrícola e o consumo destes produtos no Brasil é crescente (BOHNER; ARAÚJO; NISHIJIMA, 2013).

A crescente utilização de inseticidas sintéticos na produção de alimentos tem ocasionado uma série de transtornos e modificações no ambiente, como a contaminação de seres vivos e a acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos, dentre outros) (PERES; MOREIRA, 2003; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A degradação do meio ambiente tem consequências em longo prazo e seus efeitos podem ser irreversíveis. A aplicação de agrotóxicos pode contaminar o solo e os sistemas hídricos culminando numa degradação ambiental, que teria como consequência prejuízos à saúde e alterações significativas nos ecossistemas (VEIGA et al., 2006).

Quando utilizados inadequadamente, em excesso ou próximos da época de colheita, os agrotóxicos podem acarretar ainda, riscos à saúde dos aplicadores e dos consumidores causando intoxicações, mutações genéticas, câncer e morte. Além disso, inseticidas sintéticos também são aplicados no transporte e armazenamento, aumentando mais ainda a possibilidade de danos à saúde (BOHNER; ARAÚJO; NISHIJIMA, 2013).

Existe uma necessidade de minimizar os impactos destes produtos no meio ambiente e na saúde pública, em função dos diversos problemas relacionados com inseticidas sintéticos muito usados na agricultura. Isto levou a uma intensificação dos esforços para encontrar alternativas seguras eficazes e viáveis (TAPONDJOU et al., 2005).

Dessa forma, métodos alternativos para o controle de insetos-praga têm sido amplamente investigados. A utilização de plantas e dos seus derivados como inseticida é uma prática que vem sendo adotada pelo homem desde a idade antiga (VIEGAS, 2003).

Estudos de Braibante; Zappe (2012) afirmam que o piretro, provenientes de flores secas de plantas do gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium*, era utilizado desde 400 a.c. para controlar piolhos. Os constituintes químicos responsáveis pela atividade inseticida são as piretrinas. A nicotina extraída das folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) começou a ser utilizada no século XVII para controlar insetos em jardins, o que perdura até hoje. A rotenona é isolada de raízes de *Derris elliptica*, planta comum na Malásia e na Indonésia, e de espécies de *Lonchocarpus*, existentes na África e América do Sul e, desde o final do século XIX, é utilizada para o controle de lagartas.

Atualmente tem crescido o interesse por substâncias que apresentem menor risco à saúde e ao meio ambiente. Uma das alternativas para minimizar esses problemas é a utilização de novos produtos com ação inseticidas extraídos das plantas ricas em compostos bioativos de atividades inseticidas, fungicidas, ou repelentes (ALMEIDA; SILVA; MELO, 2014).

Os diversos efeitos negativos advindo do uso indiscriminado de agrotóxicos podem ser minimizados com o uso de produtos alternativos, como os extratos vegetais devido as características benéficas relativas à toxicidade, pois possuem degradação rápida o que geralmente pode reduzir o impacto aos inimigos naturais ao homem e ao ambiente (BRITO et al., 2008).

Os extratos vegetais já possuem sua atividade inseticida comprovada, além de possuir uma grande quantidade de compostos bioativos, que podem atuar sinergicamente, apresentando características atraentes ou repelentes, essas características podem ser viáveis em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativas dirigidas para controle e monitoramento das populações de insetos (NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE L, 2009).

Os vegetais apresentam em sua composição química, metabólitos secundários, que são utilizados pelas plantas como forma de proteção aos microrganismos, insetos e outros artrópodes fitófagos (LUCAS, 2000).

Assim, muitas pesquisas com produtos naturais derivados de plantas, como extratos vegetais, óleos essenciais, têm-se mostrado promissoras para o manejo de pragas, uma vez que elas produzem metabólitos secundários que podem agir nas funções fisiológicas e bioquímicas dos insetos (COITINHO et al., 2011; SANTOS et al., 2010).

A família Annonaceae é conhecida como uma fonte abundante e promissora de metabólitos secundários, especialmente acetogeninas, terpenóides e alcalóides derivados de isoquinolina (SOARES et al., 2015). As plantas da família Annonaceae apresentam atividade citotóxica, antitumoral, vermícida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e crescimento, antimalárica e também inseticida. A atividade inseticida das anonáceas deve-se à presença de acetogeninas, substâncias que atuam nas mitocôndrias, inibindo a NADH – ubiquinona oxidoreductase, causando a morte dos insetos (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

O uso de resíduos vegetais tem despertado a atenção de muitos pesquisadores e principalmente dos microempresários, com o propósito de aproveitar integralmente os frutos produzidos sendo, desta maneira economicamente viável às empresas e extremamente favorável ao meio ambiente (LIMA, 2013). Além da possibilidade de obtermos um produto ambientalmente adequado, socialmente justo e economicamente viável para o controle de insetos.

Portanto, em função dos problemas causados com as aplicações dos inseticidas sintéticos, e a crescente demanda por metodologias de controle mais eficaz, este estudo investigou a atividade inseticida dos extratos das sementes dos frutos de *A. mucosa* conhecida como biribá sobre os *Sitophilus zeamais*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade inseticida dos extratos orgânicos de *A. mucosa* em diferentes concentrações sobre adultos de *S. zeamais* em condições de laboratório.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial inseticida do extrato e das frações de *A. mucosa* testados no controle de *S. zeamais*.
- Determinar as porcentagens de mortalidade dos adultos de *S. zeamais* quando expostos ao extrato e as frações de *A. mucosa* pelas vias de contato e ingestão.
- Determinar a Concentração Letal Mediana (CL₅₀) quando possível, do extrato e das frações de *A. mucosa*, sobre adultos de *S. zeamais*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Sitophilus zeamais* Motschulsky

Sitophilus zeamais Motschulsky, é um inseto vulgarmente conhecido como o gorgulho-do-milho foi descrito em 1855, e classificado inicialmente dentro da família Curculionidae, entretanto existem trabalhos sugerindo uma reclassificação dentro da família Dryophitoridae. Aparentemente, ainda não existe consenso e muitos trabalhos continuam a classificá-lo como Curculionidae (BARBOSA, 2015).

Suas larvas são de coloração amarelo-clara, com a cabeça de cor marrom-escura e as pupas são brancas conforme a (Figura 1). Os adultos são gorgulhos de 2,0 mm a 3,5 mm de comprimento, de coloração castanho-escuro, com manchas mais claras nos élitros (asas anteriores), visíveis logo após a emergência têm a cabeça projetada à frente, na forma de rostró curvado, conforme descrito na (Figura 2). Nos machos, o rostró é mais curto e grosso, e nas fêmeas, mais longo e afilado (LORINI et al., 2015).

Figura 1: Larvas de pulpa de *Sitophilus zeamais*. A) Larva, B) Pulpa



Fonte: LORINI, 2008.

Figura 2: *Sitophilus zeamais* adulto. A) adulto dorsal, B) adulto lateral, C) adulto ventral.



Fonte: LORINI, 2008.

O período de oviposição é de 104 dias, e o número médio de ovos por fêmea é de 282. A longevidade das fêmeas é de 140 dias. O período de incubação oscila entre 3 e 6 dias, e o ciclo de ovo até a emergência de adultos é de 34 dias (LORINI et al., 2015).

Conforme Lorini et al. (2015), essa espécie é considerada uma praga primária de grãos armazenados, pode apresentar infestação cruzada, ou seja, infestar grãos no campo e também no armazém, onde penetra na massa de grãos. Apresenta elevado potencial de reprodução, e possui muitos hospedeiros, como trigo, milho, arroz, cevada e triticale.

Coitinho et al. (2011) descrevem em seus estudos que *S. zeamais* provoca danos significativos já que perfuram os grãos sadios para sua alimentação e oviposição possibilitando a instalação de patógenos e pragas secundárias. Para Lorini et al. (2015), tanto larvas como adultos são prejudiciais e atacam grãos e sementes. A postura é feita nos grãos e sementes, as larvas, após se desenvolverem empupam e se transformam em adultos ainda no grão ou na semente.

O gorgulho-do-milho, *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) destaca-se como uma das principais pragas do milho (*Zea mays* L.) no Brasil, seus danos causam perdas de peso dos grãos e desvalorização comercial, perda no valor nutritivo e diminuição no poder germinativo das sementes (LORINI, 2008; FILHO et al., 2011). Ocasionalmente, ocasionando danos, principalmente, aos grãos de milho, arroz (*Oryza sativa* L.) e trigo (*Triticum* spp.) (FILHO et al., 2011; LORINI, 2008).

Os insetos causam frequentemente danos extensivos aos grãos armazenados e aos produtos destes grãos. As perdas quantitativas podem atingir 5-10% nas regiões temperadas e 20-30% nas regiões tropicais. No Brasil, as perdas devido ao ataque de pragas chegam à 20% da produção total do grão demandando a necessidade de novas pesquisas e tecnologias para o controle destes (RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009).

O controle de pragas é feito através de inseticidas sintéticos, que nem sempre são eficazes, além de apresentar toxicidade a mamíferos, causar a seleção de insetos resistentes, eliminar populações de inimigos naturais, este deixar resíduos nos alimentos e contamina o meio ambiente (CANEPPELE; SANTAELLA, 2010; PAULIQUEVIS; FAVERO, 2015).

3.2 Inseticidas Químicos

Os problemas relacionados aos efeitos do uso dos inseticidas sintéticos constituem um problema reconhecido mundialmente e agravado pela utilização inadequada dos mesmos, como intoxicação em trabalhadores rurais que manipulam e aplicam estes produtos, consumidores de produtos agrícolas, animais domésticos, alimentos, frutos, vegetais, fontes hídricas e o ecossistema como um todo (PIMPÃO 2006; MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

Segundo Carneiro et al. (2012), os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da UFPR, divulgados durante o 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília (DF), em abril de 2012, afirmam que nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (CARNEIRO et al., 2012).

Na safra de 2010, que envolve o segundo semestre e o primeiro semestre de 2011, o mercado nacional de venda de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos (ANVISA, 2012). Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Em 2011 houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas do setor (SINDAG, 2017).

Na safra de 2011 no Brasil, foram plantados 71 milhões de hectares de lavoura temporária (soja, milho, cana, algodão) e permanente (café, cítricos, frutas, eucaliptos), o que corresponde a cerca de 853 milhões de litros (produtos formulados) de agrotóxicos pulverizados nessas lavouras, principalmente de herbicidas, fungicidas e inseticidas, representando média de uso de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (IBGE/SIDRA, 2012; SINDAG, 2017).

Um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos, segundo análise de amostras coletadas em todas as 26 Unidades Federadas do Brasil realizadas pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA (2011).

A busca por novos inseticidas constitui-se um campo de investigação amplo. A grande variedade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle dos insetos (SANTOS et al., 2010). O uso de substâncias de origem vegetal no controle de pragas de grãos armazenados é uma alternativa muito promissora (RETELLO; MENEGATTI; MOSSI, 2009).

Portanto, diante toda a problemática referente a utilização dos inseticidas químicos, são necessárias novas substâncias que sejam efetivas no controle de pragas mas, que ofereçam segurança e também sejam economicamente viáveis e aplicáveis em programas integrados de controle de insetos, além de possuir baixo impacto ambiental (VIEGAS, 2003).

3.3 Inseticidas Vegetais

Devido aos problemas causados pelo uso indiscriminado de inseticidas sintéticos, nos últimos anos, tem aumentado o interesse pelos inseticidas vegetais para o controle de pragas. Os problemas decorrentes da utilização de inseticidas sintéticos apontam para a necessidade de se desenvolver novos tipos de agentes de controle mais seletivos e menos agressivos ao homem e ao meio ambiente (KIM et al., 2003; MENEZES, 2005).

Nos ambientes naturais os vegetais estão expostos a um grande número de inimigos naturais, esses podem ser: vírus, bactérias, fungos, nematóides, ácaros, insetos, mamíferos e outros animais herbívoros. Naturalmente, as plantas não podem

se proteger desses organismos se deslocando, por esse motivo, elas dispõem de alternativas para a sua proteção. As estratégias de defesa das plantas contra esses organismos podem ser, através de defesas químicas ou defesas físicas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Inseticidas vegetais são compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas (KIM et al., 2003). Algumas plantas, ao longo da sua evolução desenvolveram sua própria defesa química contra os insetos sintetizando metabólitos secundários, com propriedades inseticidas ou repelentes (RIBEIRO et al., 2010; VENDRAMIM; CASTIGLIONI; GUEDES, 2000).

Os metabólitos secundários das plantas são compostos químicos não necessários para a sobrevivência imediata da célula, servindo como uma vantagem evolucionária para a sua sobrevivência e reprodução (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Os princípios ativos inseticidas podem derivar de toda a planta ou partes dela podem ser o próprio material vegetal, normalmente, moído até ser reduzido a pó, ou produtos derivados por extração aquosa ou com solventes orgânicos (MENEZES, 2005).

As plantas desenvolveram um grande número de produtos químicos de origem do metabolismo secundário, um verdadeiro arsenal químico eficaz para atuar na sua própria defesa, a fim de minimizar os danos causados por seus predadores (ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

Extratos de plantas estão sendo pesquisados, e em grande parte já com efeito comprovado, para o controle de pragas (GONÇALVES; BLEICHER, 2006). Podem agir de diferentes formas causando impactos variáveis, como repelência, inibição alimentar e de oviposição, alterações no sistema hormonal, distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases de desenvolvimento do inseto (FERNANDES et al., 2006).

Para Amoabeng et al. (2014), os extratos de plantas com atividade contra insetos oferecem uma alternativa mais segura para a gestão de pragas, geralmente também são mais seguros para organismos não-alvo, o que os torna preferível com relação aos inseticidas sintéticos.

O emprego de plantas com potencial inseticidas tem inúmeras vantagens quando comparada ao emprego de sintéticos uma vez que são obtidos de recursos

naturais renováveis, não persistem no ambiente, esses pesticidas são de fácil acesso e não deixam resíduos em alimentos e possuem baixo custo financeiro (ROEL, 2001).

Pesquisas com plantas inseticidas são realizadas com o objetivo de descobrir moléculas com atividade contra insetos que permitam a síntese de novos produtos inseticidas e a obtenção de inseticidas naturais para o uso direto no controle de insetos-praga (SANTOS et al., 2010).

3.4 Família Annonaceae

As anonáceas representam um nome genérico para designar as plantas da família Annonaceae, que englobam um grupo de frutíferas de importância econômica em diversos países, como Chile, México, Venezuela, Austrália e Brasil. No Brasil, estas plantas são encontradas desde o Norte do país até o Estado de São Paulo (SOBRINHO, 2014).

Economicamente esta família tem uma importância considerável como uma fonte de frutos comestíveis, matéria prima para a indústria de cosméticos e perfumes, e como medicamentos (COSTA et al., 2008).

As Annonaceae são uma família pantropical composta por árvores, arbustos, subarbustos, com casca fibrosa e madeira com amplos raios. Suas folhas são simples, alternas e dísticas, com pecíolo reduzido e sem estípulas. Elas desempenham um papel ecológico importante em termos de diversidade de espécies, principalmente em ecossistemas de floresta tropical (CHATROU et al., 2012).

É a família com maior número de espécies. Até o momento, são descritos e reconhecidos 109 gêneros e 2.440 espécies, e estão classificadas em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae, estas subfamílias representam os principais grupos da família revelados em filogenias até o momento (CHATROU et al., 2012).

Na região neotropical, são encontrados 34 gêneros (COUVREUR et al., 2012). Onde predominam os gêneros *Annona* L., *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil. e *Xylopia* L. (ALMEIDA et al., 2014).

No Brasil foram encontradas 29 gêneros e 392 espécies. Sendo que destes, 3 gêneros e 162 espécies são endêmicas. No estado do Amazonas são encontrado 24

gênero 203 espécies, deste total 1 gênero e 32 espécies são endêmicas do estado (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2016).

A família das Annonaceae está distribuída em vários gêneros, que são ricos em espécies, entre estes estão os cinco gêneros desta família, (*Guatteria*, *Uvaria*, *Annona*, *Xylopia* e *Goniothalamus*, listados em ordem decrescente de diversidade), compreendendo nestes mais de um terço de todas as espécies da família (TANG; THOMAS; SAUNDERS, 2015).

3.4.1 Gênero *Annona*

O gênero *Annona*, é muito apreciado no Brasil, por fornecer frutos comestíveis, como *Annona crassiflora* (araticum), *Annona squamosa* (fruta-do-conde) e *Annona muricata* (graviola). Os frutos são normalmente consumidos *in natura* ou usados em sucos, sobremesas e sorvetes. Casca, folhas, raízes, frutos e sementes de espécies de *Annona* têm sido utilizados na medicina popular contra diabetes, malária e infecções (LIMA et al., 2012).

O gênero *Annona* L. compreende cerca 162 espécies de árvores e arbustos (CHATROU et al., 2012). No Brasil, ocorrem 82 espécies; destas, 24 são endêmicas, estando distribuídas em florestas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. No estado do Amazonas o gênero *Annona* é representado por 27 espécies (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2016).

3.4.2 *Annona mucosa* (Jacq.)

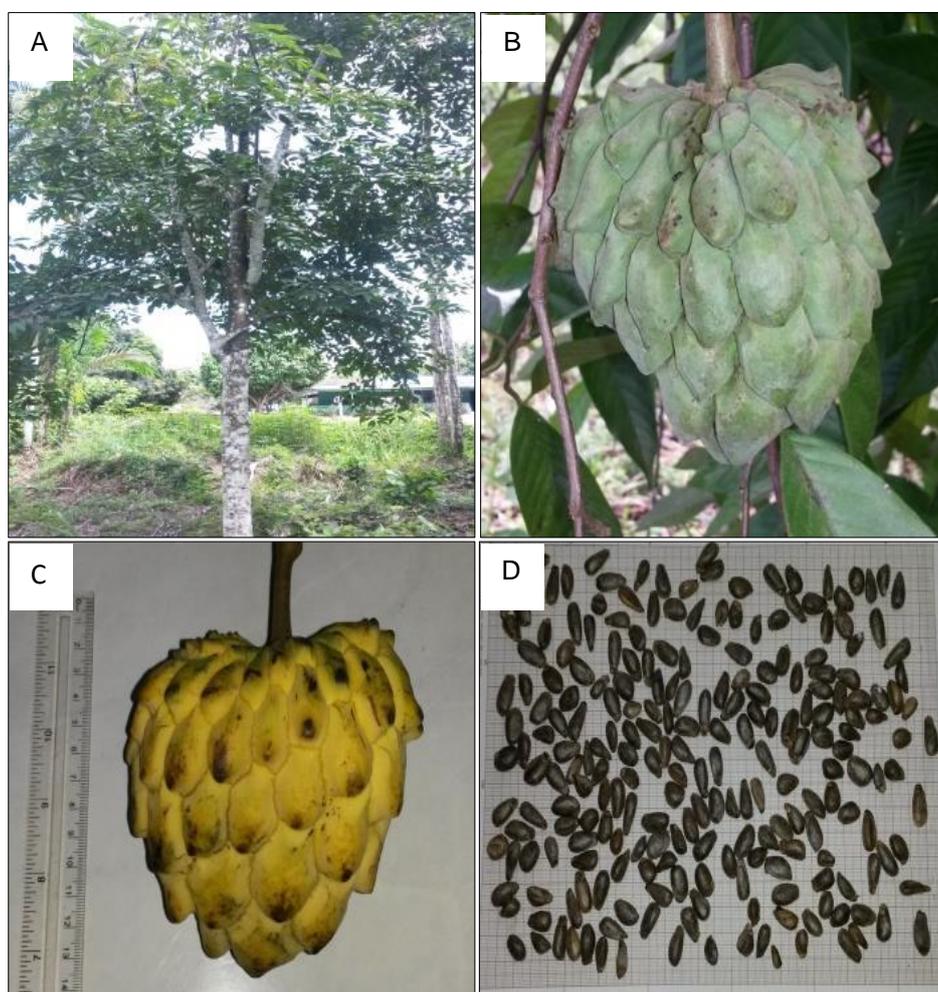
Entre as Annonaceae, *A. mucosa* (Jacq.) que era agrupada no gênero *Rollinia* (RAINER, 2007), é uma árvore frutífera nativa da Amazônia e da Mata Atlântica, popularmente conhecida como "biribá", desenvolve-se bem em diferentes habitats no qual o Brasil se apresenta como o centro de sua origem (FERREIRA et al., 2010; LORENZONI et al., 2014).

A espécie *A. mucosa* (Jacq.) apresenta diversos nomes populares tais como: Araticum, Biribá, Consessa, Fruta da Komdessa, Fruta-do-conde e Graviola brava. Sua distribuição no Brasil encontra-se: na região norte nos estados do Acre, Amazonas e Pará. No Nordeste no estado da Bahia. No Centro-Oeste no estado de

Mato Grosso. No Sudestes nos estados de Minas gerais, Rio de Janeiro. E no Sul no estado de Rio Grande do Sul (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2016).

Esta planta pode atingir altura média de 8 metros e seu fruto, quando maduro, é de coloração amarela, globoso, composto por diversas partes hexagonais, muito unidas, dando um aspecto característico; sua polpa varia de esbranquiçada a creme, com muitas sementes de cor escura; possui um aroma agradável, o fruto pode pesar até 1,3 kg (Figura 3), (FERREIRA et al., 2010).

Figura 3: Espécie vegetal de *Annona mucosa*. A) árvore. B) fruto verde. C) fruto maduro. D) sementes.



Estudos fitoquímicos e farmacológicos revelaram a presença de diversos grupos de metabólitos como acetogeninas, alcaloides, amidas como os principais constituintes presentes nas diferentes estruturas da *A. mucosa* (RIBEIRO et al., 2013).

Uma série de compostos isolados a partir desta espécie têm mostrado atividades antimicrobianos, antifúngicos, antiprotozoários, e potencial antitumoral. O que tem gerado o interesse, na avaliação do potencial dos derivados de *A. mucosa* como fonte de aleloquímico, com propriedades inseticidas que podem ser utilizados no controle de insetos pragas, de grande importância econômica, que atacam grãos armazenados (RIBEIRO et al., 2013).

3.5 Atividade inseticida associada à família Annonaceae

Na literatura, são relatadas 42 espécies desta família com potencial inseticida, distribuídas em 14 gêneros (*Annona*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Cardiopetalum*, *Dennettia*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Monodora*, *Mkilua*; *Oxandra*, *Polyathia*, *Rollinia*, *Unonopsis* e *Xylopia*) com destaque para as espécies *Annona muricata* Linnaeus (graviola) e *Annona squamosa* Linnaeus (fruta-do-conde, pinha) que atualmente são as espécies mais utilizadas para estudos de potencial inseticida (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

Os estudos de avaliação da atividade inseticida com esta família foram realizados, sobretudo, com as principais ordens de insetos consideradas pragas, com destaque para Lepidóptera, Coleóptera, Hemíptera, Díptera e Blattodea. A quantidade de espécies de insetos estudadas sob a ação destas plantas é de 65, distribuídos entre as ordens Díptera (17 espécies); Lepidóptera (19 espécies), Coleóptera (16 espécies); Hemíptera (11 espécies) e Blattodea (2 espécies) (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

Os estudos de Llanos et al. (2008), em que analisaram o efeito inseticida dos extratos das sementes de *Annona muricata*, obtidos por extração a frio, maceração com solventes de diferentes polaridades, hexano, acetato de etila e etanol através da ingestão e aplicação tópica, sobre adulto de *S. zeamais* mostraram-se bastantes promissores.

No método de aplicação tópica, o extrato em hexano apresentou maior atividade em relação aos outros, em uma concentração de 50.000 ppm, obteve 100% de mortalidade a partir de 48 horas. Pelo método de ingestão o extrato que apresentou melhor atividade inseticida foi obtida com acetato de etila a uma concentração de 5.000 ppm com 97% de mortalidade com 72 horas após o início do tratamento (LLANOS; ARANGO; GIRALDO, 2008).

Nos estudos de Ashok Kumar et al. (2010) para avaliar a atividade inseticida do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa*, foi verificado que o extrato ocasionou mortalidade significativa, contra *Sitophilus oryzae*, uma importante praga que ataca grãos armazenados.

Estudos realizados por Asmanizar; Idris (2012) para avaliar a bioatividade de extratos brutos das sementes de *A. muricata* sobre *S. Zeamais*, utilizando extratos obtidos por extração em aparelho Soxhlet usando como solvente acetona, o resultado dos estudos mostraram que o extrato bruto das sementes *A. muricata* são promissoras como inseticida botânico para o controle deste inseto.

Segundo Uken et al. (2012), as duas espécies de *Annonacea*, *Xylopia aethiopica* e *Dennettia tripetala*, tiveram resultados satisfatórios nos ensaios de mortalidade. Os resultados indicaram que tanto os extratos quanto o óleo essencial de ambas as plantas causaram de forma significativa a mortalidade dos gorgulhos adultos e a redução no surgimento progênie F1.

De acordo com Ribeiro et al. (2013), nas avaliações da bioatividade de extratos e frações obtidos de diferentes estruturas (folhas, ramos e sementes) de *A. mucosa* sobre *S. zeamais*. Os resultados preliminares afirmam que as frações em hexano e diclometano apresentaram as maiores médias de mortalidade sobre *S. zeamais*. Em seguida foram conduzidos os estudos fitoquímicos e de fracionamento, os quais revelaram a presença de alcalóides e acetogeninas, estes compostos podem estar envolvidos com a bioatividade desta planta, sobre *S. zeamais*.

Em experimentos realizados para verificar a eficácia dos extratos das sementes de *Annona squamosa* e *Annona muricata* (Annonaceae) para o controle do *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* (Culicidae), foram bastantes promissoras, nos quais afirmam que os extratos das sementes destas duas plantas podem ser utilizadas como agentes de controle dos mosquitos (RAVAOMANARIVO et al., 2014).

Nos estudos de Rodrigues et al. (2014) para testar a eficiência de extratos hexânicos de *Annona muricata* L. (Annonaceae) no controle de *A. craccivora* no feijão-caupi cultivar Gurguéia, foram avaliados os efeitos dos extratos hexânicos das folhas e das sementes de *A. muricata* em condições de laboratório, sobre a mortalidade dos afídeos. Os resultados desses estudos comprovam que os extratos hexânicos de sementes de *A. muricata* causaram mortalidade significativa dos insetos.

Nos ensaios utilizando extratos etanólicos preparados a partir das folhas, ramos, e sementes de Annonaceae (*Annona Cacans* Warming, *Annona montana* Macfadyen, *Annona mucosa* Jacquin, *Annona reticulata* Linnaeus, *Annona sylvatica* A. St.-Hil., e *Duguetia lanceolata* A. St.-Hil.) para detectar fontes promissoras de compostos com atividade sobre a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é possível determinar que o extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* foi o tratamento mais ativo, causando toxicidade aguda significativa e inibição do crescimento larval (ANSANTE et al., 2015).

3.6 Constituintes químicos da família Annonaceae

Do ponto de vista fitoquímico, a família Annonaceae se destaca pelos variados tipos de metabólitos secundários. Como os alcalóides (ALIAS et al., 2010; KOUAM et al., 2014; MIREKU; MENSAH; MENSAH, 2016), terpenóides (BOYOM et al., 2011; SOUSA et al., 2014), flavonóides (SOMANAWAT et al., 2012; PRAWAT et al., 2012; GALLE et al., 2013), esteróides (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2005; SCOTTI et al., 2012), e acetogeninas (CHEN et al., 2012; LIU et al., 2014; MIAO et al., 2016).

Os estudos sobre fitoquímica e atividade biológica das anonáceas estão sendo intensificados devido à presença das acetogeninas que são uma classe de compostos com ampla atividade biológica, (MATSUMOTO et al., 2010; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014).

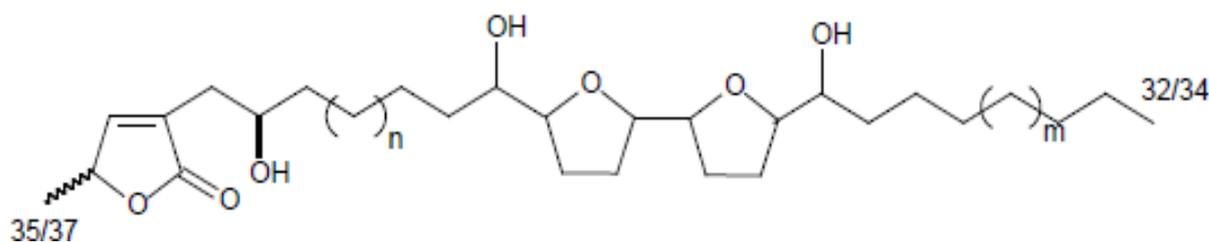
3.7 Acetogeninas

As acetogeninas constituem uma classe de produtos naturais promissora como protótipos de agentes inseticidas, sendo encontradas nas cascas de galhos e raízes, e, principalmente, em sementes de plantas da família Annonaceae (BERMEJO et al., 2005; CASTILLO-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ-OSORNIO; DELGADO-HERRERA, 2010; KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

Essa classe de produtos naturais se caracteriza por uma longa cadeia hidrocarbônica (Figura 4), geralmente, C-35 ou C-37, sustentando um anel γ -lactônico terminal, anéis tetra-hidrofurânicos ou tetra-hidropirânicos, epóxidos ou ligações duplas, e vários constituintes oxigenados (BERMEJO et al., 2005). São originadas

pela condensação de unidades de AcetilCoa através da rota biossintética do acilpolimalonato (SIMÕES et al., 2010).

Figura 4: Estrutura geral das acetogeninas.



Fonte: BERMEJO et al., 2005.

São descritas na literatura mais 400 acetogeninas, isoladas de sementes, frutos, caules e folhas da planta, sendo que muitas delas com suas estruturas químicas já estabelecidas, com predominância dos compostos descritos para o gênero *Annona* (MATSUMOTO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013). Como as acetogeninas de anonáceas, annosquamin B, a ACG bis-tetrahidrofurânica (bis-THF) adjacente, bullatacina e a ACG bis-THF não adjacente, annosquatin B isoladas de *Annona squamosa* (CHEN et al., 2013).

Alguns tipos de acetogeninas são caracterizados com base nos grupos funcionais presentes em sua estrutura. Essa funcionalidade confere uma grande atividade biológica, com propriedades citotóxicas, antiparasitária, pesticida, antimicrobiana, imunossupressora e antitumoral (BERMEJO et al., 2005; LIMA; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010).

Estudos sobre o mecanismo de ação mostraram que as acetogeninas são potentes inibidores respiratórios de insetos, superiores àqueles inibidores clássicos, como a rotenona e a piericidina A. Essas substâncias agem como inibidoras do complexo I (NADH) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial promovendo apoptose e levando à redução das taxas respiratórias e cardíaca (GALLARDO et al., 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação de *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855.

A população de *S. zeamais* foi estabelecida a partir de exemplares existentes de uma população mantida no laboratório de Zoologia (ISB-Coari). Os indivíduos foram criados em frascos de plástico com capacidade de dois litros, contendo grãos de milho (*Zea mays* L.) comercial, classe mesclado, tipo 2, grupo semiduro, que foram utilizados como substrato para a criação (Figura 5).

Figura 5: Criação de *S. zeamais* em frascos de plástico.



Os frascos foram devidamente fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com tecido fino (*voile*) para permitir as trocas gasosas. O confinamento dos insetos foi realizado durante 15 dias para efetuarem a postura e, em seguida, foram retirados e os recipientes armazenados até a emergência dos espécimes da geração F₁ seguindo a metodologia de Coitinho et al. (2011). A criação foi mantida para fornecer adultos entre 10 e 20 dias de idade em quantidade suficientes para realização dos bioensaios.

4.2 Obtenção do material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada em uma área localizada no Km 14 da estrada Coari-Itapéua (Lat: 04°06', 21''S, Long: 66°02', 09'' O). O clima da região de Coari apresenta um ciclo sazonal de distribuição de precipitação bem característico,

alternando uma estação seca de junho a novembro e uma estação chuvosa de dezembro a maio. A vegetação é composta por palmeiras, arvoretas, ervas e árvores altas e finas, troncos retos e copas globosas (PRUDENTE et al., 2010). A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Valdely Ferreira Kinupp - Fundador-Curador do Herbário EAFM – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM-CMZL) – Campus Manaus. Uma exsicata foi depositada no herbário do EAFM sob o número 16109 e o fruto na carpoteca número C1319.

4.3 Método de coleta

O material vegetal foi coletado com a utilização de tesouras de poda e podão. Após a aquisição, os frutos maduros foram devidamente higienizados em água corrente e separados os resíduos de suas respectivas polpas. Posteriormente, os resíduos foram limpos, secos em estufa de madeira, com lâmpadas internas para aquecimento a 40 °C até a obtenção do peso constante, este procedimento visava à retirada do excesso de umidade com objetivo de evitar sua deterioração pelos fungos (BARBOSA, 2015). Em seguida o material desidratado foi triturado em um moinho de quatro facas tipo Willey (Figura 6), até se obter um fino pó das sementes, que foram armazenados, em fracos de vidros hermeticamente fechados e mantidos refrigerados aproximadamente -10 °C a até sua utilização (RIBEIRO et al., 2015).

Figura 6: Moinho de quatro facas tipo Willey



4.4 Obtenção dos extratos orgânicos

O preparo dos extratos foi realizado com o acompanhamento da equipe de pesquisa do Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia - Q-Bioma, na UFAM em Manaus, Amazonas. Os extratos orgânicos foram obtidos por meio da técnica de maceração em solvente etanol seguindo a metodologia de Yang et al. (2009). A extração por maceração a frio (MF), foi realizada a temperatura ambiente, (aproximadamente 25°C).

Para o preparo da solução (pó vegetal + etanol) foram necessário 668 g dos resíduos triturados que foram depositados em um Erlenmeyer (2,0 L de capacidade) e imersos em 800 mL de etanol 96% (quantidade suficiente para cobrir todo o material vegetal. Em seguida, com auxílio do Agitador Multifuncional VDRL (*Kline*), a solução foi agitada por 10 minutos e mantida em repouso por 48 h. Após esse período, o macerado foi submetido a filtração simples, conforme descrito na Figura 7.

Figura 7: Filtração simples



O material residual remanescente foi novamente submetido à extração utilizando-se as mesmas proporções pó vegetal:solvente. Esse procedimento foi repetido por três vezes, totalizando seis dias de extração. O solvente remanescente na amostra filtrada foi eliminado em Rotaevaporador (Figura 8) em temperatura de 40 °C e pressão: -600 mmHg. Foi reutilizado o solvente recuperado.

Figura 8: Rotaevaporador



Após a eliminação do solvente, os extratos permaneceram na capela para eliminação do solvente. Em seguida, os extratos foram congelados e concentrados em liofilizador onde ocorre a retirada da água, que passa da fase sólida para a gasosa através de vácuo, deixando apenas o extrato vegetal bruto, conforme descrito na Figura 9. Posteriormente o material concentrado (desidratado) foi pesado para o cálculo do rendimento.

Figura 9: Liofilização dos extratos



4.5 Partição líquido-líquido dos extratos

A partição líquido-líquido, também conhecida como extração por solvente ou partição, é um método para separar compostos baseados em suas diferentes solubilidades em dois líquidos imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico (RIBEIRO et al., 2013). Desta forma, o extrato seco (concentrado) obtido na etapa anterior, foi solubilizado em metanol:água, na proporção (8:2). Em seguida submetido à partição líquido-líquido, utilizando-se um funil de separação e solventes orgânicos de polaridades crescentes, Hexano e Acetato de Etila (Figura 10), seguindo a metodologia adaptada de Yang et al. (2009).

Figura 10: Partição líquido-líquido.



As partições (frações) obtidas foram concentradas em rotaevaporador sob as mesmas condições de temperatura e pressão já mencionadas anteriormente. A determinação dos rendimentos foi realizada baseada nas massas dos respectivos extratos brutos.

4.6 Testes preliminares

Para a escolha das concentrações teve-se como base os resultados dos testes preliminares, a partir dos quais chegou-se nas respectivas concentrações utilizadas no bioensaios.

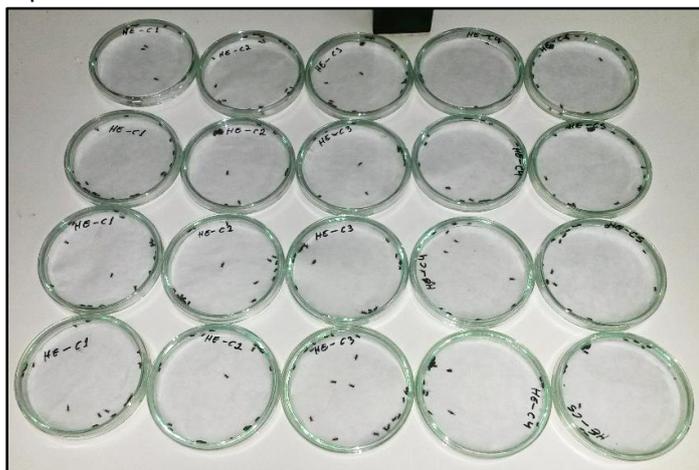
4.6.1 Bioensaios

Os experimentos foram conduzidos durante cinco dias para o teste de contato em superfície contaminada e dez dias para o teste de ingestão de grãos tratados com extratos, ambos à temperatura de $27,4 \pm 1,9$ °C, e umidade relativa de $61,5 \pm 7,0\%$. Nos bioensaios de ingestão foram utilizados grãos de milho como substrato. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em ambos os ensaios de mortalidade (superfície contaminada e ingestão de grãos).

4.6.2 Avaliação da atividade inseticida em superfície contaminada

Os ensaios de contato em superfície contaminada seguiram a metodologia proposta por Huang et al. (1997) e Huang; Ho (1998) com modificações de Tavares; Vendramim (2005). Nesse bioensaio, foram utilizadas placas de Petri de vidro (90 mm de diâmetro x 10 mm de altura) contendo papel de filtro com 90 mm de diâmetro (Figura 11). Com auxílio de uma pipeta automática, foi possível aplicar sobre os discos de papel-filtro 1,0 ml dos extratos orgânicos das sementes de *A. mucosa* em cada placa de acordo com as concentrações estabelecidas para cada tratamento.

Figura 11: Placas de Petri com papel filtro no ensaio de superfície contaminada.

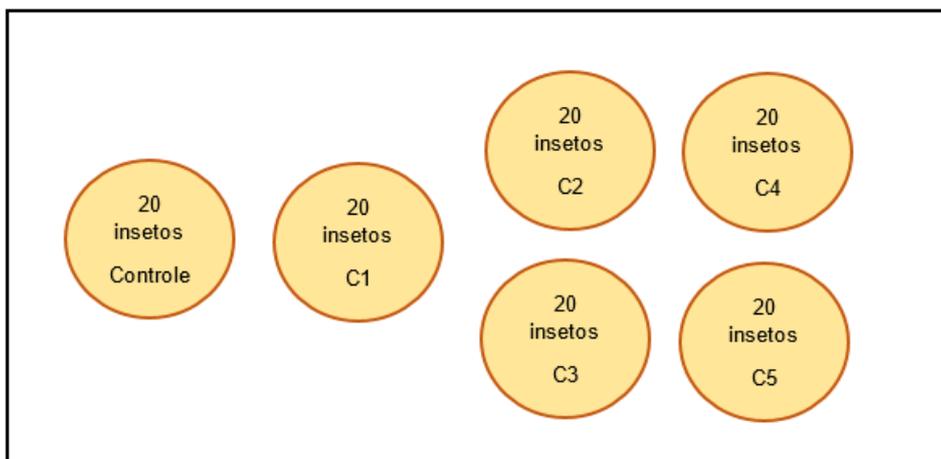


As placas foram expostas a temperatura e umidade mencionadas no item 4.6.1 por um período de uma hora para que ocorresse a secagem dos extratos no papel-filtro. Após este período, foi realizada a transferência de 20 insetos de *S. zeamais*

adultos não-sexados com 10 a 20 dias para cada placa de Petri utilizada no ensaio. Posteriormente, as placas foram identificadas e tampadas, para evitar a fuga dos insetos. Após cinco dias da aplicação do bioensaio, foi possível contabilizar os indivíduos mortos, nos quais foram considerados mortos os indivíduos que apresentaram ausência total de movimento.

Para realização do ensaio experimental de contato em superfície contaminada (Figura 12), foi avaliado um extrato e duas frações, sendo que tanto para o extrato quanto para as frações foram utilizadas cinco concentrações diferentes: 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 e 5.000 ppm. Para cada concentração foram realizadas quatro repetições. No experimento com o grupo controle a substância utilizada para impregnar o papel filtro, ao invés do extrato, utilizou-se o próprio solvente utilizado na ressuspensão do extrato (em experimentos com extrato etanólico a substância utilizada no controle foi o solvente etanol).

Figura 12: Desenho experimental do bioensaio de contato em superfície contaminada



4.6.3 Avaliação da atividade inseticida por ingestão de grãos tratados com extratos orgânicos.

Os experimentos de ingestão tiveram como base os trabalhos realizados por Llanos; Arango; Giraldo (2008) com modificações de Barbosa (2015). Nesse experimento, foram utilizados frascos plásticos de 250 mL de capacidade nos quais foram pesados e transferido para o seu interior 20 g de milho comercial, classe mesclado, tipo 2, grupo semiduro (Figura 13). Em seguida, 2,0 mL dos extratos das

sementes de *A. mucosa* foram pipetados de acordo com as concentrações propostas para cada tratamento sobre a massa dos grãos de milho. Posteriormente, os frascos foram agitados por um minuto para que pudessem ser homogeneizados e expostos por uma hora para a secagem dos extratos à temperatura de $27,4 \pm 1,9^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $61,5 \pm 7,0\%$.

Figura 13: Frascos plástico com grãos de milho tratados no ensaio de ingestão



Após esse período, foram transferidos para os frascos 20 adultos não-sexados de *S. zeamais* com 10 a 20 dias de idade, os frascos foram vedados com tampa plástica perfurada e com tecido *voile*, conforme descrito na figura 13. Essa vedação permitiu a livre passagem de ar e impediu a fuga de *S. zeamais*. Após 10 dias da aplicação do bioensaio, foram contabilizados os indivíduos mortos que foram aqueles que apresentaram ausência total de movimento.

Para a realização do bioensaio de ingestão de grãos (Figura 14), foi avaliado um extrato e duas frações, sendo que tanto para o extrato quanto para as frações foram utilizadas cinco concentrações diferentes: 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 e 5.000 ppm. Para cada concentração foram realizadas quatro repetições. No experimento com o grupo controle ao invés do extrato, utilizou-se o próprio solvente utilizado na ressuspensão do extrato (em experimentos com extrato etanólico a substância utilizada no controle foi o solvente etanol).

Figura 14: Desenho do experimento, bioensaio de ingestão de grãos.



4.7 Análises dos dados

Foram realizadas análises dos pressupostos necessários para escolha do tipo de teste estatístico a ser utilizado. A independência dos dados foi verificada com o teste de Durbin Watson (DURBIN e WATSON, 1971), bem como a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett (BARTLETT, 1937), e a normalidade de resíduos foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965).

A partir desta verificação foi possível separar as análises em: dados que apresentaram distribuição normal e que foram submetidos à análise de variância – ANOVA (ZAR, 1984). Dados que não apresentaram normalidade, mesmo após passarem pela transformação de potência máxima de Box-Cox (BOX; COX, 1964) e que foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-willis.

Os valores médios das taxas de mortalidade em cada tratamento foram comparados seguidos pelo teste de comparação múltipla (teste de Duncan) que foram usados para comparar as médias dos tratamentos com o controle. Todos os testes com a nível de confiança de 95%, para análise entre as médias de dois grupos, optou-se pelo teste da Mínima Diferença Significativa (MDS), nível de confiança de 95%. Essas análises foram realizadas no programa versão R-3.1.1, 2014.

Nas frações mais promissoras foi realizado o teste de Correlação de Pearson (IC 95%) para avaliar o grau de relacionamento entre as variáveis concentração e mortalidade. Para a realização dessas análises foi utilizado o programa *Bioestat* - versão 5.3. Finalmente, os valores da CL_{50} para os dados que apresentaram maior interesse foram determinados pelo método de Probit (Finney, 1971) nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do rendimento de extração

O extrato do resíduo vegetal foi obtido pela técnica de maceração que utilizou-se como solvente o etanol, obtendo-se um rendimento de 14% conforme descrito na Tabela 1. O rendimento dos extratos de sementes de *Annona* pode ser explicado pela presença de óleo, que apresenta como constituinte majoritário os triacilgliceróis, e que podem ser extraídos com etanol (BRANCO et al., 2009).

Tabela 1 - Rendimento do extrato orgânico obtido pelo processo de maceração, estrutura vegetal e espécie utilizada.

Espécie	Estrutura	Material Vegetal (g)	Solvente	Rendimento	
				(g)	(%)
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	668	Etanol 96%	95	14

Segundo Brito (2014), o etanol permite que praticamente todos os constituintes de interesse sejam extraídos, já que a grande maioria apresenta alguma solubilidade em misturas etanólicas. Além disso, a utilização de solventes obtidos de fontes naturais, que são biodegradáveis e produzidos por fontes renováveis adequam-se aos preceitos da química verde.

Existem diversos fatores que influenciam no processo do rendimento da extração, tais como: o método de extração, o solvente empregado (ROCKENBACH et al., 2008; BIMAKR et al., 2011), os estágios fenológicos das espécies e de suas variações fisiológicas sazonais no acúmulo e síntese de compostos orgânicos (BORELLA et al., 2006; STEFANELLO et al., 2010), as peculiaridades do ambiente de cultivo das espécies (FIGUEIREDO et al., 2007) e da variação genética intraespecífica (RIBEIRO, 2010).

Outro fator interferente no rendimento da extração é o tamanho das partículas do material vegetal processado, quanto menor o tamanho das partículas do material vegetal o solvente pode atuar em maior contato com a área superficial (LAROZE; SOTO; ZÚÑIGA, 2010). Desta forma, inúmeros fatores podem interferir nos rendimentos dos extratos, e que a otimização das condições de extração proporciona

o maior rendimento de extração. Assim, o comportamento dessa variável assume difícil comparação entre estudos disponíveis na literatura (MENDES, 2012).

De acordo com Rockenbach et al. (2008), além do rendimento, existe uma grande variação na composição dos extratos em função do sistema solvente utilizado. Para Ribeiro (2010), a concentração relativa das possíveis substâncias bioativas nos respectivos extratos brutos é outro aspecto que deve ser considerado, o que pode não condizer com os maiores rendimentos obtidos. Assim, tal variável deve ser analisada conjuntamente com as doses necessárias para produzir os efeitos bioativos que justificam o emprego dos referidos compostos no manejo integrado do inseto-praga alvo do estudo.

5.1.2 Avaliação do rendimento das frações

Para a avaliação do rendimento das frações, foi retirado 5 g do extrato obtido pelo método de maceração, solubilizado em metanol/água (8:2) e submetido a partição com hexano e acetato de etila, obtendo-se uma fração hexânica de 3,0 g e uma em acetato de etila de 1,5 g respectivamente (Tabela 2). O maior rendimento da fração foi obtido com solvente que apresenta maior polaridade neste caso o hexano seguido do acetato de etila.

Tabela 2- Rendimento das frações orgânicas obtidas pelo processo partição com hexano e acetato de etila.

Espécie	Estrutura	Material Vegetal (g)	Solvente	Rendimento	
				(g)	(%)
<i>Annona mucosa</i>	Sementes	5	Hexano	3	60%
			Acetato de etila	1,5	30%

O alto rendimento dos extratos em hexano obtido nesse estudo, a partir das sementes das *Annona* avaliadas, é decorrente do alto teor de óleo nessa estrutura vegetal, o qual é majoritariamente extraído pelos solventes mais apolares no sistema de extração empregado. Estudos de Ribeiro (2010) e Lima et al. (2012) afirmam que as espécies do gênero *Annona* acumulam significativas quantidades de óleo nas sementes, as quais vêm sendo pesquisadas para utilização na produção de bioenergia e de óleos alimentícios.

Em experimentos com espécies do gênero *Annona*, os testes histoquímicos das secções tratadas com corantes, evidenciaram a presença de lipídios nas sementes devido à reação positiva ao teste com Sudan IV, em proporção maior do que proteínas, carboidratos e compostos fenólicos, o que pode ser indício de que a principal reserva energética das sementes do biribazeiro seja de origem lipídica (SOARES et al., 2014).

Estes dados são semelhantes aos resultados obtidos por Masruri et al. (2012) e Abdualrahman et al. (2016), os quais verificaram que as sementes de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, respectivamente, possuem maior teores de lipídios em detrimento das proteínas e dos carboidratos. As sementes têm sido estudadas quanto à composição química de suas reservas, e tal interesse não se dá apenas por seu teor nutritivo, mas por serem úteis na confecção de produtos industrializados (BUCKERIDGE, 2010).

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

Foram utilizados o hexano, acetato e etanol como solventes orgânicos para ressuspensão dos extratos. Primeiramente foram realizados testes com o objetivo de verificar o efeito negativo do solvente sobre a sobrevivência dos insetos.

Nos resultados obtidos, foi possível verificar que não ocorreu efeito significativo de mortalidade sobre a sobrevivência dos insetos em função do uso dos respectivos solventes, levando em consideração as duas vias de exposição, contato e superfície. De acordo com o teste de ANOVA, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre os solventes e seus respectivos controles (Tabela 3 e 4). Com base nos referidos dados, foram utilizados os solventes nos bioensaios em função de não haver interferência significativa dos solventes sobre a sobrevivência dos indivíduos.

Tabela 3 - Mortalidade-resposta para os solventes considerando as vias de exposição, contato por superfície contaminada utilizando o teste ANOVA.

Solventes	Média do solvente	Média do controle	p-valor
Hexano	1,25±1,00	1,00±0,80	0,75
Acetato	1,00±0,82	1,00±0,82	1,00
Etanol	1,00±0,82	0,75±0,50	0,62

Tabela 4 - Mortalidade-resposta para os solventes considerando as vias de exposição, ingestão utilizando o teste ANOVA.

Solventes	Média do solvente	Média do controle	p-valor
Hexano	1,25±0,50	0,75±0,50	0,21
Acetato	1,00±0,82	0,75±0,50	0,62
Etanol	1,25±0,50	1,00±0,82	0,62

De acordo com a literatura, foi observado que os extratos vegetais têm sido ressuspensos em diversos solventes, tais como acetona, água destilada, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e Tween 20®. No entanto, o critério de escolha dos solventes a serem utilizados na ressuspensão de extratos de plantas e metabólitos secundários está focado no menor efeito negativo sobre o organismo alvo (CARVALHO, 2008; CASTILLO; JIMÉNEZ-OSORNIO, 2010; RIBEIRO, 2010).

Os estudos de Ribeiro (2010) corroboram em parte com os resultados obtidos neste trabalho. Nos quais avaliaram o efeito dos solventes orgânicos sobre a sobrevivência dos adultos de *S. zeamais*. Foi possível constatar que os solventes acetona, metanol e etanol (puros) não ocasionaram mortalidade significativa e nem reduziram o tamanho da progênie F1 de *S. zeamais* conforme os parâmetros empregados no referido estudo.

Os resultados dos estudos proposto foram semelhantes aos resultados obtidos por Souza et al. (2010), que realizaram testes preliminares para avaliar o efeito dos solventes (metanol, etanol, clorofórmio e hexano) sobre os adultos de *S. zeamais*. De acordo com os resultados desses estudos, os solventes empregados não afetaram a sobrevivência dos insetos.

Conforme os estudos de Lawal; Opoku; Ogunwande (2015) em que analisaram os extratos das folhas de *Chromolaena odorata* (Asteraceae) com diferentes solventes sobre *S. zeamais*, em experimentos de contato em superfície contaminada. É possível afirmar que os solventes metanol, acetato de etila, clorofórmio e hexano não apresentaram efeito negativo sobre os insetos.

Com base nos dados obtidos por não causarem efeitos significativos e pelo fato de solubilizar os extratos, os solventes foram utilizados na solubilização dos extratos hexano para extrato hexânico, acetato de etila para o extrato acetato de etila e etanol para extrato etanólico, podendo dessa forma, serem empregados para este trabalho como solubilizantes dos extratos vegetais.

5.2 Análises dos bioensaios de mortalidade

Na avaliação da atividade inseticida em superfície contaminada conforme os dados das análises dos resultados descritos na Tabela 5, é possível verificar, com base no teste ANOVA, que os tratamentos à base dos extratos vegetais em acetato e etanol não diferiram estatisticamente entre si, independentemente da concentração testada.

Tabela 5 - Mortalidade de *S. zeamais* em bioensaios da atividade inseticida por superfície contaminada

Extratos/ Concentrações	Mortalidade (%)					p-valor
	1.000 ppm	2.000 ppm	3.000 ppm	4.000 ppm	5.000 ppm	
Sementes/Acetato	13% a	12% a	16% a	20% a	16% a	0,138
Sementes/Etanol	11% a	13% a	14% a	26% a	15% a	0,268
Sementes/Hexano	16% c	25% bc	43% ab	46% a	50% a	1,25x10 ⁻⁵

-p-valor calculado por meio do teste de ANOVA ($p = 0,05$),

-Médias seguidas pela mesma letra na linha as variâncias não diferem entre si, determinado pelo teste ANOVA para semente/acetato e semente/etanol.

-Médias seguidas pela mesma letra na linha as variâncias não diferem entre si, determinado pelo teste Duncan para semente/Hexano.

-Para o extrato Semente/Hexano foi realizada a transformação de box-cox.

-A mortalidade foi corrigida pela fórmula de Schenider-Orelli.

$$MC(\%) = \left(\frac{Mortal.(\%) em T - Mortal.(\%)C}{100 - Mortal.(\%) em C} \right) * 100$$

Melhores resultados para este bioensaio foram observados com a fração em hexano, em que todas as cinco concentrações testadas ocasionaram a mortalidade dos adultos de *S. zeamais*. O nível de toxicidade neste tratamento variou entre baixa e média, a fração em hexano na concentração 5.000 ppm registrou 50% de mortalidade sobre indivíduos adultos de *S. zeamais*, e seu nível de mortalidade foi

considerada média. Os resultados obtidos mostraram que o extrato hexânico obtido das sementes de *A. mucosa* interfere significativamente sobre a sobrevivência dos adultos de *S. zeamais*.

Nos resultados obtidos das frações em acetato de etila e extrato em etanol, os mesmos podem estar associados ao estabelecimento das concentrações, como também a forma de aplicação do extrato.

Com relação aos efeitos dos extratos no teste de mortalidade por ingestão conforme descritos na Tabela 6, os dados referentes a interação dos extratos e a mortalidade do *S. zeamais*, (que foram baseados teste ANOVA) confirmaram que os três tratamentos tiveram resultados promissores.

Tabela 6 - Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios da atividade inseticida por ingestão de grãos

Extratos/Concentrações	Mortalidade (%)					p-valor
	1.000 ppm	2.000 ppm	3.000 ppm	4.000 ppm	5.000 ppm	
Sementes/Acetato	16% c	31% b	40% b	60% a	70% a	1,39x10 ⁻¹⁰
Sementes/Etanol	5% d	27% c	32% c	53% b	86% a	4,3x10 ⁻⁹
Sementes/Hexano	9% d	16% d	46% c	67% b	100 % a	0,0008

-p-valor calculado pelo teste de Kruskal-Wallis (p=0,05) para o extrato semente/Hexano e pelo teste ANOVA (p=0,05) para os demais extratos.

-Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si. Determinado pelo teste de Dunnett para os extratos semente/Acetato e Semente/Etanol, e pelo teste de Wilcoxon para o extrato de Semente/Hexano

Foi observado que as maiores concentrações testadas para a fração em acetato de etila ocasionaram maior número de mortalidade sobre os adultos de *S. zeamais*. Sendo assim, as maiores concentrações de 4.000 e 5.000 ppm controlaram respectivamente 60% e 70% os adultos de *S. zeamais*. Contudo, não existe diferença estatística (determinado pelo teste de Dunnett) entre essas medias.

A maior concentração do extrato etanólico (5.000 ppm) obteve 86% de mortalidade dos insetos e nível de toxicidade estatisticamente diferente da segunda maior concentração (4.000 ppm) que controlou 53% dos insetos. Em relação a fração hexânica, a concentração de 5.000 ppm controlou os adultos de *S. zeamais* em 100% diferenciando estatisticamente da concentração de 4.000 ppm que controlou 67% dos insetos.

As diferenças observadas nos dois tratamentos podem estar relacionadas com a composição química qualitativa dos extratos, das características de lipofilicidade dos

compostos ativos ou mesmo devido a diferenças nos níveis quantitativos dos compostos bioativos de cada extrato (RIBEIRO, 2010).

Os dados mostram que os extratos/frações tiveram melhores resultados por via de ingestão quando comparado ao contato por superfície contaminada. Os resultados mais promissores foram registrados na fração em hexano, que interferiu significativamente sobre a sobrevivência dos adultos de *S. zeamais*, tanto no bioensaio de superfície contaminada quanto por ingestão, seguido do extrato etanólico e da fração em acetato de etila.

Segundo os estudos de Ribeiro (2010), é possível inferir que o grau do contato com os extratos nas diferentes formas de contaminação e as diferentes regiões do corpo dos insetos expostos, pode ter influenciado os resultados observados. Desta forma, recomenda-se que estes extratos/frações sejam analisados em outra forma de aplicação em testes de controle com *S. zeamais*.

Esses estudos são de fundamental importância levando em consideração a grande biodiversidade existente na região amazônica e o baixo número de pesquisas relacionadas ao controle de insetos *S. zeamais* utilizando plantas pertencentes flora amazônica. Outro fator relevante quando se compara aos demais estudos, é o fato do aproveitamento do material vegetal (sementes) utilizado para confecção dos extratos, que são tratados como resíduos no qual são descartados sem qualquer utilização. Portanto, esses estudos além de estar fazendo o reaproveitamento dos resíduos vegetais, está contribuindo para elucidação de um produto de origem amazônica que vem a contribuir para o controle alternativo de insetos, neste caso os *S. zeamais*.

Muitas plantas pertencentes a família Annonaceae, já possuem atividade inseticida comprovada, há registros na literatura de 42 espécies com atividade inseticida comprovada (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014). Desta forma, com base nos resultados obtidos, a espécie de *A. mucosa* demonstrou ser eficiente no controle dos insetos *S. zeamais*, e os resultados desses estudos corroboram em parte com alguns os estudos já descritos.

De acordo com Ribeiro et al. (2013), ao analisarem os extratos de várias estruturas vegetais de *Annona montana* (Annonaceae), *Aristolochia paulistana* (Aristolochiaceae) e *C. sylvestris* (Solanaceae) através de grãos contaminados ingeridos por *S. zeamais*, os extratos hexânico e diclorometânico de semente de *A. montana* foram os mais efetivos para a concentração de 1,5 mg/kg, obtendo-se 100%

de mortalidade após 10 dias; 0,5 insetos emergidos após 60 dias; 2,7 de grãos danificados.

Nesse presente estudo, foi possível verificar que os extratos orgânicos de sementes de *A. mucosa* apresentam efeito de contato e ingestão para *S. zeamais*, com maior eficácia via ingestão. Resultados semelhantes foram descritos por Llanos et al. (2008) com extratos em hexano de sementes de *Annona muricata* L. a 5.000 ppm sobre adultos de *S. zeamais*. Segundo os autores, após 72 horas 27% dos indivíduos morreram por contato, enquanto, 77% indivíduos morreram no ensaio de ingestão.

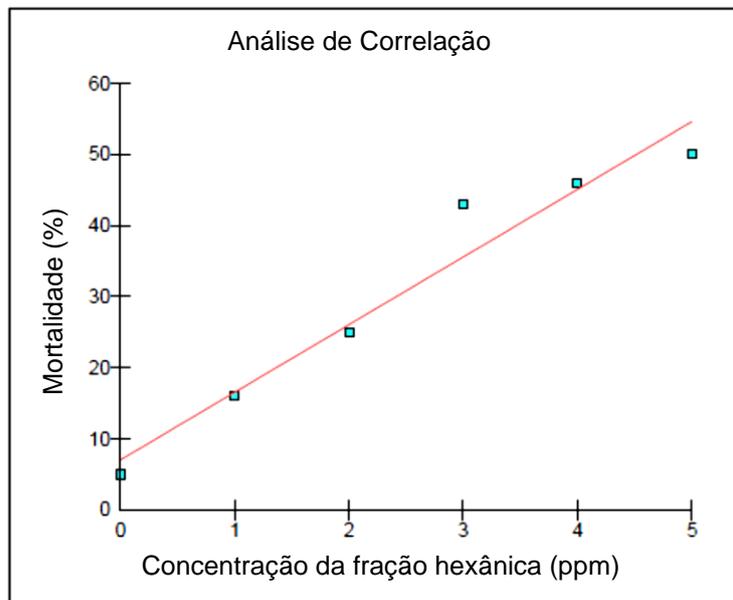
Segundo Martinez (2002), a azadiractina apesar de afetar os insetos por ingestão e contato, em geral é mais eficaz quando ministrada pela via de ingestão. De acordo com Barbosa (2015), em estudos de mortalidade por via de contato e ingestão, foi observado por meio da análise dos dados de mortalidades e de correlação, que as substâncias extraídas dos galhos de *C. javitensis* com diclorometano e aplicadas por meio de ingestão de grãos foi o método mais promissor no controle de *S. zeamais*.

Para Oliveira (2010), os adultos de *S. zeamais* foram mais susceptíveis quando expostos aos tratamentos pela via de ingestão de grãos contaminados em comparação a via de contato em superfície contaminada. A porcentagem de indivíduos mortos por contato se estabeleceu abaixo de aproximadamente 4,0%, ao passo que, nos tratamentos por ingestão os valores encontrados se estabeleceram a partir dos 4%.

Foi observado que nas frações mais promissoras (fração hexânica) em ambos os ensaios que ocasionaram a maior mortalidade, houve uma tendência do aumento da mortalidade em função do aumento da concentração. Esta observação pode ser confirmada por meio da análise de correlação, conforme descrito nas Figuras 15 e 16.

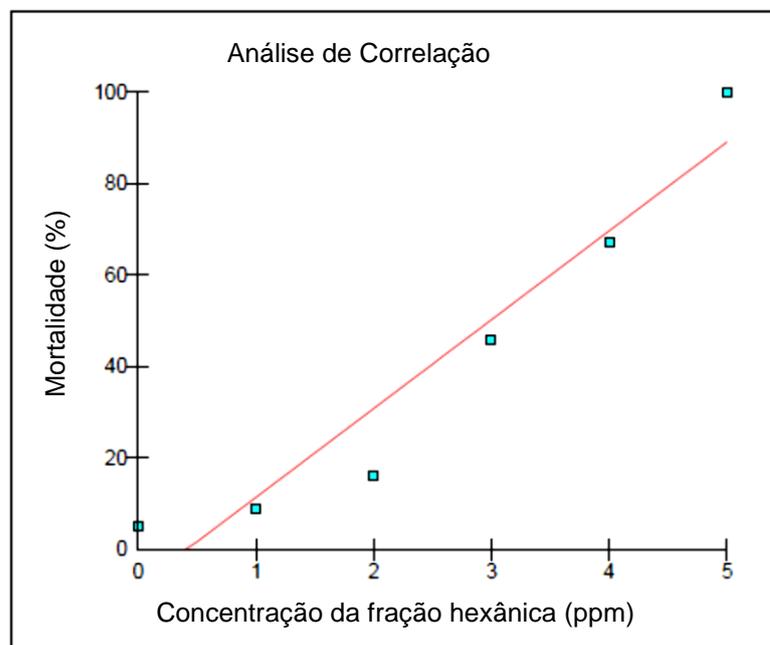
A relação estabelecida entre a fração hexânica das sementes de *A. mucosa* e a mortalidade de adultos de *S. zeamais* nos bioensaios de contato com superfície contaminada é positiva e a mortalidade aumenta em função do aumento das concentrações. De acordo com o coeficiente de correlação, existe uma relação do tipo forte positiva ($r= 0,97$), e o coeficiente de determinação (R^2) aponta que cerca de 95% da variação que ocorre com a mortalidade tem como responsável esta fração e neste tipo de aplicação.

Figura 15: Relação entre mortalidade de *Sitophilus zeamais* e a fração hexânica das sementes de *Annona mucosa* aplicados em superfície contaminada. 0 = controle.



Nos bioensaios de ingestão de grãos a relação também é positiva, a mortalidade cresce com o aumento das concentrações (Figura 20). De acordo com o coeficiente de correlação, existe uma relação do tipo forte positiva ($r= 0,91$), e o coeficiente de determinação (R^2) aponta que cerca de 83% da variação que ocorre com a mortalidade tem como responsável esta fração e nesse tipo de aplicação.

Figura 16: Relação entre mortalidade de *Sitophilus zeamais* e a fração hexânica das sementes de *Annona mucosa* testados através de ingestão de grãos de milho contaminados. 0 = controle.



Com base nos resultados obtidos, foi realizado o teste para estimar a CL_{50} . Usualmente definida como concentração letal mediana (CL_{50}), é por meio desta que é possível determinar a concentração de uma substância que causa a mortalidade da metade dos indivíduos de uma população. Foi realizado o cálculo da (CL_{50}) das frações mais promissoras. Neste caso, a fração em hexano na concentração de 5.000 ppm foi a que ocasionou as maiores porcentagens de mortalidade em ambos os bioensaios.

As análises estatísticas mostraram que a concentração letal média (CL_{50}) das frações hexânicas nos testes de contato e ingestão foram respectivamente de 4.738 e 2.824 ppm como descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultado da estimativa do cálculo da Concentração Letal Média (CL_{50}) das frações hexânica do extrato em etanol das sementes de *Annona mucosa*, por meio da análise de Probit.

	Frações	CL_{50} (ppm)	Intervalo de confiança (95%)	
			Inferior	Superior
1	Hexânica (contato)	4.738	3.801	6.903
2	Hexânica (ingestão)	2.824	1.832	4.337

Os resultados deste estudo corroboram em parte com os resultados obtidos por Llanos et. al. (2008), avaliando a bioatividade do extrato hexânico de sementes de *A. muricata* sobre adultos de *S. zeamais*, em bioensaios de ingestão, foi possível estimar os valores de CL_{50} de 4.009, 3.854 e 3.760 ppm após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente.

Segundo Ribeiro (2010), o modo de contaminação é outra variável que influencia nas concentrações letais. Os extratos metanólicos de sementes de *A. squamosa* e de *A. atemoya* são tóxicos para larvas de terceiro ínstar de *Tricloplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) via ingestão e aplicação tópica, sendo que o extrato de *A. squamosa* foi mais tóxico por meio de ingestão, enquanto que o extrato de *A. atemoya* exerceu maior atividade via aplicação tópica.

São relatados na literatura a utilização de anonáceas no controle de insetos, mostrando que até o momento, apenas 42 espécies de anonáceas possuem informações de atividade inseticida contra pouco mais de 60 espécies de insetos-praga. Estas informações mostram que muita pesquisa ainda é necessária, principalmente para conhecer a atividade inseticida de outras espécies de anonáceas, além de seus efeitos sobre insetos-praga ainda não estudados (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

De acordo com Lima (2007), os novos estudos da fitoquímica, em relação à anonácea, não estão focados apenas nos alcalóides, mas em uma nova classe de compostos extremamente bioativos que são denominadas como acetogeninas de anonácea. Estes compostos possuem variadas ações biológicas e relevantes atividades citotóxica, antitumoral, antiparasitária, imunossupressiva e pesticida.

Com base nos resultados pode-se inferir que, os compostos bioativos estão presentes, nos três extratos/frações estudadas. Um ponto muito importante que deve ser levado em consideração é que tais substâncias foram extraídas com solventes diferentes (etanol, hexano e acetato). Neste sentido recomendamos que os extratos desta planta sejam analisados com o objetivo de identificar quais as substâncias que são de fato responsáveis pela atividade inseticida.

Nos bioensaios realizados observou-se uma diferença na taxa de mortalidade entre os tratamentos e suas respectivas concentrações. Podemos considerar que ocorreu uma variação de baixa para muito alta, com relação aos níveis de toxicidade observados para este estudo.

Devido às propriedades inseticidas, esses extratos naturais podem ser de grande utilidade no manejo do *Sitophilus zeamais* em sementes de milho armazenadas, principalmente em pequenas propriedades rurais, necessitando, portanto, de uma padronização nos processos de coleta, secagem do material vegetal, bem como a quantificação dos compostos bioativos, a fim de que os resultados obtidos possam ser reproduzidos e/ou comparados. Entretanto, para a recomendação de uso no tratamento de grãos de milho que se destina ao consumo humano e animal, há a necessidade de estudos complementares, visando oferecer ao mercado um produto eficiente e seguro do ponto de vista toxicológico (JÚNIOR, 2011).

6 CONCLUSÕES

Em função das características e condições relacionadas ao presente estudo, foi possível obter as seguintes conclusões:

Levando em consideração as variáveis do rendimento das frações orgânicas obtidas pelo processo partição, o maior rendimento foi obtido com a fração hexânica.

Considerando os resultados dos testes estatísticos foi possível utilizar os solventes nos bioensaios em função dos mesmos não afetarem negativamente a sobrevivência dos insetos.

O melhor resultado para atividade inseticida foi obtido com a fração hexânica, mortalidade de 100% via ingestão e 50% via de contato por superfície contaminada. No teste de ingestão ocorreu o maior percentual de mortalidade.

Foi observado nas frações mais promissoras (hexânica) que o aumento da mortalidade ocorreu em função das maiores concentrações. Com base no teste de correlação, foi possível verificar esta relação entre as variáveis dose/resposta.

A concentração inibitória da atividade inseticida obtida neste trabalho para as frações hexânicas das sementes foram ($CL_{50}=4.738$ ppm) para o teste de contato e ($CL_{50}=2.824$ ppm) para o teste de ingestão.

As frações em hexano da *A. mucosa* obtidas por partição líquido-líquido são promissoras, atuando como protetores de grãos contra *S. zeamais*, propiciando níveis satisfatórios de controle.

Os resultados obtidos nesse estudo, não viabilizam as frações mais promissoras para o uso no controle dos insetos em campo, tendo em vista que para tanto, é de fundamental importância analisar a fitoquímica das frações, determinando qual o princípio ativo mais atuante na mortalidade dos insetos. Como também, avaliar a toxicidade das frações.

São necessários estudos posteriores para investigar o potencial biológico destes extratos. Ressaltando a importância dos resíduos dos frutos os quais podem ser de enorme valor científico e econômico para nossa região.

REFERÊNCIAS

ABDUALRAHMAN, Mohammed Adam Yahya et al. Postharvest physicochemical properties of the pulp and seed oil from *Annona squamosa* L.(Gishta) fruit grown in Darfur region, Sudan. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

ALIAS, A. et al. Alkaloids from *Fissistigma latifolium* (Dunal) Merr. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 7, p. 4583–4588, 24 jul. 2010.

ALMEIDA, F. D. A. C.; SILVA, J. F. DA; MELO, B. A. DE. Controle do *Sitophilus zeamais* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) em sementes de milho armazenadas com extratos de *Laurus nobilis* L. E *Capiscum bacatum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA - CONBEA, 43., 2014, **Anais...** 2014.

ALMEIDA, J. R. G. DA S. et al. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 258–264, 2014.

AMOABENG, B. W. et al. Cost: Benefit analysis of botanical insecticide use in cabbage: Implications for smallholder farmers in developing countries. **Crop Protection**, v. 57, p. 71–76, 2014.

ANSANTE, T. F. et al. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 969–976, 2015.

ASHOK KUMAR, J. et al. Insecticidal Activity of Ethanolic Extract of Leaves of *Annona squamosa*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Rajasthan**, v. 2, n. 5, p.177–180, May 2010.]

ASMANIZAR, A. D.; IDRIS, A. B. Effect of four selected plant powder as rice grain protectant against *Sitophilus zeamais* (coleoptera: Curculionidae). **Journal of Entomology**, v. 41, n. 7, p. 863–869, 2012.

ANVISA & UFPr. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010, ANVISA, dezembro de 2011. Disponível em www.anvisa.gov.br acessado em 21 mar 2017.

BARBOSA, E. A. S. **Efeitos de extratos de *Casearia javitensis* Kunth(Salicaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae)**. 2015. 54 f. Dissertação (Ciências Biológicas (Entomologia) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and Mechanisms of Action. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 269–303, 2005.

BIMAKR, M. et al. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 1, p. 67–72, 2011.

BOHNER, T. O. L.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O. Impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, n. 0, p. 1–3, 2013.

BORELLA, J. C. et al. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 557–561, dez. 2006.

BOYOM, F. F. et al. Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. **Parasitology Research**, v. 108, n. 5, p. 1211–1217, 2011.

BRAIBANTE, E. M. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRANCO, P. C. et al. Characterization of *Annona cherimola* Mill . Seed Oil from Madeira Island : a Possible Biodiesel Feedstock Characterization of *Annona cherimola* Mill . Seed Oil from Madeira Island : a Possible Biodiesel Feedstock. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 429 – 436, April 2009.

BRITO, C. H. DE et al. Efeito de produtos alternativos e de fungicidas no controle do míldio da videira. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 1–5, 2008.

BRITO, E. F. **Extratos de anonáceas e piperáceas sobre tuta absoluta (meyrick) (lepidoptera : gelechiidae) bioatividade de extratos de anonáceas e piperáceas sobre tuta absoluta (meyrick)**. 2014. 92 p.Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017–1023, 2010.

CANEPPELE, M. A. B.; SANTAELLA, A. G. Diferentes dosagens de pó inerte e temperaturas em milho armazenado para controle de gorgulho-do-milho different dosages of inert dust and temperatures in storage corn for control of maize weevil. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 4, p. 343–347, 2010.

CARNEIRO, F. F. et al. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1–Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Saúde. Rio de Janeiro: **DOSSIÊ ABRASCO**, 2012.

CARVALHO, T. M. B. DE. **Avaliação de extratos vegetais no controle de *brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES , 1939) E *Oligonychus ilicis* (McGregor , 1917) (Acari : tenuipalpidae , tetranychidae) em cafeeiro**. 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L. H. C.; JIMÉNEZOSORNIO, 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**, Yucatán, v. 12, n.3, p.445-462, 2010.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012.

CHEN, Y. et al. Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 960–6, 1 dez. 2012.

CHEN, Y. et al. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 58, p. 394–400, ago. 2013.

COITINHO, R. L. B. de C. et al. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* motschulsky, 1885 (coleoptera: Curculionidae). **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 172–178, 2011.

COSTA, E. V et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteropsis species*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1895–9, jun. 2008.

COUVREUR, Thomas LP et al. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 74-83, 2012.

FERNANDES, J. M. et al. Efeito de soluções de origem vegetal na herbivoria de duas espécies de tanchagem (*Plantago major* L. e *Plantago lanceolata* L.). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 35–41, 2006.

FERREIRA, L. E. et al. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 327–32, jul. 2013.

FERREIRA, M. D. G. R. et al. Emergência e crescimento inicial de plântulas de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill) (Annonaceae) em diferentes substratos.

Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 2, p. 373–380, 2010.

FIGUEIREDO, C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. November, p. 206–213, 2007.

FILHO, E. F. et al. Control of maize weevil through heat treatment. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 3, p. 196–204, 2011.

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.

GALLE, J.-B. et al. Unusual benzylated flavonoids from *Mitrella mesnyi* (Pierre) Bân. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 9–11, jun. 2013.

GONÇALVES, Manoel Eneas; BLEICHER, Ervino. Uso de extratos aquosos de nim e azadiractina via sistema radicular para o controle de mosca-ranca em meloeiro. *Revista Ciência Agronômica*, v. 37, n. 2, p. 182-187, 2008.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. et al. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 01–16, 2014.

HUANG, Y. et al. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 4, p. 289–298, 1997.

HUANG, Y.; HO, S. H. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 1, p. 11–17, jan. 1998.

IBGE/SIDRA. Brasil, série histórica de área plantada; série histórica de produção agrícola; safras 1998 a 2011. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric ou www.mapa.gov.br, acessado em 28 mar 2017.

ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in plant science**, v. 19, n. 3, p. 140–5, mar. 2014.

JÚNIOR, P. J. D. S. **Medidas de controle do sitophilus zeamais em sementes de milho armazenadas com extratos de piper nigrum L. e Annona squamosa L.** 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande-Paraíba, 2011.

KIM, S.-I. et al. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 3, p. 293–303, jan. 2003.

KOUAM, S. F. et al. Indolosesquiterpene alkaloids from the Cameroonian medicinal plant *Polyalthia oliveri* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 105, p. 52–9, set. 2014.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 225–242, 2014.

LAROZE, L.; SOTO, C.; ZÚÑIGA, M. E. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, 2010.

LAWAL, O. A.; OPOKU, A. R.; OGUNWANDE, I. A. Phytoconstituents and Insecticidal Activity of Different Solvent Leaf Extracts of *Chromolaena odorata* L., against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae). v. 5, n. 3, p. 237–247, 2015.

LIMA, M. C. F. DE. “**Caracterização de substâncias fenólicas e alcaloides dos resíduos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum)**”. 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

LIMA, L. A. R. S. et al. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 629–634, 2012.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1129–1138, out. 2010.

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**. 2007.84 p. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

LIU, Y. et al. Biological evaluation of new mimetics of annonaceous acetogenins: alteration of right scaffold by click linkage with aromatic functionalities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 248–58, 6 maio 2014.

LLANOS, H. et al. (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 34, n. 1, p. 76–82, 2008.

LORENZONI, R. M. et al. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 251–257, 2014.

LORINI, I. **Manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 72 p.

LORINI, I. et al. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2015.

LUCAS, P. Mechanical Defences to Herbivory. **Annals of Botany**, v. 86, n. 5, p. 913–920, 2000.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 26 abr. 2016a.

MARTINEZ S. S. **O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** Instituto Agrônômico do Paraná, [S. l.: s. n.], 2002.

MASRURI, L. et al. Renewable Oil Extracted from Indonesian Srikaya ' s (*Annona squamosa* sp .) Seed : Another Potent Source for Biodiesel. **Journal Pure Applied Chemistry Research**, v. 1, p. 51–57, Dec. 2012.

MATSUMOTO, R. S. et al. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631–635, set. 2010.

MENDES, C. S. O. **Caracterização da composição química e atividade biológica de extratos de *alternanthera brasiliana* (L.) kuntze *amaranthaceae*** Montes Claros. 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

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

MIAO, Y.-J. et al. Three cytotoxic Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 92–96, jun. 2016.

MIREKU, E. A.; MENSAH, M. L. K.; MENSAH, A. Y. Prenylated indole alkaloids from the stem bark of *Hexalobus monopetalus*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 108–114, jun. 2016.

MONTANHA, Francisco Pizzolato; PIMPÃO, Cláudia Turra; TITULAR-PUCPR, Médica Veterinária. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 1-58, 2012.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopiya brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 9, p. 948–951, set. 2005.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. DE A.; DUQUE L, J. E. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 1–6, 2009.

OLIVEIRA, T. A. DE. **Bioatividade de extratos vegetais de *Vitex cymosa* e *Eschweilera pedicellata* sobre adultos de *Sitophilus zeamais* motschulsky, 1855 (Coleoptera, curculionidae).** 2010. 72 f. Dissertação (Entomologia)-Instituto nacional

de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, 2010.

PAULIQUEVIS, C. F.; FAVERO, S. Atividade inseticida de óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* sobre *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, p. 1192–1196, 2015.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. É Veneno ou é remédio? In: **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 101–20.

PIMPÃO, C. T. **Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunotóxico**. Curitiba, 2006. 163 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos)-Universidade Federal do Paraná, 2006.

PRAWAT, U. et al. Flavonoids from *Friesodielsia discolor*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 809–813, dez. 2012.

PRUDENTE, A. L. D. C. et al. Serpentes da Bacia petrolífera de Urucu, município de Coari, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 381–386, 2010.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. S. T. -H. L. **Ann. Naturhist. Mus. Wien**, v. 108 B, p. 191–206, 2007.

RAVAOMANARIVO, L. H. R. et al. Efficacy of seed extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata* (Annonaceae) for the control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 798–806, out. 2014.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304–307, 2009.

RIBEIRO, L. DO P. **Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)**. 2010. 154 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RIBEIRO, L. DO 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, out. 2013.

RIBEIRO, L. P. et al. Toxicity of an acetogenin-based bioinsecticide against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 3, 2015.

RIBEIRO, P. et al. Toxicity of Botanical Insecticides on *Eriopsis Connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Revista da FZVA**, v. 16, n. 2, 2010.

ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238–244, dez. 2008.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista internacional de Desenvolvimento local**, v. 1, p. 43–50, 2001.

ROGDRIGUES, V. DE M. et al. Evaluation of extracts *Annona muricata* L. about *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hemiptera: Aphididae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 3, p. 75–83, 2014.

SANTOS, M. R. A. et al. Atividade inseticida do extrato das folhas de *piper hispidum* (piperaceae) sobre a broca-do-café (*hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Botanica**, v. 33, n. 2, p. 319–324, 2010.

SANTOS, Mônica Alessandra Teixeira; AREAS, Miguel Arcanjo; REYES, Felix Guillermo Reyes. Piretróides—uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 339–349, 2007.

SCOTTI, L. et al. Chemotaxonomy of three genera of the annonaceae family using self-organizing maps and ¹³C NMR data of diterpenes. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2146–2152, 2012.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011. Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256, acessado em: 28 mar 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2010.

SOARES, E. R. et al. Direct infusion ESI-IT-MS alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* maas (Annonaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 5, p. 339–345, 2015.

SOARES, J. D. R. et al. Caracterização anatômica e citométrica em biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.]). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 272–280, 2014.

SOBRINHO, R. B. Produção integrada de Anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 102–107, 2014.

SOMANAWAT, J. et al. Flavonoid and megastigmane glycosides from *Artabotrys hexapetalus* leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 124–127, out. 2012.

SOUSA, E. A. et al. Terpenes and steroids from leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 193–195, maio 2014.

SOUZA, A. P. et al. Insecticidal Effect of Extracts from Native Plants to Mato Grosso do Sul, Brazil, on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Sociedade Entomológica do Brasil**, p. 1–5, 2010.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 82–86, mar. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TANG, C. C.; THOMAS, D. C.; SAUNDERS, R. M. K. Molecular phylogenetics of the species-rich angiosperm genus *Goniothalamus* (Annonaceae) inferred from nine chloroplast DNA regions: Synapomorphies and putative correlated evolutionary changes in fruit and seed morphology. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 92, p. 124–39, nov. 2015.

TAPONDJOU, A. L. et al. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n. 1, p. 91–102, 2005.

TAVARES, M. A. G. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical entomology**, v. 34, n. 2, p. 319–323, 2005.

UKEH, D. A. et al. Insecticidal Effect of Fruit Extracts from *Xylopia aethiopica* and *Dennettia tripetala* (Annonaceae) against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Chilean journal of agricultural research**, v. 72, n. 2, p. 195–200, jun. 2012.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E.; GUEDES, J. C. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. **Bases e técnicas do manejo de insetos**, p. 113–128, 2000.

VIEGAS, C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390–400, 2003.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Documento: Embrapa Clima Temperado**, n. 316, p. 7–15, 2010.

YANG, H. et al. Two new cytotoxic acetogenins from *Annona squamosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 3, p. 250–256, 2009.