

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS DE *Trichilia pallida* E *Trichilia pallens* (MELIACEAE) COM ATIVIDADE SOBRE A TRAÇA-DO-TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEP.: GELECHIIDAE)**

**UEMERSON SILVA DA CUNHA**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Entomologia.

**P I R A C I C A B A**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Dezembro - 2004

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS DE *Trichilia pallida* E *Trichilia pallens* (MELIACEAE) COM ATIVIDADE SOBRE A TRAÇA-DO-TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEP.: GELECHIIDAE)**

**UEMERSON SILVA DA CUNHA**

Engenheiro Agrônomo

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

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Entomologia.

**P I R A C I C A B A**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Dezembro - 2004

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cunha, Uemerson Silva da

Busca de substância de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens* (Meliaceae) com atividade sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep. : Gelechiidae) / Uemerson Silva da Cunha. - - Piracicaba, 2004.

108 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.  
Bibliografia.

1. Fitossanidade 2. Meliaceae 3. Plantas produtoras de pesticidas 4. Pragas de plantas 5. Rutales 6. Tomate 7. Traças I. Título

CDD 632.951

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

A meus pais,

**René e Elmira,**

e a meus irmãos,

**Wilson e Welcsoner,**

Pelo carinho, compreensão e confiança,

***OFEREÇO***

A minha querida esposa,

**Simone,**

Pelo amor, paciência e apoio constante,

***DEDICO***

*“Uma descoberta não consiste em ver o que todo mundo não viu, mas em pensar o que ninguém ainda pensou.”*

(Goethe)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o grande criador.

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pela valiosa orientação, confiança, amizade e excepcional exemplo de profissional e ser humano.

Aos demais Professores, Drs., do PPG em Entomologia: Celso Omoto; Evoneo Berti Filho; Gilberto Casadei de Baptista; José R. P. Parra; João R. S. Lopes; Octavio Nakano; Roberto A. Zucchi; Sérgio B. Alves e Sinval Silveira Neto, pela grandiosa oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos entomológicos.

À Dra. Marinéia de L. Haddad, pela amizade, agradável convívio e inúmeros auxílios estatísticos;

Ao Dr. José Francisco da Silva Martins, pela confiança em mim depositada, incentivo constante, exemplo de integridade profissional e acima de tudo pela amizade;

Ao Prof. Dr. Fernando L. Côtoli, pela confecção do Summary;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), especificamente o Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Entomologia, pela oportunidade inigualável de realizar o curso de pós-graduação em suas dependências.

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

À Waldirene de Caldas Rocha, pela amizade e inestimável auxílio no isolamento das substâncias de triquília, sem o qual não teríamos alcançado, na íntegra, nossos objetivos. Ao seu orientador, Prof. Dr. Paulo César Vieira, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que viabilizou a utilização do Laboratório de Química de Produtos Naturais.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, pela compreensão, "tolerância" e "preferência": Antônio Pancrácio; Bruno Lovato; Cristina Fugi; Élio Guzzo; Enrique Castiglioni; Fernanda Diogo; Márcio Tavares; Paulo Bogorni; Rita Gervásio e Vanessa Pansiera. Agradecimento especial ao Paulo, pelo inestimável auxílio na coleta e identificação das triquílias, à Rita, pela paciência em passar-me as arte e manhas com a traça-do-tomateiro e aos colegas "chatos" Élio e Márcio, pelas sugestões e valioso auxílio nas correções da tese, afinal de contas "A luta contra o erro tipográfico tem algo de homérico..."

A todos os colegas do PPG, especialmente aos amigos: André Franco; Cláudio Franco; Dori Nava; Edimilson Santos; Fabiana Romano; Fernando Campos; Gabriela Rodríguez; Geni Sodré; Gustavo Oliveira; José Francisco Alves Cruz Jr.; José Francisco Garcia; Karina Takahashi; Luciano Macedo; Marcelo Poletti; Maurício Godoy; Ricardo Polanczyk; Roberto Konno e Simone Prado.

Aos funcionários do Setor de Entomologia: Ana, Carlinhos, Dino, Edilene, João, Regina e Tutu, pela amizade e auxílios prestados.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretiza o deste "sonho".

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiv
SUMMARY .....	xvi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Aspectos gerais relacionados à traça-do-tomateiro <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) .....	4
2.2 Efeito de plantas inseticidas da família Meliaceae sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	10
2.3 Técnicas usadas na busca de substâncias de plantas com atividade inseticida .....	15
2.4 Extratos e substâncias de <i>Trichilia</i> spp. com atividade inseticida .....	18
2.4.1 Pesquisas no exterior .....	18
2.4.2 Pesquisas no Brasil .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1 Criação de <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) .....	30
3.2 Obtenção e manutenção de plantas de tomateiro .....	31
3.3 Obtenção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> .....	32

3.4 Seleção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> com atividade sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	33
3.5 Obtenção de extratos não aquosos de folhas de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> .....	34
3.6 Estimativa da CL <sub>50</sub> do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> para lagartas de <i>Tuta absoluta</i> .....	35
3.7 Seleção de extratos não aquosos de <i>Trichilia pallida</i> e <i>T. pallens</i> com atividade sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	36
3.8 Fracionamento do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> .....	37
3.9 Seleção de frações do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> com atividade sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	38
3.10 Fracionamento da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	39
3.10.1 Atividade de subfrações da fração em metanol de folhas de <i>Trichilia pallida</i> sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	40
3.10.1.1 Atividade de subfrações da fração 17-37 sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	42
3.11 Principais etapas para isolamento de substâncias de folhas e de frutos de <i>Trichilia pallida</i> .....	43
3.11.1 Substâncias do extrato em diclorometano de folhas .....	43
3.11.2 Substância do extrato em diclorometano de frutos .....	45
3.12 Avaliação preliminar da atividade de substâncias isoladas de folhas de <i>Trichilia pallida</i> sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	46
3.12.1 Efeito de substâncias isoladas de <i>Trichilia pallida</i> na biologia de <i>Tuta absoluta</i> .....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49



4.1 Seleção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> com atividade sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	49
4.2 Estimativa da CL <sub>50</sub> de extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> para lagartas de <i>Tuta absoluta</i> .....	53
4.3 Seleção de extratos não aquosos com atividade sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	55
4.3.1 Extratos de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	55
4.3.2 Extratos de <i>Trichilia pallens</i> .....	57
4.4 Seleção de frações do extrato em diclorometano com maior atividade sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	61
4.4.1 Frações do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	61
4.4.1.1 Atividade de subfrações da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	65
4.4.1.1.1 Atividade de subfrações da F17-37 sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	67
4.4.1.2 Substâncias isoladas a partir da fração em diclorometano de folhas e de frutos de <i>Trichilia pallida</i> .....	70
4.4.1.2.1 Avaliação preliminar da atividade de substâncias isoladas de folhas de <i>Trichilia pallida</i> sobre <i>Tuta absoluta</i> .....	71
4.4.1.2.2 Efeito de substâncias isoladas de <i>Trichilia pallida</i> na biologia de <i>Tuta absoluta</i> .....	73
4.4.2 Frações do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	82
4.5 Considerações finais .....	87
5 CONCLUSÕES .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 <i>Trichilia pallida</i> (A) e <i>Trichilia pallens</i> (B). Fotos: P. C. Bogorni....	32
2 Esquema usado na obtenção dos extratos não aquosos de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> .....	35
3 Esquema da partição líquido-líquido dos extratos em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> .....	38
4 Esquema do fracionamento cromatográfico, parcial, da fração metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>T. pallida</i> .....	41
5 Esquema de isolamento do limonóide gedunina .....	46
6 Relação entre concentração de extrato (C) em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> e o peso de lagartas (P) de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após infestação .....	55
7 Peso de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	57
8 Peso de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	61
9 Peso de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,15 %) do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	65

10	Mortalidade de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com subfrações (0,3 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	66
11	Peso de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com subfrações (0,3 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	67
12	Mortalidade de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com subfração (0,117 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	68
13	Peso de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com subfração (0,117 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	69
14	Substâncias isoladas a partir da fração em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	70
15	Substância isolada a partir da fração em diclorometano de frutos de <i>Trichilia pallida</i> .....	71
16	Mortalidade de lagartas de <i>T. absoluta</i> aos 3 e 6 dias após infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) e 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2) a 0,04 %, isolados de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	72
17	Mortalidade de lagartas de <i>T. absoluta</i> aos 6 e 5 dias após infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) e 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2) ambos a 0,04 e 0,1 %, isolados de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	72

18	Lagartas de <i>Tuta absoluta</i> alimentadas em folíolos de tomateiro tratados com o triterpeno 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) de folhas de <i>Trichilia pallida</i> a 0,1 % .....	77
19	Peso de pupas machos de <i>Tuta absoluta</i> em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de <i>Trichilia pallida</i> . TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-etilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol) .....	79
20	Peso de pupas fêmeas de <i>Tuta absoluta</i> em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de <i>Trichilia pallida</i> . TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2(24-etilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol) .....	80
21	Adultos deformados de <i>Tuta absoluta</i> em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de <i>Trichilia pallida</i> . TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-etilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol) .....	82
22	Peso de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,1 %) do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	86

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Rendimento na obtenção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de <i>Trichilia pallida</i> e <i>Trichilia pallens</i> .....	49
2 Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 5 e 10 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados <sup>1</sup> com extratos aquosos liofilizados (3 %) de folhas e ramos de <i>Trichilia pallida</i> .....	50
3 Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 5 e 10 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados <sup>1</sup> com extratos aquosos liofilizados (3 %) de folhas e ramos de <i>Trichilia pallens</i> .....	52
4 Estimativa da CL <sub>50</sub> (%) de extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> para lagartas de <i>Tuta absoluta</i> aos 6 dias após a infestação .....	54
5 Rendimento na obtenção de extratos, através do processo de maceração até exaustão, em hexano, diclorometano e metanol de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	56
6 Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	56
7 Rendimento na obtenção de extratos, através do processo de maceração até exaustão, em hexano, diclorometano e metanol de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	58

8	Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	59
9	Rendimento na obtenção de frações, após partição líquido-líquido, do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	62
10	Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,15 %) do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallida</i> .....	64
11	Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 5 e 9 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de <i>Trichilia pallida</i> .....	74
12	Duração e viabilidade da fase de larva de <i>Tuta absoluta</i> em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de <i>Trichilia pallida</i> .....	75
13	Duração e viabilidade da fase de pupa de <i>Tuta absoluta</i> em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de <i>Trichilia pallida</i> .....	81
14	Rendimento na obtenção de frações, após partição líquido-líquido, do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	83
15	Mortalidade de lagartas (%) de <i>Tuta absoluta</i> aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,1 %) do extrato em diclorometano de folhas de <i>Trichilia pallens</i> .....	85

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS DE *Trichilia pallida* E *Trichilia pallens*  
(MELIACEAE) COM ATIVIDADE SOBRE A TRAÇA-DO-  
TOMATEIRO *Tuta absoluta* (MEYRICK)  
(LEP.: GELECHIIDAE)**

Autor: UEMERSON SILVA DA CUNHA

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM

**RESUMO**

A partir de extratos aquosos e não aquosos das meliáceas *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens*, objetivou-se fazer o isolamento e identificação de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta*. Para tanto, extratos aquosos liofilizados (EAL) a 3 % de folhas e ramos de ambas as espécies de *Trichilia* foram ressuspensos em água e aplicados, por meio de mini-atomizador, sobre folíolos de tomateiro, os quais foram infestados com lagartas recém-eclodidas. Com base nos resultados de mortalidades aos 5 e 10 dias após a infestação (DAI), consideraram-se os EAL de folhas de ambas *Trichilia* mais eficientes que os respectivos extratos de ramos. Numa segunda etapa, foram obtidos por maceração, extratos de folhas de *T. pallida* e *T. pallens* em hexano (HEX), diclorometano (DIC) e metanol (MET), os quais foram avaliados, a 1%, como descrito anteriormente, incluindo-se acetona e água como controles. Dentre os referidos extratos, o em DIC de ambas *Trichilia* foi o mais promissor como fonte de substância(s) com atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta*. Na seqüência, através de partição líquido-

líquido do extrato DIC de folhas, obtiveram-se as frações em HEX, MET, acetato de etila (AET), n-butanol (NBU) e aquosa (AQ) para *T. pallida* e *T. pallens*. Destas frações, a AET a 0,15 % e a AQ a 0,1 % do extrato em DIC de *T. pallida* e de *T. pallens* respectivamente, foram as mais promissoras como fontes de substâncias com atividade inseticida sobre *T. absoluta*. A partir do extrato em DIC de folhas de *T. pallida* foram isolados os triterpenos 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1), 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2) e cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol (TRIT-3), os esteróides 24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol (EST-1), 24-metileno-colesterol (EST-2) e 24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol (EST-3), além do limonóide gedunina (LIM) obtido de frutos dessa planta. Estas substâncias foram avaliadas a 0,1 % sobre lagartas de *T. absoluta* conforme metodologia de bioensaio descrita anteriormente, avaliando-se a mortalidade de lagartas aos 5 e 9 DAI, duração e viabilidade das fases larval e pupal, peso de pupas e porcentagem de adultos deformados. Dentre as substâncias avaliadas, a TRIT-1, a EST-1 e a LIM foram as mais eficientes, alongando a fase larval e reduzindo a viabilidade dessa fase.



**SEARCHING *Trichilia pallida* AND *Trichilia pallens* (MELIACEAE)  
FOR SUBSTANCES WITH INSECTICIDAL ACTIVITY  
AGAINST THE TOMATO LEAFMINER *Tuta absoluta*  
(MEYRICK) (LEP.: GELECHIIDAE)**

Author: UEMERSON SILVA DA CUNHA

Adviser: Prof. Dr. JOSÉ DJAIR VENDRAMIM

**SUMMARY**

Organic and aqueous extracts of the Meliaceae *Trichilia pallida* and *Trichilia pallens* were produced for the isolation and identification of substances with insecticidal activity against the tomato leafminer *Tuta absoluta*. Leaf and twig freeze-dried aqueous extracts (FDA) of both *Trichilia* species were resuspended in water at a concentration of 3% and sprayed over tomato folioles with the aid of a mini-atomizer, which were infested with newly-hatched larvae. Larval mortality at 5 and 10 days after infestation (DAI) were higher for leaf extracts of both *Trichilia* species. In a second set of experiments, 1% leaf extracts of *T. pallida* and *T. pallens* were produced by maceration in hexane (HEX), dichloromethane (DIC) and methanol (MET), and tested as described above using acetone and water as control. DIC extracts were the most promising as a source of substances with insecticidal activity against larvae of *T. absoluta*. DIC leaf extracts of *T. pallida* and *T. pallens* were further processed and subjected to partition assays, producing fractions in HEX, MET, ethyl acetate (ETA), n-butanol (NBU) and water (WA). After

testing, 0.15% ETA and 0.1% WA fractions obtained from the partition assay of DIC extracts of *T. pallida* and *T. pallens*, respectively, showed the highest insecticidal activity against *T. absoluta*. Leaf extracts of *T. pallida* in dichloromethane (DIC) yielded six compounds, the triterpenes 24-methylene-cycloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1), 24-methylene-cycloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2) and cycloarta-23-en-3 $\beta$ ,25-diol (TRIT-3) and the steroids 24-methylene-3,22-dihydroxi-cholesterol (EST-1), 24-methylene-cholesterol (EST-2) and 24-methylene-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-trihidroxi-cholesterol (EST-3); the limonoid gedunine (LIM) was obtained from fruits of this plant. The insecticidal activity of all these substances against *T. absoluta* larvae were tested at 0.1% as previously described, assessing larval mortality at 5 and 9 DAI, larval and pupal developmental time and survivorship, pupal weight and adult malformation. TRIT-1, EST-1 and LIM were the most effective against *T. absoluta* by arresting larval development and reducing larval survivorship.

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies de insetos atacam a cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), sendo a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), uma das principais pragas. Suas larvas, minadoras, alimentam-se inicialmente de folhas, construindo galerias transparentes, devido ao consumo completo do mesofilo, podendo também danificar ponteiros, ramos, flores e frutos. Estes, além de terem a polpa destruída, ficam mais suscetíveis à penetração de microrganismos, tornando-se, na maioria das vezes, completamente inviáveis à comercialização (Castelo Branco, 1992; Souza & Reis, 1992). Ademais, sua ocorrência pode ser constatada durante todo o ciclo da cultura, independentemente do período em que o tomate seja cultivado (França & Castelo Branco, 1992). Por esta razão, principalmente, medidas visando reduzir a população da traça a níveis não danosos economicamente, deveriam ser implementadas durante todo o ciclo da cultura, preventiva e integradamente, e não apenas de forma curativa, o que tornaria eficaz o seu controle.

Dentre as táticas adotadas para minimização dos danos de *T. absoluta* à cultura do tomateiro, o controle químico através de aplicações sucessivas de inseticidas é a principal, chegando, em alguns casos, a 36 pulverizações por cultivo (Picanço et al., 1995). Apesar disso, de modo geral, não se tem obtido a eficácia desejada, devido à seleção de populações resistentes aos princípios ativos empregados e à eliminação de populações de inimigos naturais da traça. Somados a estes, estão os problemas de intoxicações de produtores e de consumidores pelos resíduos dos agrotóxicos utilizados, a contaminação do ambiente e a elevação do custo

de produção (França & Castelo Branco, 1992; Guedes et al. 1994; Picanço et al., 1995; Siqueira et al., 2000a e b; Souza & Reis, 1992). Com base no exposto, é primordial a disponibilização e adoção de medidas que contribuam de maneira a tornar eficaz, viável econômica, social e ambientalmente, o controle da traça *T. absoluta*.

Nesse sentido, uma das alternativas que tem se mostrado promissora como componente do manejo integrado da traça-do-tomateiro, é o uso de espécies de plantas da família Meliaceae, fonte de substâncias com atividade inseticida.

Inúmeras pesquisas já foram mundialmente desenvolvidas com o intuito de identificar possíveis efeitos inseticidas de plantas da família Meliaceae, destacando-se, dentre estas, *Azadirachta indica*, comumente denominada nim que apresenta, dentre outros compostos, o limonóide azadiractina. Além dessa planta, dentre as meliáceas estudadas, o gênero *Trichilia*, constituído de aproximadamente 230 espécies, distribuídas principalmente na América Tropical, vem sendo apontado como promissor pelo fato de possuir substâncias com atividade inseticida, comparável à da azadiractina, mas possivelmente com estrutura molecular mais simples e, portanto, passíveis de serem sintetizadas quimicamente (Mikolajczak & Reed, 1987; Ramírez et al., 2000; Wheeler et al., 2001; Xie et al., 1994).

No Brasil, em trabalhos pioneiros visando identificar espécies de Meliaceae com atividade sobre a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), destacou-se *Trichilia pallida* (Rodríguez & Vendramim, 1996 e 1997). Além desta espécie, outra citada recentemente e pela primeira vez, como promissora no controle de *S. frugiperda*, é *Trichilia pallens* (Bogorni & Vendramim, 2003). Aliado a esta bioatividade está o fato de que estas espécies vegetais, além de serem nativas, apresentam ampla distribuição geográfica no Brasil (Jarenkow & Waechter, 2001; Klein, 1984), permitindo prever que tais plantas, partes destas, ou até mesmo substâncias isoladas das mesmas, têm potencial para serem utilizadas no controle de determinadas espécies de insetos-praga.

No que se refere a *T. absoluta*, as pesquisas envolvendo plantas inseticidas da família Meliaceae são recentes e, ainda assim, relacionadas apenas a *T. pallida* (Brunherotto & Vendramim, 2001; Ferracini et al., 1990, 1991 e 1993; Gonçalves-Gervásio, 2003; Thomazini et al., 2000; Trindade et al., 2000; Vendramim & Thomazini, 2001), já que para *T. pallens* ainda não existem relatos sobre sua bioatividade em relação a essa praga. Em tais estudos, entretanto, os esforços têm sido empreendidos apenas no sentido de avaliar o efeito de extratos de plantas ou partes destas sobre a praga, sem, no entanto, o objetivo de isolar e caracterizar o(s) composto(s) com atividade inseticida.

Nesse sentido, objetivou-se, nesse trabalho, a partir de extratos aquosos e não aquosos das meliáceas *T. pallida* e *T. pallens*, realizar o isolamento e identificação de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro *T. absoluta*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais relacionados à traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick)

Inicialmente, a traça-do-tomateiro foi descrita por Meyrick em 1917, como *Phthorimaea absoluta*. Mais tarde, foi transferida para o gênero *Gnorimoschema* Busck, 1900 e incluída posteriormente no gênero *Scrobipalpula* (Povolný, 1975). Em 1987, após a revisão dos *Gnorimoschemini* (Gelechiinae), foi criado o gênero *Scrobipalpuloides* Povolný, 1987 (Povolný, 1987). Finalmente, a espécie foi transferida para o gênero *Tuta* Povolný, 1993 (Povolný, 1994).

A traça *T. absoluta* é um microlepidóptero da família Gelechiidae. Os adultos apresentam coloração cinza-prateada e medem em torno de 1, 5 e 9 mm de largura, comprimento e envergadura respectivamente. As asas anteriores apresentam numerosos pontos escuros na parte dorsal, sendo franjadas apicalmente. As posteriores são trapezoidais e franjadas nos bordos. O abdome, castanho-claro, é mais largo nas fêmeas que nos machos. Apresentam hábitos crepusculares-noturnos-aurorais, sendo que, durante o dia ocultam-se na face inferior das folhas de tomateiro, iniciando suas atividades ao entardecer. Os ovos são elípticos de superfície reticular medindo cerca de 0,38 e 0,22 mm de comprimento e largura respectivamente. A coloração dos ovos varia, inicialmente, entre branca-brilhante e amarela-clara e, mais próximo à eclosão das larvas, tornam-se marrons ou avermelhados (Coelho & França, 1987; Quiroz, 1976; Souza & Reis, 1992). As lagartas de primeiro ínstar caracterizam-se por apresentar

coloração verde-clara, com cabeça mais larga que o corpo e de cor marrom. As de segundo e terceiro ínstaes apresentam coloração verde cada vez mais intensa, à medida em que vão se alimentando e, no quarto e último instar, apresentam coloração verde-escura, com faixa longitudinal dorsal rósea a qual se torna avermelhada e bem distinta próximo à pupação (Coelho & França, 1987; Ferreira & Anjos, 1997; Quiroz, 1976). As pupas, obtectas, apresentam os 3 segmentos torácicos visíveis, sendo o protórax mais curto e o metatórax mais longo. Medem aproximadamente 4,6 e 1,3 mm de comprimento e de diâmetro respectivamente. Na fêmea, o cremaster invagina-se, formando dois lóbulos, e no macho, ele dá origem ao orifício anal. O poro genital no macho localiza-se no nono segmento abdominal, sendo que na fêmea, no oitavo e nono segmentos (Coelho & França, 1987; Quiroz, 1976). Esta característica é importante por ocasião da separação das pupas por sexo.

Sua ocorrência no Brasil foi constatada pela primeira vez no litoral do Estado do Paraná, ocasionando danos à cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) no período de setembro de 1979 a fevereiro de 1980 (Muszinski et al., 1982), sendo registrada no ano seguinte em Jaboticabal, Estado de São Paulo (Moreira et al., 1981). Nos anos subseqüentes, dispersou-se para os Estados do Espírito Santo (Scardini et al., 1983), Rio de Janeiro (Gonçalves et al., 1983), Bahia (Haji, 1982; Moraes & Normanha Filho, 1982), Pernambuco, Minas Gerais, Goiás e Brasília (Castelo Branco, 1992; Souza et al., 1983; Souza & Reis, 1992), acreditando-se que atualmente se encontre disseminada em todas as regiões produtoras de tomate no Brasil. No restante da América do Sul, a traça encontra-se em diversos países, tais como: Argentina (Bahamondes & Mallea, 1969), Bolívia, Chile, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Povolný, 1975) e Uruguai (Carballo et al., 1981).

As plantas preferidas como hospedeiros de *T. absoluta* são as pertencentes à família Solanaceae, como o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), batata (*Solanum tuberosum* L.), fumo (*Nicotiana tabacum*

L.), *Solanum guitoense* Lam., *Solanum saponaceum* Welw., maria-pretinha (*Solanum nigrum* L.), *Lycopersicon puberulum*, estramônio (*Datura stramonium* L.) (Povolný, 1975; Vargas, 1970). No Brasil, entretanto, apenas há relatos, dentre as plantas cultivadas, do tomateiro (*L. esculentum*) e ocasionalmente da batata (*S. tuberosum*), sendo que algumas solanáceas silvestres, como o joá-bravo (*Solanum aculeatissimum*) e a maria-pretinha (*Solanum americanum*) são citadas como hospedeiras capazes de sustentar populações representativas da traça, principalmente durante a entressafra (França & Castelo Branco, 1992; Souza & Reis, 1992).

Em folhas atacadas pela traça-do-tomateiro, observa-se, inicialmente, uma pequena mancha, semelhante a minas, que vai aumentando até ocupar grande parte do folíolo. Em ataques mais severos, todo o tecido parenquimatoso da folha pode desaparecer sobrando apenas restos de nervuras, ambas as epidermes, e acúmulos de excrementos, especialmente nos orifícios de entrada e saída das galerias. As lagartas podem se alimentar de partes tenras do caule, broqueando-o junto à inserção das folhas e logo abaixo do broto terminal, sendo que a perfuração deste pode resultar em superbrotamento das plantas bem como redução do porte das mesmas. O dano pode ocorrer também durante o florescimento pois, ao atacarem as flores, acabam impedindo a fecundação. No entanto, os danos mais visíveis são feitos nos frutos em desenvolvimento e naqueles que estão amadurecendo, já que a traça entra por debaixo das sépalas, constrói galerias que se enchem de excrementos o que acaba facilitando a podridão dos frutos (França et al., 1985; Haji, 1982 e 1984; Haji et al., 1989 e 1995; Imenes et al., 1990; Nakano & Paulo, 1983; Souza & Reis, 1986 e 1992; Vargas, 1970).

Assim, os danos ocasionados pela traça podem alcançar grande expressão econômica, chegando, em casos de ataques severos, a totalizar 100% de perdas na produção, o que foi constatado por Scardini et al. (1983) no município de Santa Teresa no Estado do Espírito Santo. Souza & Reis (1992) também enfatizam que prejuízos desta magnitude podem



ocorrer, além de outros, de ordem econômica, como a depreciação dos frutos atacados no mercado consumidor, e social, que pode ser caracterizado pela dispensa de mão de obra em razão do abandono das lavouras atacadas.

No que se refere à biologia de *T. absoluta*, pode-se dizer que a maioria dos dados existentes na literatura são de criações mantidas em dietas naturais, já que, até o momento, não se dispõe de dieta artificial adequada. No entanto, já existem trabalhos mais recentes indicando a possibilidade de criação do inseto em dieta artificial, embora esta ainda não seja capaz de superar a natural (Giustolin et al., 1995; Mihsfeldt & Parra, 1999).

Em laboratório, sob diferentes condições de temperatura, a longevidade de adultos da traça apresenta-se bastante variável, sendo a das fêmeas geralmente superior à dos machos. Rázuri & Vargas (1975) constataram que a longevidade média, da terceira geração de fêmeas e machos, foi de 21,8 e 21,6 dias respectivamente, sob temperatura de  $24 \pm 1$  °C e UR de  $71 \pm 1$  %. Entretanto, os mesmos autores observaram que a longevidade mínima foi de 6 e 4 dias para fêmeas e machos respectivamente. Constata-se, portanto, que se trata de um parâmetro muito variável, dependendo de uma série de fatores, sendo a temperatura um dos principais. Em condições de campo, Haji et al. (1988b) apontaram a precipitação como o fator climático que mais influenciou a população da traça *T. absoluta*. Nesse sentido, mesmo sob condições controladas, a longevidade média variou de 10 a 31 dias para fêmeas e de 9 a 36 dias para machos (Bogorni, 1999; Fernández & Montagne, 1990; Giustolin & Vendramim, 1996; Haji et al., 1988a; Imenes et al., 1990; Mihsfeldt & Parra, 1999; Paulo, 1986; Rázuri & Vargas, 1975; Salas & Fernández, 1985).

Em relação ao comportamento de cópula, os adultos apresentam um ritmo diurno, iniciando a atividade de dispersão a partir das 5 h da manhã e copulando nas primeiras 2 horas da fotofase (6 e 7h da manhã). Este

comportamento não foi constatado durante o período noturno. Cada fêmea copula apenas com um macho e de forma contínua, de maneira que ambos permanecem com os corpos em sentidos opostos, por período variável de alguns minutos até, em média, 4 h e 45 min. Assim como o acasalamento, a oviposição também ocorre durante o período diurno, aproximadamente 24 h após a cópula. O máximo de oviposição foi observado entre 15 e 18 h, sendo os ovos depositados individualmente ou em grupos de 3 a 5, indistintamente em relação à face do folíolo (Coelho & França, 1987; Fernández & Montagne, 1990; Imenes et al., 1990; Quiroz, 1976; Rázuri & Vargas, 1975; Uchoa-Fernandes et al., 1995).

O período de pré-oviposição varia de 1 a 4 dias, o de oviposição de 3 a 22 dias e a fecundidade média é de 40 a 325 ovos (Bogorni, 1999; Coelho & França, 1987; Fernández & Montagne, 1990; Haji et al., 1988a; Imenes et al., 1990; Muszinski et al., 1982; Quiroz, 1976; Rázuri & Vargas, 1975). Tais resultados foram obtidos em condições controladas, com temperatura e UR em torno de 25 °C e 70 % respectivamente, sendo que tamanha variação pode ocorrer em função de vários aspectos, como por exemplo a alimentação. Imenes et al. (1990) constataram que fêmeas alimentadas com solução de mel a 10 % apresentaram maior fecundidade (261,71 ovos) do que as não alimentadas (147,71 ovos). Mihsfeldt & Parra (1999) observaram variação de fecundidade de 20,36 a 183,35 ovos, em adultos provenientes de lagartas alimentadas com um tipo de dieta artificial e folíolos de tomateiro respectivamente.

A incubação dos ovos da traça varia de 4,0 a 6,7 dias (Bogorni, 1999; Coelho & França, 1987; Fernández & Montagne, 1990; Haji et al., 1988a; Imenes et al., 1990; Muszinski et al., 1982; Paulo, 1986; Quiroz, 1976; Rázuri & Vargas, 1975; Salas & Fernández, 1985; Vargas, 1970), tendo sido observadas viabilidades variáveis, de 73 % (Giustolin & Vendramim, 1994) a mais de 90 % (Bogorni, 1999; Coelho & França, 1987; Fernández & Montagne, 1990; Giustolin & Vendramim, 1994 e 1996; Imenes et al., 1990; Rázuri & Vargas, 1975).

Quanto à fase de larva, observa-se grande variação em função, principalmente, da temperatura em que os insetos foram mantidos. Sob temperaturas médias de 14,5 e 18,5 °C, a duração foi de 27 e 19 dias respectivamente (Imenes et al., 1990; Quiroz, 1976). Entretanto, em temperaturas mais elevadas (22,8 a 25 °C), há rápido desenvolvimento do inseto, sendo em torno de 10,9 a 14,5 dias (Bogorni, 1999; Coelho & França, 1987; Fernández & Montagne, 1990; Giustolin et al., 1995; Giustolin & Vendramim, 1994 e 1996; Haji et al., 1988a; Mihsfeldt & Parra, 1999; Paulo, 1986; Rázuri & Vargas, 1975; Salas & Fernández, 1985; Vargas, 1970). A viabilidade de larvas, assim como a duração da fase, apresenta-se bastante variável, sendo de 91,6 e 71,7 % às temperaturas de 25 e 18,5 °C respectivamente (Imenes et al., 1990; Mihsfeldt & Parra, 1999). No entanto, os valores de viabilidade não estão apenas relacionados à temperatura, tendo a alimentação um papel preponderante. Nesse sentido, à mesma temperatura (25 °C), podem ser observadas viabilidades variáveis de 29 a 91,6 %, apenas em função do alimento fornecido às lagartas (Mihsfeldt & Parra, 1999). De maneira geral, a traça apresenta altos percentuais de viabilidade em todas as fases de desenvolvimento (Bogorni, 1999; Imenes et al., 1990). O inseto apresenta 4 ínstaras larvais (Bogorni, 1999; Coelho & França, 1987; Fernández & Montagne, 1990; Ferreira & Anjos, 1997; Giustolin, 1996; Mihsfeldt & Parra, 1999; Paulo, 1986; Rázuri & Vargas, 1975), sendo que, segundo Bogorni (1999), o último ínstar é responsável por mais de 67 % do dano foliar.

A fase de pupa, avaliada com temperatura de aproximadamente 25 °C, dura de 7 a 8 dias (Bogorni, 1999; Fernández & Montagne, 1990; Giustolin & Vendramim, 1996; Mihsfeldt & Parra, 1999; Paulo, 1986; Rázuri & Vargas, 1975; Salas & Fernández, 1985; Vargas, 1970). No entanto, quando consideram-se temperaturas inferiores, a duração do período pupal pode se prolongar consideravelmente. Quiroz (1976) observou duração média de 16 dias para a fase de pupa à temperatura de 14,5 °C, chegando a um máximo de 19 dias, enquanto que Imenes et al. (1990), a 18,5 °C,

constataram duração de 10,8 e 9,7 dias para pupas machos e fêmeas respectivamente. Em relação à viabilidade, há variação de 68,19 (Haji et al., 1988a) a 100 % (Giustolin & Vendramim, 1996), sendo que valores intermediários têm sido constatados por diversos autores (Bogorni, 1999; Coelho & França, 1987; Giustolin et al., 1995; Giustolin & Vendramim, 1994; Imenes et al., 1990; Mihsfeldt & Parra, 1999).

## **2.2 Efeito de plantas inseticidas da família Meliaceae sobre *Tuta absoluta***

O uso de plantas inseticidas, seja através de extratos ou até mesmo de substâncias isoladas das mesmas, não é uma técnica recente, pois já era utilizada desde o século passado, principalmente nos países tropicais, antes do advento dos inseticidas sintéticos (Rodríguez & Vendramim, 1998; Vendramim, 1997; Vieira et al., 2001). No entanto, em virtude do surgimento, na década de 40, de inseticidas como o DDT que se mostravam mais eficientes e baratos, houve enorme descrença pelos inseticidas naturais. O ressurgimento destes deveu-se à necessidade de se dispor de novos compostos para uso no controle de pragas sem os problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aparecimento de insetos resistentes, já que, tais características normalmente estão presentes nos inseticidas vegetais (Vendramim, 1997). Nesse sentido, especificamente para a traça-do-tomateiro *T. absoluta*, algumas pesquisas foram realizadas buscando viabilizar o emprego de plantas inseticidas, principalmente Meliaceae, como alternativa no manejo integrado do inseto.

Em trabalho pioneiro, Ferracini et al. (1990) avaliaram o efeito repelente, *in vitro*, de extratos aquosos e não aquosos de diferentes espécies vegetais, incluindo *Melia azedarach* (Meliaceae), sobre a traça *T. absoluta*. Estes autores constataram que, além do efeito repelente às larvas

do inseto, os extratos acetônico e metanólico de frutos de *M. azedarach* ocasionaram mortalidade em torno de 80 %. Em trabalho semelhante, Ferracini et al. (1991) constataram que a mortalidade de lagartas de *T. absoluta*, com 6 dias de idade, alimentadas em folíolos de tomateiro pulverizados com os extratos acetônico e metanólico de *M. azedarach* foi de 88 %. No entanto, Ferracini et al. (1993), avaliando os extratos aquosos e acetônicos de *M. azedarach*, pulverizados em plantas de tomateiro envasadas, observaram 52 e 62 % respectivamente de mortalidades de lagartas de *T. absoluta*. Apesar da redução de eficácia constatada neste último bioensaio, os autores aventaram a possibilidade de tais extratos virem a ser empregados no controle do inseto.

Trindade et al. (2000) avaliaram a atividade do extrato metanólico de amêndoas da semente de *Azadirachta indica* (nim) sobre ovos e lagartas de *T. absoluta*. Para isso, na avaliação sobre ovos da traça, os autores obtiveram o referido extrato através de diluição em metanol nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Adultos da traça permaneceram durante 24 h em gaiola, contendo 5 folíolos de tomateiro, cv. Santa Clara, os quais serviram de substrato para oviposição. Após este período, foi realizada a pulverização do extrato, com volume de 5 ml, nas concentrações indicadas. No bioensaio para avaliar a mortalidade de lagartas, o extrato foi empregado a 2000; 4000; 6000 e 8000 mg.L<sup>-1</sup>. Após a infestação com lagartas recém-eclodidas, os folíolos foram mantidos em tubos de vidro sendo a mortalidade avaliada diariamente até o sexto dia. Os autores constataram inexistência de efeito tóxico do referido extrato na viabilidade de ovos. Entretanto, observaram elevada mortalidade de larvas, a qual chegou a 100 % a partir do quinto dia na maior concentração.

Extratos aquosos de folhas, ramos, frutos verdes e maduros de *M. azedarach* foram avaliados em relação à traça *T. absoluta*. Inicialmente, o extrato de folhas a 0,1; 1 e 5 % foi avaliado a fim de definir a concentração adequada para estudos de bioatividade da referida planta. Em outro bioensaio, a fim de comparar as diferentes estruturas da planta, o extrato

foi empregado na concentração de 0,1 %, sendo também incluído o extrato aquoso de sementes de *A. indica*. Em ambos os ensaios, lagartas recém-eclodidas da traça se alimentaram de folíolos de tomateiro tratados, pela imersão por 10 segundos em solução com os extratos nas concentrações indicadas. Os folíolos infestados, com pecíolos envoltos por algodão umedecido, foram mantidos em tubos de vidro tamponados com algodão hidrófugo. A cada 2 ou 3 dias, novos folíolos eram tratados e oferecidos às lagartas remanescentes. As pupas foram separadas por sexo, pesadas após 24 h e mantidas individualizadas em tubos de vidro até a emergência dos adultos. Foi constatado que o extrato de *M. azedarach* a 0,1; 1 e 5 %, ocasionou redução da sobrevivência de larvas e alongamento do período de desenvolvimento das sobreviventes, sendo que a 5 %, foi observada mortalidade superior a 90 %. Os extratos a 0,1 %, de todas as estruturas de *M. azedarach* e, em destaque, o de sementes de *A. indica*, prolongaram a fase de larva de *T. absoluta* e reduziram a sobrevivência das mesmas (Brunherotto, 2000; Brunherotto & Vendramim, 2001).

O efeito de extratos aquosos de folhas e ramos de *Trichilia pallida* foi avaliado, em ensaios individualizados, sobre o desenvolvimento e a oviposição de *T. absoluta*. Na avaliação do efeito sobre a biologia do inseto, ambos os extratos foram testados a 0,1; 1 e 5 % e utilizando-se como controle água destilada. Folíolos de tomateiro, da cv. Santa Clara, foram imersos nos referidos extratos durante 10 segundos, e depois de eliminado o excesso de umidade, tiveram seus pecíolos envolvidos por algodão hidrófilo, sendo então infestados com 3 lagartas recém-eclodidas da traça. No ensaio para avaliar o efeito ovicida, o extrato de folhas foi empregado nas concentrações de 1 e 5 %, sendo utilizada água como controle. Ovos do inseto foram transferidos para folíolos de tomateiro que foram mantidos em placas de Petri revestidas com papel filtro umedecido. Na avaliação da preferência para oviposição, em teste com chance de escolha, foram empregadas gaiolas plásticas, sendo que, em cada foram dispostos 2 frascos de vidro, um com folha de tomateiro previamente submersa em extrato de

folhas a 5 % e outro com folha previamente submersa em água. Foram liberados adultos nas densidades de 10 e 20 por gaiola, em ensaios separados. Foi constatado que extratos de partes da planta, principalmente de folhas, prejudicaram o desenvolvimento larval do inseto sem, no entanto, apresentar efeito ovicida. Foi observado, além disso, que o substrato quando tratado com o extrato de folhas a 5 %, dependendo da densidade populacional da praga, tornou-se menos preferido para oviposição (Thomazini et al., 2000; Vendramim & Thomazini, 2001).

A estimativa de concentrações letais de NeemAzal® T/S, formulado à base de sementes de *A. indica*, foi realizada em laboratório com lagartas recém-eclodidas da traça *T. absoluta*. O ensaio foi constituído de 5 tratamentos, sendo 4 concentrações: 0,03; 0,06; 0,18 e 0,3 % acrescidas de um controle com água. Folíolos de tomateiro, previamente tratados através de imersão em soluções dos referidos tratamentos, foram infestados com 4 lagartas num total de 100 indivíduos por tratamento. Os folíolos foram mantidos em placas plásticas até o sexto dia após infestação (DAI), sendo que no terceiro dia, novos folíolos tratados como descrito acima, foram oferecidos às lagartas remanescentes. Foi constatado que a CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub> foram 0,04 e 0,17 % respectivamente, indicando, portanto, boas perspectivas de uso do NeemAzal® T/S no controle do inseto. Em ensaio nos moldes do anterior, foi realizada avaliação do NeemAzal® T/S a 0,18 e 0,3 % comparada com o inseticida Match® 50 CE a 0,08 % (lufenuron) e água como controle. A mortalidade aos 4 e 8 DAI, a 0,18 e 0,3 % do p.c. foi significativamente superior ao lufenuron e controle. As mortalidades aos 8 DAI, de 95 e 96,7 % a 0,18 e 0,3 % do p.c. respectivamente, indicam o grande potencial de NeemAzal® T/S para o controle de *T. absoluta* (Cunha et al., 2003a e b).

Gonçalves-Gervásio (2003) avaliou a atividade de extratos aquosos e não aquosos (hexânico, metanólico, etanólico e clorofórmico) de folhas de *T. pallida* e aquoso de sementes de *A. indica* sobre a traça-do-tomateiro. Este último foi utilizado em concentrações variáveis de 0,5 a 10 %, em

bioensaio preliminar, a partir do qual foram selecionadas para emprego em ensaios subseqüentes, as concentrações 0,5; 1 e 5 %. Posteriormente, foi realizada a seleção dentre os extratos orgânicos de *T. pallida*, sendo considerado mais eficiente o clorofórmico. Uma vez definidas as concentrações e o extrato orgânico mais eficiente, foram realizados bioensaios, então incluindo os extratos aquosos de *T. pallida* e de nim. Foi constatado que o extrato aquoso de sementes de nim ocasiona elevada mortalidade de larvas, mesmo em concentrações inferiores a 5 %, apresentando, ainda, efeito sistêmico, translaminar e por contato sobre *T. absoluta*. Dentre os extratos de *T. pallida*, o clorofórmico de folhas destacou-se como o mais eficiente, superando o hexânico e o aquoso. Ademais, os extratos aquosos e clorofórmico prejudicaram o desenvolvimento do inseto quando utilizados a concentrações maiores que 5 %, sendo capazes de atuar de forma sistêmica, por contato, e principalmente translaminar.

A ação ovicida e a eficácia da formulação à base de sementes de nim NeemAzal® T/S (azadiractina a 1 %) foi avaliada sobre *T. absoluta* a 0,2 e 0,4 % comparado ao inseticida Thiobel 500 a 0,25 %. Na avaliação do efeito ovicida, os inseticidas nas respectivas concentrações foram pulverizados, em torre de Potter, sobre folíolos de tomateiro contendo ovos da traça. No bioensaio de eficácia, plantas de tomateiro previamente infestadas com lagartas recém-eclodidas, foram pulverizadas com o NeemAzal® T/S e com o Thiobel 500 nas concentrações já citadas. Em ambos os bioensaios, foi incluída água como controle. A viabilidade dos ovos foi de 86 e 88 % com NeemAzal® T/S a 0,2 e 0,4 % respectivamente, evidenciando a não ocorrência de efeito ovicida. Entretanto, todos os tratamentos apresentaram-se eficientes, sendo que o NeemAzal® T/S a 0,4 % ocasionou 90,9 % de controle do inseto (Bogorni et al., 2004a). A avaliação do efeito residual de NeemAzal® T/S a 0,4 % foi feita em casa de vegetação, infestando-se plantas de tomateiro com lagartas recém-eclodidas da traça aos 0, 2, 4 e 6 dias após a pulverização (DAP) com o citado produto. Foi



constatado que até os 2 DAP o inseticida apresentou-se eficaz no controle de lagartas (94,6 %). Após esse período, a eficiência foi reduzida, ocorrendo 64,7 e 43,2 % de mortalidade aos 4 e 6 dias respectivamente. A rápida degradação no ambiente pode ser interessante, uma vez que se espera que isto também ocorra nos produtos agrícolas (Bogorni et al., 2004b).

Com base no exposto, observa-se que as pesquisas até então realizadas com a traça-do-tomateiro apenas enfocam a avaliação e o uso de extratos de plantas inseticidas, sem portanto, estarem diretamente imbuídas na busca de substâncias de tais plantas responsáveis pelos efeitos biológicos observados.

### **2.3 Técnicas usadas na busca de substâncias de plantas com atividade inseticida**

O processo envolvido na busca de substâncias de plantas com atividade inseticida constitui-se de várias etapas, podendo, segundo Matos (1988), ser classificadas da seguinte maneira: 1 - escolha da planta a ser estudada; 2 - identificação botânica; 3 - avaliação prévia da composição química; 4 - isolamento e purificação dos constituintes principais e 5 - esclarecimento da estrutura molecular dos compostos puros e isolados, isto é, a determinação estrutural.

A escolha da espécie de planta a ser estudada é uma das etapas primordiais para que a pesquisa seja realmente exitosa. Nesse sentido, considerando-se a riqueza da flora existente, pode ser algo bastante difícil. Segundo Matos (1988), vários processos de seleção têm sido desenvolvidos ao longo da história da fitoquímica, todos eles condicionados a objetivos específicos e a técnicas postas à disposição do pesquisador. O conhecimento da flora da região a ser pesquisada, aliado à informação popular a respeito do uso das plantas, também são questões importantes que devem ser consideradas.

Por ocasião da coleta do material a ser estudado, deve-se proceder de forma a garantir sua identidade botânica. Exsicatas devem ser depositadas em herbário a fim de evitar possíveis dúvidas acerca da origem correta das substâncias isoladas e identificadas (Ferri, 1996; Matos, 1988). Estas questões são de grande relevância, principalmente em se tratando de plantas selvagens, pois segundo Hostettmann et al. (2003a), é difícil distinguir espécies próximas ou que se assemelham, levando a sérias confusões como por exemplo, não discriminar uma planta medicinal de uma tóxica. Outra questão, segundo este autor, está na coleta em grande escala, o que pode representar inclusive a extinção da espécie de determinada área. Por outro lado, algumas plantas são de difícil cultivo ou, quando este pode ser adotado, surgem conseqüências típicas da monocultura, como a necessidade do uso de agrotóxicos.

Para o isolamento de compostos bioativos de extratos complexos de plantas, geralmente leva-se um longo período de tempo, sendo que os fracionamentos e refracionamentos sucessivos exigem um grande esforço por parte dos pesquisadores. Além do mais, apesar do grande esforço empreendido, apenas uma pequena porcentagem deste é realmente significativo, uma vez que as substâncias ativas poderão representar apenas um pequeníssimo volume, em relação ao total de constituintes da fração trabalhada (Escoubas et al., 1992). Nesse sentido, a avaliação prévia da composição química, além de facilitar a escolha do material a ser estudado, permite melhor adaptação das técnicas de fracionamento de extratos e isolamento e caracterização química das substâncias puras, de acordo com a natureza dos constituintes previamente detectados, facilitando assim o subsequente trabalho de isolamento e purificação dos constituintes de interesse (Hostettmann et al., 2003b; Matos, 1988).

Antecedendo o isolamento e a purificação, está a correta preparação dos extratos brutos das plantas. Assim, a escolha por um determinado método de extração vai depender da textura e do conteúdo de água presente no material a ser extraído, bem como do tipo de substância que se

deseja isolar. Com uma extração inicial que utiliza solventes de baixa polaridade obtêm-se compostos mais lipofílicos, de outra forma, com solventes alcoólicos obtêm-se um amplo espectro de material polar e apolar. Ao se optar por um solvente mais polar para o primeiro passo da extração, os fracionamentos posteriores permitem uma divisão mais fina em frações de distintas polaridades. O procedimento clássico para obtenção de extratos orgânicos de material vegetal seco e triturado é a extração por solventes de polaridade crescente, sendo os principais, o hexano, clorofórmio e etanol ou metanol (para compostos mais polares). Sempre que possível, é interessante optar por estes solventes, em vez da água, pois além de serem mais facilmente evaporados, previnem o desenvolvimento de microrganismos. O processo de extração a frio por percolação, apesar de requerer um volume maior de solvente, apresenta menor risco de reações provocadas pela ação combinada do calor, luz e solvente na formação de artefatos. Pela mesma razão, a concentração dos extratos deve ser feita sob pressão reduzida, o que diminui o tempo para a recuperação do solvente (Ferri, 1996; Hostettmann et al., 2003b; Matos, 1988; Shimizu, 1998; Silva et al., 1998).

A separação e a purificação dos constituintes químicos de interesse, a partir de um extrato de planta, são feitas através de diversas técnicas cromatográficas, uma vez que não existe uma universal capaz de solucionar todos os problemas envolvidos durante a separação dos componentes de uma mistura. Normalmente, os melhores resultados decorrem da utilização combinada de uma ou mais destas técnicas (Ferri, 1996). Dentre as técnicas disponíveis estão a cromatografia em camada delgada (CCD), caracterizada pela versatilidade, rapidez de desenvolvimento e sensibilidade; CCD centrífuga; cromatografia em coluna, a qual, pela sua simplicidade de operação é universalmente utilizada; cromatografia líquida (CL) preparativa sob pressão e cromatografia de partição centrífuga (Ferri, 1996; Hostettmann et al., 2003b).

Além das diversas técnicas de cromatografia citadas, também estão

disponíveis técnicas acopladas, as quais permitem a economia de tempo, evitando isolamento de compostos já conhecidos e que podem ser utilizadas antes mesmo do estágio de fracionamento do extrato. As técnicas são CL/UV (ultravioleta), que é o emprego da cromatografia líquida juntamente com um detector de UV; CL/EM (espectrometria de massas), a qual caracteriza-se pela grande sensibilidade, proporcionando a separação de massas e CL/RMN (ressonância magnética nuclear) que é a técnica capaz de complementar as anteriores, proporcionando informações adicionais para a completa identificação de uma nova substância (Hostettmann et al., 2003c).

Por fim, tendo-se os novos compostos isolados, passa-se à etapa de determinação estrutural da molécula. Para isso, faz-se necessário o uso de vários métodos, isolados ou, em geral, combinados, e da interpretação de espectros obtidos em aparelhagem especial, principalmente espectrômetros de UV; IV (infravermelho); (EM); (RMN), que pode ser de próton ou de carbono (Di Stasi, 1996; Ferri, 1996; Matos, 1988).

Dada a grande dificuldade na execução das inúmeras técnicas citadas, bem como a interpretação dos espectros das substâncias, é praticamente impossível para um pesquisador de outra área reunir as condições necessárias para proceder a determinação e elucidação de uma estrutura química, que muitas vezes é um enorme desafio mesmo para os especialistas no assunto (Di Stasi, 1996; Ferri, 1996). Nesse sentido, fica evidente que apenas através de pesquisas multidisciplinares é que avanços consistentes, relacionados à obtenção de novas moléculas inseticidas, poderão ocorrer.

## **2.4 Extratos e substâncias de *Trichilia* spp. com atividade inseticida**

### **2.4.1 Pesquisas no exterior**

Nakatani et al. (1981 e 1985), através do estudo do córtex da raiz

de *Trichilia roka*, coletada no Quênia, isolaram limonóides denominados triquilinas (A, B, C, e D) através da extração com éter e diversas técnicas cromatográficas. O limonóide 7-acetiltriquilina A foi identificado como inibidor alimentar de diversas espécies de insetos-praga, tais como: *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera littoralis* (Boisd.) e *Epilachna varivestis* Muls. Nakanishi (1982) também estudou o efeito das triquilinas A, B, C e D em insetos e em outros organismos. Tais autores constataram que embora as triquilinas sejam comparáveis à azadiractina em termos de atividade, suas estruturas complexas também dificultam a síntese em maior escala. Nesse sentido, citam que o uso de extratos brutos é uma boa alternativa a ser considerada.

Kubo & Klocke (1982) identificaram o limonóide sendanina em frutos frescos de *T. roka* e demonstraram que tal substância é responsável pela inibição do crescimento de 4 importantes insetos-praga do algodoeiro: *Helicoverpa zea* (Bod.), *Heliothis virescens* (Fabr.), *S. frugiperda* e *Pectinophora gossypiella* (Saund.). Esta última foi considerada a mais suscetível ao composto.

Extratos em hexano e em etanol de sementes de 21 espécies de Meliaceae foram avaliados em comparação com extratos de sementes de nim, sobre larvas de *S. frugiperda*. Foi constatado que os extratos em etanol a 1 % (p/v), em teste sem chance de escolha, das 3 espécies de *Trichilia* (*T. connaroides*, *T. roka* e *T. prieuriana*) ocasionaram mortalidade de 80, 100 e 100 % respectivamente. No entanto, com o extrato em hexano, não foi obtido resultado interessante, uma vez que apenas para *T. prieuriana* foi constatada mortalidade (40 %). Em bioensaio com chance de escolha, foi observado que os extratos etanólicos (5 %) ocasionaram inibição alimentar superior à ocorrida com os em hexano. No entanto, para extratos de *Trichilia triphylaria*, não foi constatada mortalidade e inibição alimentar (Mikolajczak & Reed, 1987; Mikolajczak et al., 1989).

Xie et al. (1994) avaliaram o extrato em etanol, de diferentes estruturas de 9 espécies de *Trichilia*, quanto à atividade sobre lagartas de

*Peridroma saucia* (Hübner) e *Spodoptera litura* Fabr. A hirtina, limonóide presente em *Trichilia hirta*, inibiu significativamente o crescimento de *P. saucia*. Os extratos de *T. connaroides*, exceto o de folhas, apresentaram boa atividade sobre *P. saucia*, destacando-se o obtido da casca. No bioensaio nutricional, foi constatado que extratos de *T. connaroides*, quando adicionados à dieta artificial, ocasionaram redução significativa do crescimento, da taxa de consumo e da eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD), de ambas as espécies de insetos. Tais resultados confirmam ambos os efeitos, comportamental, representado pela inibição do crescimento, e toxicidade pós-ingestiva. Ademais, o limonóide hirtina foi apontado como o responsável pela maior parte da atividade de extratos de *T. hirta*, não sendo, portanto, o principal em outras espécies de *Trichilia*.

O efeito de compostos com diferentes modos de ação sobre a protease digestiva e a detoxificação de enzimas do intestino médio de larvas do besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Say) foram avaliados por Ortego et al. (1999). Larvas do inseto foram alimentadas em discos de folhas de batata tratados com os limonoides tóxicos azadirona e a mistura de 1,7-di-*O*-acetilhavanensina e 3,7-di-*O*-acetilhavanensina de *Trichilia havanensis* e o terpenóide deterrente *neo-clerodane* de *Scutellaria alpina* (Labiatae). Foi constatado que a azadirona, que causa baixa mortalidade, diminuiu a atividade da esterase e aumentou a atividade da enzima de detoxificação glutathione *S*-transferase. No entanto, exceto para esta enzima, no período pós-tratamento, com a transferência das larvas para discos não tratados, a atividade enzimática voltou a níveis normais. Os limonóides quando misturados apresentaram-se muito tóxicos, ocasionando elevada mortalidade de larvas, redução significativa da atividade da protease digestiva e da esterase e aumento da glutathione *S*-transferase. Neste caso, apenas esta enzima apresentou níveis normais de atividade no período pós-tratamento. Em relação ao terpenóide com ação deterrente, não foi constatado qualquer efeito significativo no processo enzimático.

Ramírez et al. (2000) elucidaram a estrutura, a configuração absoluta e a análise conformacional detalhada de diterpenóides dolabelanos, isolados da madeira de *Trichilia trifolia*, guiados por mecanismos moleculares e por bioensaios com o gorgulho *Sitophilus oryzae* (L.). A atividade dos extratos e dos compostos puros, dissolvidos em etanol (70 %) e adicionados em placas de Petri contendo trigo, foi avaliada em teste com chance de escolha a 0,5 %. Dos 5 diterpenóides avaliados, 3 ocasionaram redução significativa na alimentação de adultos de *S. oryzae*. Além disso, os autores sugerem que provavelmente tais compostos desempenhem um papel de defesa na planta hospedeira do inseto.

O isolamento, a elucidação estrutural e a avaliação da deterrência alimentar de 3 tetranortriterpenóides de raízes de *T. pallida* sobre 4 espécies de lepidópteros foram realizados por Simmonds et al. (2001). Os compostos, dissolvidos em acetona, foram avaliados a 100 ppm em bioensaio com dupla chance de escolha por lagartas de último ínstar de *S. littoralis*, *Spodoptera exigua* (Hueb.), *H. virescens* e *Helicoverpa armigera* (Hübner). Com base em índices de alimentação, foi constatado que apenas um dos diterpenos avaliados inibiu a alimentação de larvas das 4 espécies de insetos consideradas. Para *S. littoralis*, houve maior inibição alimentar pelo extrato bruto em acetona de *T. pallida* (100 ppm), do que pelos tetranortriterpenóides isolados do referido extrato. Tal resultado, segundo os autores, pode estar relacionado a uma possível ação aditiva ou sinérgica entre os compostos, que uma vez separados, têm a atividade deterrente diminuída.

A deterrência do extrato metanólico de *Trichilia americana* foi avaliada sobre lagartas de *S. litura* em bioensaios com e sem chance de escolha (CCE e SCE). Discos de folhas de repolho (3,5 cm<sup>2</sup>) foram tratados, em ambos os lados, com 17,5 µl de metanol contendo 1,75 µg do referido extrato (0,5 µg/cm<sup>2</sup>). No teste SCE, o extrato foi aplicado a 0,5 e a 5 µg/cm<sup>2</sup>. Quando as lagartas ficaram, durante 4 dias, expostas a discos tratados com o extrato a 0,5 µg/cm<sup>2</sup>, em condições SCE, ou à concentração

de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , porém CCE, foi constatada alta deterrência do extrato. Entretanto, o índice de deterrência decresceu quando as lagartas alimentaram-se com discos tratados na menor concentração ( $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e SCE. Quando as lagartas foram avaliadas em arenas de tamanhos diferentes e CCE, ocorreu redução do consumo, nos discos tratados com o extrato, proporcional ao tamanho da arena. Apenas na menor arena as lagartas iniciaram a alimentação no disco tratado ao final de 12 h (Wheeler & Isman, 2000). Em pesquisa na mesma linha da anterior, Wheeler & Isman (2001) constataram que o extrato bruto em metanol de *T. americana* reduziu o crescimento, o consumo e a utilização do alimento ingerido e digerido, sugerindo a ocorrência não apenas de um efeito deterrente, mas também tóxico sobre lagartas de *S. litura*. Este efeito apenas foi observado quando as lagartas alimentaram-se seguidamente com o extrato, não sendo constatado por aplicação tópica ou injeção direta na hemocele. Como as lagartas, após ingerirem continuamente o extrato, recuperaram-se após transferência para o alimento não tratado, foi sugerido que o mesmo não danifica permanentemente o trato digestivo do inseto. Nesse sentido, um possível modo de ação em função de uma toxina crônica permanece desconhecido.

Wheeler et al. (2001) realizaram a seleção de diversas espécies de *Trichilia*, coletadas na Costa Rica, quanto à atividade sobre lagartas de *S. litura*. Extratos metanólicos de ramos de 39 plantas de 6 espécies de *Trichilia* foram incorporados à dieta artificial e avaliados em lagartas recém-eclodidas do inseto. O extrato de *T. americana*, a 1000 ppm com base no peso fresco, foi o mais ativo, reduzindo o crescimento em 3,9 % em relação ao controle. O segundo mais ativo foi o de *Trichilia glabra*. Quando lagartas foram expostas ao extrato em concentrações elevadas, também foi constatado o acréscimo de 1 ou 2 ínstarés antes de ocorrer a pupação. Isto demonstra que o inseto pode morrer em função do efeito deterrente, por inanição, ou pelo efeito pós-ingestivo do extrato.

Rodríguez et al. (2003) isolaram, a partir do extrato em acetona de



sementes de *T. havanensis*, um triterpenóide juntamente com outros limonóides conhecidos. O terpenóide foi avaliado quanto à atividade sobre o besouro *L. decemlineata* através de bioensaios sem chance de escolha, com discos de folhas de batata (1,77 cm<sup>2</sup>) tratados superficialmente com 20 µl de solução acetônica contendo o composto a 100, 300 e 500 ppm. A partir do peso seco dos discos, foi obtido o índice de deterrência para cada concentração. Os autores constataram, portanto, significativa atividade deterrente do extrato a 300 e 500 ppm sobre larvas de quarto ínstar de *L. decemlineata*.

Com base no exposto, observa-se que inúmeros extratos e substâncias de *Trichilia* spp. já foram de alguma forma avaliados biologicamente. No entanto, em razão da grande diversidade de insetos de importância econômica, e da crescente demanda por novas moléculas inseticidas, eficazes e menos danosas ao homem e ao ambiente, há ainda muito estudo a ser feito de maneira a melhor explorar biologicamente as inúmeras substâncias já identificadas. Ademais, muitas substâncias já foram isoladas de diversas espécies de *Trichilia* sem que qualquer tipo de atividade fosse relatada. Como exemplo destas, citam-se: limonóides de *T. havanensis* (Arenas & Rodríguez-Hahn, 1990; Rodríguez-Hahn et al., 1996); triterpenóides e um protolimonóide glucosídeo de *T. prieuriana* (Olugbade, 1991; Olugbade & Adesanya, 2000); protolimonóides e limonóides de *Trichilia schomburgkii* (Tinto et al., 1991); limonóides e triterpenóides de *T. connaroides* (Inada et al., 1994); esteróides de *T. hirta* (Chauret et al., 1996) e limonóides de *Trichilia emetica* (Gunatilaka et al., 1998).

#### **2.4.2 Pesquisas no Brasil**

As pesquisas desenvolvidas no País, visando avaliar o efeito inseticida de *Trichilia* spp., estão centralizadas basicamente em instituições na Região Sudeste. Entretanto, outras instituições nas mais variadas

Regiões do País, já desenvolvem importantes trabalhos na área, principalmente com *A. indica* e diversos insetos-praga e seus inimigos naturais.

Rodríguez & Vendramim (1996) compararam o efeito de extratos de folhas e ramos de 11 espécies de meliáceas no controle da lagarta-do-cartucho do milho *S. frugiperda*. Dentre as triquílias, foram avaliadas *T. casaretti*, *T. catigua*, *T. elegans* e *T. pallida*. Os referidos extratos foram incorporados à dieta artificial do inseto, por ocasião do seu preparo, à concentração de 1 % [20 ml de extrato a 5 % (p/v)/100 ml de dieta]. Os autores concluíram que ocorreu maior mortalidade quando as lagartas alimentaram-se em dieta contendo extrato de ramos de *Cabralea canjerana*, ramos e folhas de *M. azedarach* e *T. pallida* (100 %) e sementes de *Cedrella fissilis* (99 %). Como a mortalidade ocorreu em lagartas de ínstaes iniciais, tais extratos, se utilizados em condições de campo, reduziriam o dano do inseto. Ademais, os extratos obtidos de folhas de *T. casaretti* e ramos de *T. catigua* inibiram a alimentação de lagartas, sendo que o extrato de ramos de *T. elegans* a 5 % não demonstrou toxicidade à praga.

Extratos aquosos de 12 espécies de meliáceas foram avaliados por Rodríguez & Vendramim (1997) em *S. frugiperda*, incluindo o extrato de folhas de *T. catigua* e os extratos de folhas e ramos de *T. clausseii*. Tais extratos, preparados a 1 % [20 ml de extrato a 5 % (p/v)/100 ml de dieta], foram incorporados à dieta artificial do inseto. Como controle utilizaram dieta sem extrato. Concluíram que 8 das espécies estudadas, incluindo *T. clausseii*, apresentaram ao menos uma das estruturas vegetais com atividade tóxica em relação ao inseto. Dentre outros, o extrato de ramos de *T. clausseii* afeta o desenvolvimento de *S. frugiperda*, alongando a fase imatura e/ou reduzindo o peso de pupas. Ademais, nenhuma estrutura vegetal testada superou o extrato de sementes de *A. indica*.

Dada a necessidade de disponibilizar métodos de avaliação de extratos de plantas com atividade sobre insetos, o uso de índices nutricionais pode ser uma alternativa interessante, principalmente quando a

atividade inseticida deixa de ser o principal fator a ser considerado. Nesse sentido, Rodríguez & Vendramim (1998) avaliaram a atividade inseticida de 4 meliáceas, incluindo *T. claussoni*, em *S. frugiperda*, através de índices nutricionais. Dentre outras conclusões, em relação a *T. claussoni*, o maior consumo de alimento contendo o extrato desta espécie não se refletiu em maior ganho de peso, significando pequena inibição do crescimento. Menores eficiências de conversão do alimento ocorreram quando as larvas ingeriram extratos de *T. claussoni* e *Switenia macrophylla*, resultando em inibição do crescimento.

O extrato acetato de etila de folhas e ramos de *T. pallida* teve seu efeito avaliado em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de 4 genótipos de milho. A partir do extrato acetônico de folhas e ramos, foi obtido, através de cromatografia de partição, o extrato em acetato de etila que, diluído em acetona, foi utilizado a 0,001 %. O referido extrato e esta concentração foram definidos em bioensaios preliminares com 4 extratos orgânicos (Roel et al., 2000a) e diferentes concentrações do extrato acetato de etila (Roel et al., 2000b). Partes de folhas de milho foram imersas em solução do referido extrato e infestadas com lagartas recém-eclodidas, sendo tal procedimento realizado diariamente. Os autores constataram, portanto, que o desenvolvimento do inseto foi afetado pelo referido extrato, resultando em alongamento da fase de larva e diminuição do peso de lagartas e pupas (Roel & Vendramim, 1999).

A atividade inseticida de extratos aquosos de ramos de *T. pallida* e folhas de *M. azedarach* foi avaliada, em casa de vegetação, em relação à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em folíolos de tomateiro. Os referidos extratos, a 1, 2 e 3 % (p/v), foram pulverizados em folíolos de tomateiro contendo ovos do inseto. Foi constatado que os extratos aquosos de *T. pallida* e *M. azedarach* apresentam efeito sobre ovos de *B. tabaci*. Tais extratos, entretanto, mesmo na maior concentração, não afetaram a duração da fase imatura do inseto (Souza & Vendramim, 2000a). Extratos aquosos (3 % - p/v) de frutos verdes de *M. azedarach*, de ramos de *T.*

*pallida* e de sementes de *A. indica* foram avaliados em casa de vegetação, em relação a *B. tabaci*, por meio de pulverização em folíolos de tomateiro contendo ovos do inseto. Foi concluído que os extratos a 3 % (p/v) de frutos verdes de *M. azedarach*, de sementes de *A. indica* e de ramos de *T. pallida* apresentaram efeito sobre ovos do inseto, sendo o último mais eficiente. Em relação às ninfas, o extrato de sementes de *A. indica* mostrou-se superior aos demais (Souza & Vendramim, 2000b). Quando se consideraram extratos a 3 % (p/v) de diversas estruturas das meliáceas *M. azedarach* (ramos, folhas, frutos verdes e maduros) e *T. pallida* (ramos, folhas e córtex) também sobre ovos e ninfas da mosca branca, o extrato de frutos verdes de *M. azedarach* foi considerado o mais eficiente, seguindo-se o de folhas e o de frutos maduros. Para *T. pallida*, o extrato de ramos foi o mais eficiente seguido pelo de folhas (Souza & Vendramim, 2001).

Pereira (2001) avaliou extratos hexânicos, hidro-alcoólicos e metanólicos de folhas e ramos de *Trichillia catigua* através da incorporação dos mesmos, em diferentes concentrações, à dieta artificial de *S. frugiperda*. Foi constatada maior mortalidade larval (90 %) quando a dieta foi tratada com os extratos hidro-alcoólicos e metanólicos, sendo que, para os extratos hexânicos (baixa polaridade) a mortalidade foi inferior. Foi isolada a substância 3- $\beta$ -o- $\beta$ -D-glucopiranosil sitosterol a qual, a 50 ppm, ocasionou prolongamento da fase de larva e redução do peso de pupas.

Torrecillas & Vendramim (2001) avaliaram o desenvolvimento e sobrevivência de *S. frugiperda* em genótipos resistentes e suscetíveis de milho tratados com extratos aquosos, a 0; 0,1 e 1 % (p/v) de ramos de *T. pallida*. Partes de folhas de milho foram imersas em soluções dos respectivos extratos, sendo, após, infestadas com lagartas recém-eclodidas. Este procedimento, bem como a avaliação da mortalidade, foi realizado diariamente. Constataram que em folhas tratadas com o extrato a 1 %, ocorreu mortalidade total de lagartas nos 2 genótipos, enquanto que a 0,1 % o extrato reduziu a sobrevivência e o peso larval e prolongou o período de desenvolvimento.

O efeito inseticida e insetistático de extratos aquosos de diferentes estruturas de 13 espécies de plantas, incluindo o de folhas e de ramos de *T. pallida*, foi avaliado por Torres et al. (2001) sobre a traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (L.). Discos de folhas de couve foram tratados com os respectivos extratos a 10 % (p/v) através de imersão por 30 segundos. Após secagem ao ar livre, os discos foram transferidos para placas de Petri e infestados com 12 lagartas recém-eclodidas da traça. A cada 2 dias, os discos foram substituídos por outros tratados da forma descrita. Os autores constataram que apenas os extratos de *Aspidosperma pyrifolium* (Apocynaceae), de *A. indica* e a formulação à base de *A. indica* afetaram drasticamente a viabilidade de larvas. Os extratos de folhas e ramos de *T. pallida* não apresentaram efeito significativo sobre *P. xylostella* em relação aos demais extratos avaliados e o controle.

A eficiência de extratos aquosos (6,7 %) de ramos e folhas de *T. pallens*, ramos de *T. pallida* e sementes de *A. indica*, na redução do dano de *S. frugiperda* em plantas de milho em condições de campo, foi avaliada em comparação com o óleo de nim (0,5 %), o inseticida lufenuron (Match® 50 CE a 300 ml/ha) e um controle com água. Foram efetuadas duas pulverizações, com intervalo de 10 dias e volume de calda de 300 l/ha. As avaliações, semanais, foram realizadas através da atribuição de notas, variáveis de 1 (planta sem dano) a 5 (planta com cartucho totalmente destruído). Dentre os extratos de *Trichillia*, apenas o de folhas de *T. pallens* ocasionou redução de dano do inseto em relação ao controle, sendo superado pelo extrato aquoso de sementes de nim e do inseticida lufenuron (Bogorni et al., 2003).

A bioatividade de extratos aquosos de folhas e ramos de 6 espécies de *Trichillia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. claussenii*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*) foi comparada com a do extrato aquoso de sementes de *A. indica* sobre lagartas de *S. frugiperda* em laboratório. Partes de folhas de milho foram imersas em soluções dos referidos extratos (5 % - p/v) e infestadas com lagartas de primeiro ínstar, sendo tal procedimento executado

diariamente até o dia após instalação do ensaio. Maior eficiência foi constatada com o extrato de folhas de *T. pallens*, o qual ocasionou 100 % de mortalidade das lagartas, assemelhando-se ao resultado obtido com o extrato de sementes de *A. indica*. Redução da sobrevivência e do peso de larvas, embora menos evidentes, também foram obtidos com os extratos de ramos de *T. pallens* e de ramos e folhas de *T. pallida* (Bogorni & Vendramim, 2003).

Grisoto et al. (2003) realizaram pesquisa em laboratório objetivando avaliar a atividade de extratos aquosos de folhas e ramos de *T. pallida* e de sementes de *A. indica* em relação à cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stål.), usando água como controle. Soluções dos respectivos tratamentos foram aplicadas em duas épocas, no volume de 20 ml/planta. Foi observado que os 3 extratos ocasionaram mortalidade de ninfas significativamente superior ao controle, entretanto, apenas o extrato de folhas de *T. pallida* (29,38 ovos) e o de *A. indica* (1,33 ovos) levaram à redução da fecundidade em relação ao controle (53,58 ovos). Para as demais variáveis analisadas (duração do período embrionário e viabilidade de ovos), não houve efeito significativo dos extratos de triquílias.

Souza (2004) avaliou extratos aquosos e orgânicos de ramos de *T. pallida* e extratos aquosos de sementes de *A. indica*, em relação a ninfas e ovos da mosca-branca *B. tabaci* biótipo B. Na comparação dos extratos (5 % - p/v) metanólico, etanólico, clorofórmico e hexânico de ramos de *T. pallida* foi selecionado o extrato em clorofórmio como o mais eficiente sobre as ninfas do inseto. No ensaio com ovos de diferentes idades, foi constatado que a ação ovicida do extrato aquoso de sementes de nim não é afetada pela idade daqueles.

A atividade de limonóides isolados de frutos de *T. pallida* foi avaliada sobre lagartas de *S. frugiperda* em dieta artificial. A partir da fração em diclorometano, foram isolados, através de sucessivos fracionamentos cromatográficos, os limonóides gedunina, 22-desacetilgedunina e limonina. Soluções destes (30 µl), a 1000 e 5000 ppm, foram adicionadas sobre

1,25 ml de dieta e, após evaporação do solvente, lagartas de primeiro ínstar foram inoculadas. Aos 10 dias após a inoculação, as mortalidades registradas nas dietas com gedunina, 22-desacetilgedunina e limonina foram 69, 78 e 92 % respectivamente (Rocha et al., 2004).

Embora as pesquisas realizadas com plantas inseticidas no Brasil ainda não sejam tão expressivas numericamente, há grande número de estudos fitoquímicos com diversas espécies de *Trichilia*, de maneira que muitas substâncias já foram isoladas de tais plantas, sem, contudo, terem sido avaliadas quanto ao potencial inseticida. Dentre tais substâncias estão triterpenóides e lactonas isoladas de *T. clauseni* (Pupo et al., 1996 e 1998), butenolídeos de *Trichilia stipulata* (Cortez et al., 1998 e 2001); glicosídeos cianogênicos de inúmeras espécies, dentre estas *T. casaretti* e *T. elegans* (Francisco & Pinotti, 2000) e diversos limonóides de *Trichilia hirta*, *T. elegans* ssp. *elegans* e *T. stipulata* (Cortez et al., 1992 e 2000; Garcez et al., 1996, 1997 e 2000). Nesse sentido, segundo Vieira et al. (2001), a busca por substâncias com atividade inseticida ainda é um grande atrativo, em razão do número inestimável de substâncias presentes na natureza e do reduzido número de espécies de plantas estudadas com esta finalidade.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram realizados no laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, Setor de Entomologia, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP.

As extrações, os fracionamentos cromatográficos, o isolamento e a caracterização química de substâncias de *Trichilia pallida* Swartz e *T. pallens* C. de Candolle, ambas Meliaceae, foram realizados no laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos, SP.

#### 3.1 Criação de *Tuta absoluta* (Meyrick)

Durante o período de realização dos bioensaios, manteve-se em laboratório sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C, UR de  $60 \pm 10$  % e fotofase de 14 h, criação da traça-do-tomateiro *T. absoluta*, segundo metodologia de criação adaptada de Pratisoli (1995).

A criação foi iniciada a partir de lagartas coletadas em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) em área experimental do Setor de Entomologia da ESALQ. Em laboratório, folhas de tais plantas contendo lagartas, tiveram seus pecíolos envolvidos por algodão hidrófilo e imersos em água, no interior de frascos plásticos, a fim de manter sua turgescência. Os referidos frascos contendo as folhas eram mantidos em bandejas plásticas de criação organizadas em prateleira de aço. Diariamente,



substituíam-se as folhas, juntamente com os frascos contendo água, na medida em que estas se tornavam inadequadas à alimentação (desidratadas ou muito danificadas). Folhas novas, da cv. Santa Clara, eram colocadas sob ou junto às velhas, de maneira a facilitar a migração das lagartas para o material renovado. Os folíolos em que as lagartas haviam se alimentado e que continham pré-pupas e/ou pupas do inseto, eram deixados em bandeja plástica de 1 a 2 dias e após, já desidratados, eram colocados em vidros (14 cm de altura x 6 cm de diâmetro) cobertos por tecido tipo *voil* a fim de evitar a fuga de adultos por ocasião da emergência.

Assim que adultos eram visualizados no interior dos vidros, estes eram colocados, retirando-se o *voil*, em gaiola telada (36 cm de altura e 30 cm de diâmetro) contendo, como substrato de oviposição, folha de tomateiro com pecíolo envolvido por algodão e imerso em frasco com água a fim de evitar a desidratação. A cada dois dias substituía-se o frasco contendo a folha e ovos do inseto, sendo que as lagartas, à medida que eclodiam, eram transferidas para bandejas de criação ou utilizadas nos bioensaios.

### **3.2 Obtenção e manutenção de plantas de tomateiro**

Sementes de tomateiro, cv. Santa Clara, foram semeadas em bandejas contendo substrato à base de vermiculita, sendo que o transplante das mudas era feito em torno de 15 dias após semeadura, para vasos com 27 e 21 cm de altura e diâmetro respectivamente. As plantas foram cultivadas em estufa durante todo o período de execução dos bioensaios, uma vez que não há dieta artificial que permita a adequada manutenção da população da traça em laboratório. Além do mais, por ocasião dos bioensaios, utilizou-se grande número de folíolos de tomateiro, já que os extratos e substâncias foram pulverizados sobre estes.

### 3.3 Obtenção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens*

As folhas e ramos de *T. pallida* (Figura 1A) foram coletadas, em março de 2002 e novembro de 2003, no *campus* da ESALQ/USP. As coletas de folhas e ramos de *T. pallens* (Figura 1B) foram realizadas em setembro de 2002 e novembro de 2003, no Lajeado das Orquídeas, no município de Sapopema, PR. Exsicatas de *T. pallida* e *T. pallens* estão depositadas no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, sob número de tomo ESA 81288 e ESA 81286 respectivamente.

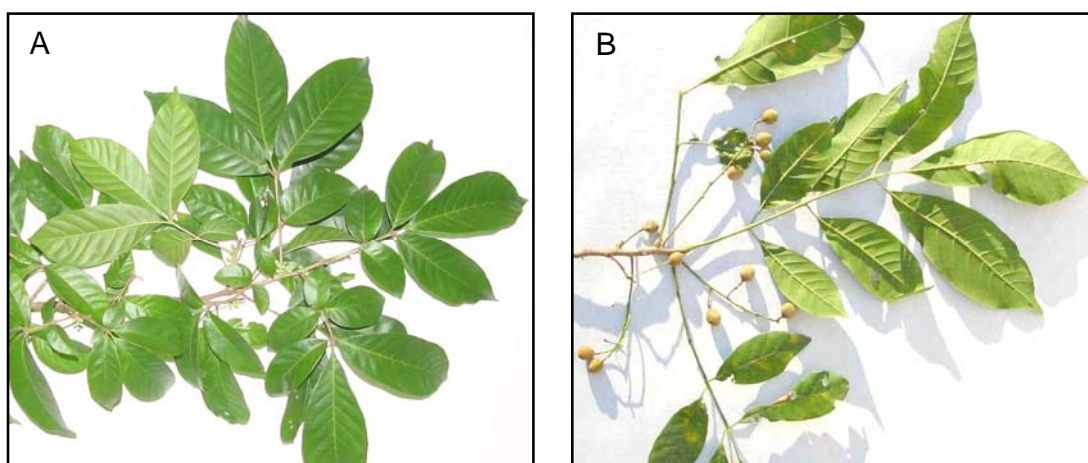


Figura 1 - *Trichilia pallida* (A) e *Trichilia pallens* (B). Fotos: P. C. Bogorni

O material coletado (folhas e ramos) de ambas as espécies foi desidratado em estufa a 40 °C, por 48 a 72 h. Após esta etapa, o material foi triturado em moinho de facas até a obtenção de um pó. Os pós foram armazenados separadamente por espécie, em frascos hermeticamente fechados até o preparo dos extratos.

Primeiramente, obtiveram-se os extratos aquosos liofilizados de

folhas e ramos de *T. pallida* e *T. pallens* (item 3.4). Para isso, realizou-se extração por maceração em marote de 70 g de pó, de cada parte da planta de ambas as espécies de *Trichilia*, durante 72 h. Diariamente, substituía-se a água, filtrava-se através de filtro de papel até a obtenção das soluções (extraído + água) correspondentes a cada parte de planta das espécies consideradas. A partir de tais soluções, em liofilizador Pump Savant VLP 80, obtiveram-se os referidos extratos aquosos liofilizados, os quais foram mantidos em dessecador com sílica ativada. Com base na quantidade de extrato obtido, foi possível calcular o rendimento de extração, já que se partiu de 70 g de pó para cada parte da planta.

#### **3.4 Seleção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens* com atividade sobre *Tuta absoluta***

Este bioensaio foi realizado com o objetivo de identificar, dentre os extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *T. pallida* e *T. pallens*, o de maior atividade inseticida sobre lagartas da traça-do-tomateiro *T. absoluta*. Para tanto, o experimento foi conduzido, considerando-se separadamente cada espécie com seus respectivos extratos, em delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 repetições de cada um dos 3 tratamentos: extrato aquoso liofilizado de folhas (3 %); extrato aquoso liofilizado de ramos (3 %) e controle (água). Os extratos foram aplicados em folíolos de tomateiro por meio de pistola tipo gravidade (Arprex<sup>®</sup>, modelo 5, 20/30 lb/pol<sup>2</sup> com bico de 0,8 mm) adaptada como mini-atomizador. O volume de solução (extrato + solvente) aplicada foi na proporção de 40 ml para 24 folíolos. Para eliminação do excesso de umidade, os folíolos permaneceram cerca de 5 min sobre papel filtro. Visando à manutenção da turgescência, estes tiveram seus pecíolos envolvidos por algodão hidrófilo umedecido diariamente. Em cada folíolo,

sendo 4 por repetição, foram infestadas 5 lagartas recém-eclodidas da traça, totalizando 120 indivíduos por tratamento. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas circulares com 6 cm de diâmetro. Aos 5 dias após a infestação (DAI), as lagartas remanescentes foram transferidas para novos folíolos, preparados como descrito acima, porém não tratados, e mantidas até 10 DAI.

Avaliou-se a mortalidade diariamente, sendo que, para efeito de análise estatística, consideraram-se as mortalidades (%) aos 5 e 10 DAI. Na comparação de tratamentos foi empregado o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ), sendo as transformações dos dados realizados com base em teste (Hartley) para avaliação da homocedasticidade de variâncias.

### **3.5 Obtenção de extratos não aquosos de folhas de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens***

Uma vez definido que os extratos de folhas de ambas as espécies de *Trichilia* foram mais ativos que os de ramos, obtiveram-se os extratos não aquosos (Figura 2) conforme descrito a seguir. De maneira similar à usada na obtenção do extrato aquoso, exceto a liofilização, fez-se a extração por maceração usando-se como solventes, em ordem crescente de polaridade, o hexano, o diclorometano e o metanol. Para cada solvente, foi feita a extração até a exaustão, usando-se a seguir o solvente de polaridade imediatamente superior. A cada troca de solvente filtrava-se através de papel filtro, e concentrava-se em rotavapor a 40 °C e à pressão de - 600 mmHg, obtendo-se assim os respectivos extratos em hexano, diclorometano e metanol. A torta remanescente foi desprezada.

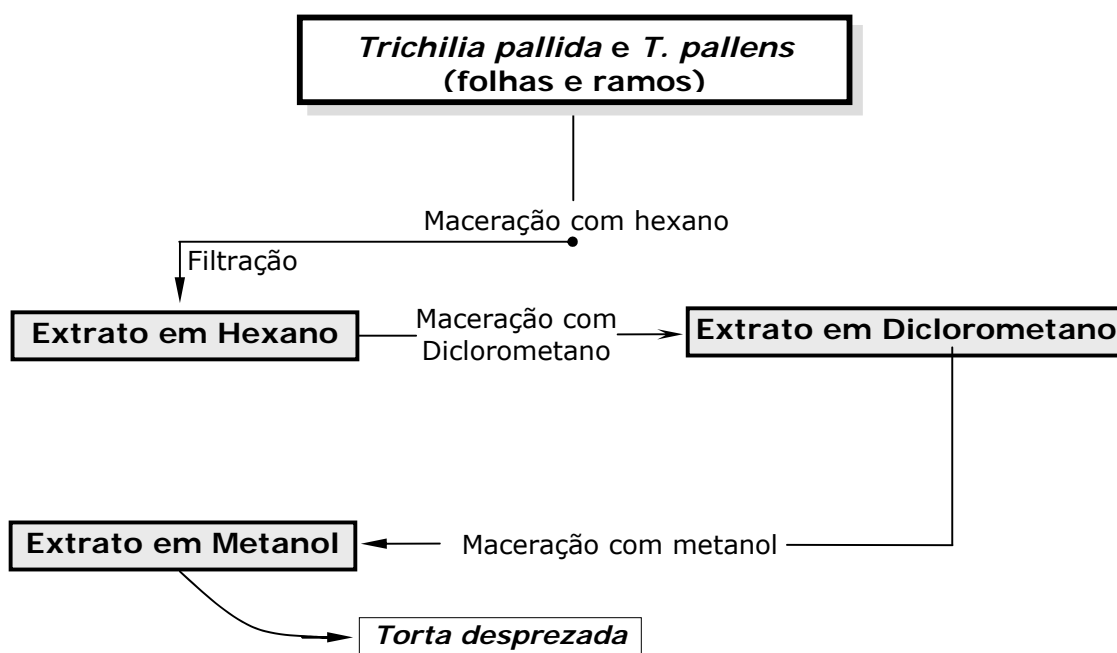


Figura 2 - Esquema usado na obtenção dos extratos não aquosos de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens*

Após ressuspensão dos mesmos e evaporação do solvente em capela com fluxo de ar, obteve-se o rendimento de extração para cada solvente e parte da planta considerada.

### 3.6 Estimativa da $CL_{50}$ do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* para lagartas de *Tuta absoluta*

Com o objetivo de definir uma concentração a ser usada nos bioensaios com extratos não aquosos de folhas de *T. pallida* e *T. pallens*, utilizaram-se diferentes concentrações do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida*, pois Gonçalves-Gervásio (2003) considerou o extrato em clorofórmio (equivalente ao diclorometano) o mais eficiente em relação a *T. absoluta*. Neste sentido, foram utilizadas as concentrações 1,5; 3,0; 4,5 e

6,0 %, além de um controle com acetona.

O tratamento de folíolos de tomateiro foi realizado, por meio de mini-atomizador, com o extrato nas concentrações acima mencionadas. Seus pecíolos foram envolvidos com algodão hidrófilo, o qual foi diariamente umedecido a fim de manter a turgescência, sendo que, para a eliminação do excesso de umidade, permaneceram durante aproximadamente 5 min sobre papel filtro. Em cada folíolo, sendo 4 por repetição, foram infestadas 6 lagartas recém-eclodidas, totalizando 24 indivíduos por repetição. Cada concentração foi repetida 6 vezes. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas circulares com 6 cm de diâmetro. Avaliou-se a mortalidade diariamente, sendo que, para efeito de análise estatística, considerou-se a mortalidade acumulada (%) e o peso das lagartas (mg) aos 6 DAI.

Na análise de probit, usou-se o programa POLO-PC, sendo que as significâncias foram determinadas pelo teste t ( $P < 0,05$ ) e as doses letais de interesse através da relação entre as estimativas dos coeficientes. A associação entre as diferentes concentrações do extrato utilizado e o peso de lagartas aos 6 DAI, foi feita através de análise de regressão linear.

### **3.7 Seleção de extratos não aquosos de *Trichilia pallida* e *T. pallens* com atividade sobre *Tuta absoluta***

Uma vez obtidos os extratos não aquosos (item 3.5) e definida a concentração, equivalente a 1/5 da  $CL_{50}$  estimada (item 3.6), foram feitos os bioensaios objetivando-se selecionar, dentre os extratos em hexano, diclorometano e metanol, para *T. pallida* e *T. pallens*, o mais ativo sobre *T. absoluta*. Nesse sentido, separadamente para cada espécie de *Trichilia*, adotou-se delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições e 5 tratamentos: 3 extratos de folhas a 1 % (hexano, diclorometano e metanol) e os controles acetona e água. Incluiu-se a acetona como controle em

virtude de os referidos extratos terem sido diluídos neste solvente.

Folículos de tomateiro previamente tratados, por meio de mini-atomizador, com os extratos correspondentes aos tratamentos acima mencionados foram infestados com lagartas recém-eclodidas da traça. Entretanto, antecedendo a infestação, para eliminação do excesso de umidade, os folículos permaneceram durante aproximadamente 5 min sobre papel filtro, sendo que, para manter a turgescência, seus pecíolos foram envolvidos por algodão hidrófilo, o qual foi umedecido diariamente. Em cada folículo, sendo 5 por repetição, foram infestadas 4 lagartas, totalizando 120 indivíduos por tratamento. Depois de infestados, os folículos foram transferidos para placas plásticas com 6 cm de diâmetro onde permaneceram até 6 DAI.

A mortalidade foi avaliada diariamente, sendo que, para efeito de análise estatística, consideraram-se as mortalidades acumuladas (%) aos 3 e 6 DAI e o peso de lagartas (mg) aos 6 DAI. Na comparação de tratamentos empregou-se o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ), sendo as transformações dos dados, quando necessárias, realizadas com base em teste (Hartley) para avaliação de homocedasticidade de variâncias.

### **3.8 Fracionamento do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens***

Os extratos em diclorometano de folhas de *T. pallida* e *T. pallens* foram fracionados através de partição líquido-líquido (Figura 3), resultando nas frações em hexano, metanol, acetato de etila, n-butanol e aquosa. A utilização deste sistema permitiu agrupar substâncias com polaridades próximas e direcionar a escolha do procedimento cromatográfico usado no isolamento das substâncias (Rocha, 2001).

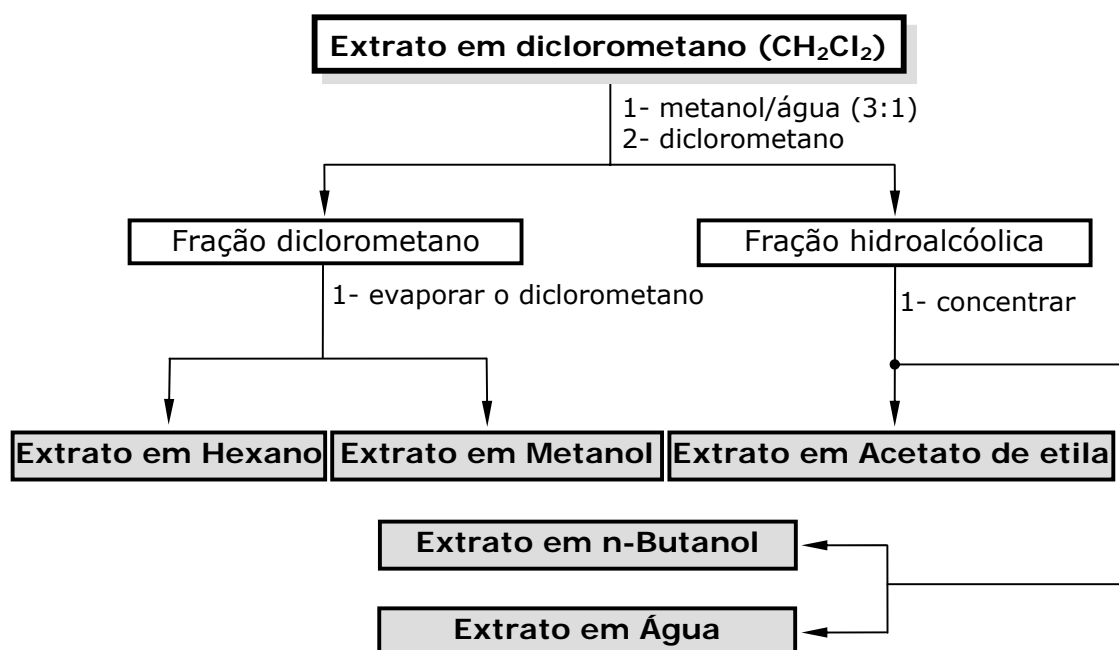


Figura 3 - Esquema da partição líquido-líquido dos extratos em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens*

As frações obtidas, de ambas as espécies de *Trichilia* foram deixadas em capela com fluxo de ar até completa desidratação. Em seguida, suas massas foram aferidas e determinados os rendimentos de extração tendo-se como base as massas dos respectivos extratos em diclorometano.

### 3.9 Seleção de frações do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens* com atividade sobre *Tuta absoluta*

Assim que se obtiveram as frações dos respectivos extratos em diclorometano de folhas de *T. pallida* e *T. pallens*, fez-se este bioensaio com o objetivo de selecionar a de maior atividade inseticida em lagartas de *T. absoluta*.



Foram realizados bioensaios para cada espécie de *Trichilia*, separadamente, conforme delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 repetições e 7 tratamentos: 5 frações do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* e *T. pallens*, a 0,15 e 0,10 % respectivamente (hexano, metanol, acetato de etila, n-butanol e aquosa) acrescidas dos controles acetona e água.

Após o tratamento de folíolos de tomateiro, por meio de mini-atomizador, com as frações acima mencionadas, seus pecíolos foram envolvidos com algodão hidrófilo, umedecido diariamente, a fim de manter a turgescência, sendo que, para a eliminação do excesso de umidade, permaneceram durante cerca de 5 min sobre papel filtro. Em cada folíolo, sendo 4 por repetição, foram liberadas 4 lagartas, totalizando 96 indivíduos por tratamento. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas (6 cm de diâmetro) onde permaneceram até 6 DAI.

A mortalidade de lagartas foi avaliada diariamente até os 6 DAI, sendo que, para efeito de análise estatística, consideraram-se as variáveis mortalidade acumulada (%) aos 3 e 6 DAI e peso de lagartas (mg) aos 6 DAI. Na comparação de tratamentos foi empregado o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.10 Fracionamento da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida***

A fração em metanol de folhas de *T. pallida* foi particionada, conforme demonstrado na Figura 4, de maneira que se obtiveram 5 subfrações (9-16, 17-37, 41-49, 1-9 e FC7) com potencial atividade sobre lagartas de *T. absoluta*. Tais subfrações foram selecionadas com base nas análises em cromatografia em camada delgada (CCD) e na quantidade (mg) necessária para realização dos bioensaios.

Como o objetivo foi a obtenção da menor fração com atividade inseticida, foram realizados bioensaios incluindo-se as referidas subfrações, buscando-se identificar tal característica e, a partir de novos fracionamentos, chegar à substância ativa.

### **3.10.1 Atividade de subfrações da fração em metanol de folhas de *Trichilia pallida* sobre *Tuta absoluta***

A atividade das subfrações referidas no item 3.10 foi avaliada por meio de um bioensaio com delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 repetições e 5 tratamentos: 4 subfrações (9-16, 17-37, 41-49 e 1-9) da fração em metanol de folhas de *T. pallida* a 0,3 % e o controle (acetona).

Após os folíolos de tomateiro serem tratados, por meio de mini-atomizador, com as subfrações acima mencionadas, e terem o excesso de umidade eliminado, pela permanência durante aproximadamente 5 min sobre papel filtro, foram infestados com lagartas recém-eclodidas de *T. absoluta*. A fim de manter a turgescência dos folíolos, seus pecíolos foram envolvidos por algodão hidrófilo, o qual foi umedecido diariamente. Em cada folíolo, sendo 4 por repetição, foram liberadas 5 lagartas, totalizando 120 indivíduos por tratamento. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas (6 cm de diâmetro) onde permaneceram até 6 DAI.

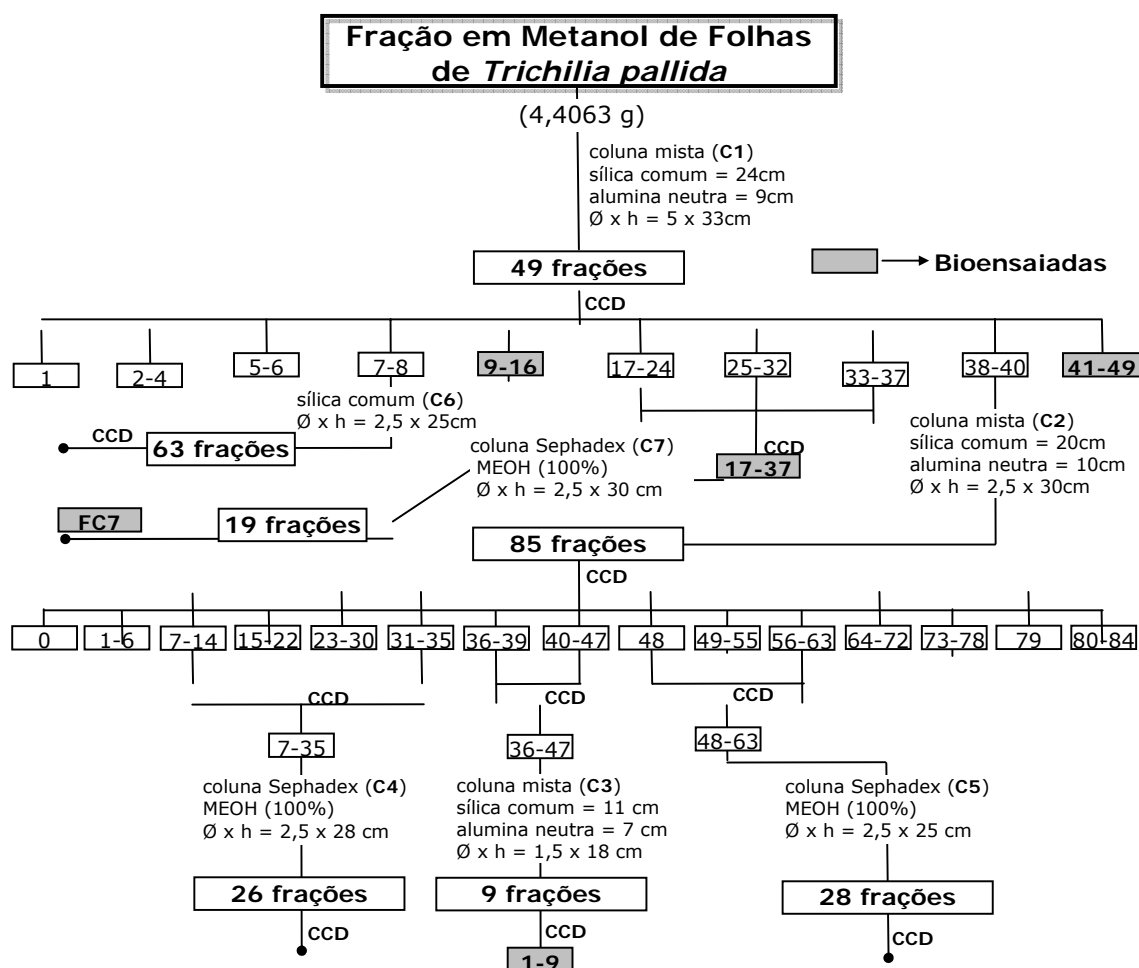


Figura 4 - Esquema do fracionamento cromatográfico, parcial, da fração metanol do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida*

A mortalidade de lagartas foi avaliada diariamente até os 6 DAI, sendo que, para efeito de análise estatística, consideraram-se as variáveis mortalidade acumulada (%) aos 3 e 6 DAI e peso de lagartas (mg) aos 6 DAI. Na comparação de tratamentos empregou-se o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.10.1.1 Atividade de subfrações da fração 17-37 sobre *Tuta absoluta***

Como a subfração 17-37 foi selecionada (item 3.10.1) pelo maior potencial inseticida sobre *T. absoluta*, fez-se o fracionamento cromatográfico da mesma, conforme esquematizado na Figura 4. Obtiveram-se 19 subfrações, as quais foram analisadas por CCD, reunindo-se as de perfil químico semelhante. Em virtude de não se constatarem sólidos e manchas únicas nas placas cromatográficas, bem como pela quantidade ínfima obtida, optou-se por agrupá-las novamente e realizar novo bioensaio. Assim, tais subfrações da fração 17-37, receberam a denominação de FC7 (Figura 4).

O bioensaio foi realizado conforme delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições e como tratamentos as frações agrupadas FC7 a 0,117 % e o controle (acetona).

Após os folíolos de tomateiro serem tratados, por meio de mini-atomizador, com a fração FC7 e acetona (controle), e terem o excesso de umidade eliminado, pela permanência durante aproximadamente 5 min sobre papel filtro, foram infestados com lagartas recém-eclodidas de *T. absoluta*. A fim de manter a turgescência dos folíolos, seus pecíolos foram envolvidos por algodão hidrófilo, o qual foi umedecido diariamente. Em cada folíolo, sendo 3 por repetição, foram infestadas 7 lagartas, totalizando 126 indivíduos por tratamento. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas (6 cm de diâmetro) onde permaneceram até 6 DAI.

A mortalidade de lagartas foi avaliada diariamente até os 6 DAI, sendo que, para efeito de análise estatística, consideraram-se as variáveis mortalidade acumulada (%) aos 3 e 6 DAI e peso de lagartas (mg) aos 6 DAI.

Na comparação de tratamentos empregou-se o teste t ( $P \leq 0,05$ ), sendo as transformações dos dados realizados com base em teste (Hartley) para avaliação de homocedasticidade de variâncias.

### 3.11 Principais etapas para isolamento de substâncias de folhas e de frutos de *Trichilia pallida*

#### 3.11.1 Substâncias do extrato em diclorometano de folhas

Parte do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* (2,4 g) foi aplicada ao topo de uma coluna com empacotamento misto (sílica comum e alumina neutra 70-230 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 3,5 x 50 cm) e eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, finalizando com metanol. Foram coletadas 19 frações de 50 ml cada que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 15 a 17 foram reunidas resultando em 737,9 mg que foram aplicados ao topo de outra coluna, também com empacotamento misto de sílica comum e alumina neutra (70-230 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 2,0 x 35 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 53 frações de 10 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme similaridade cromatográfica. As frações 15 e 23 foram reunidas, resultando em 68,4 mg de um sólido imerso em material oleoso. Este material foi então adicionado ao topo de uma outra coluna empacotada com sílica gel (70-230 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 2,0 x 35 cm) eluída isocraticamente com hexano/acetato de etila 8:2, de onde foram coletadas 33 frações de 10 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas. Da fração 10, foram isolados 19,7 mg da substância 24-metilenocicloart-3 $\beta$ -ol (**TRIT-1**). As frações 25 a 28 foram reunidas resultando em 188,7 mg de um sólido amorfo que foi adicionado ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 2,0 x 35 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 22 frações de 50 ml, as quais foram analisadas por CCD e reunidas. As frações 8 a 14 foram reunidas resultando em 63,1 mg, que foram adicionados ao topo de uma coluna de sílica (230-400 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 2,5 x 15 cm) eluída com gradiente de hexano/diclorometano e acetato de etila. Foram coletadas 13 frações de 10 ml cada e, através da análise por CCD, foi constatada nas frações 8 a 10 a presença de um sólido branco em

forma de agulha, que foi reunido e identificado, por várias técnicas de RMN, como sendo uma substância inédita denominada de 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ ,26-diol (**TRIT-2**). As frações 31 a 46 foram reunidas, resultando em 369,2 mg de um sólido amorfo, o qual foi adicionado ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 3,0 x 25 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Coletaram-se 28 frações de 50 ml, que foram analisadas por CCD e reunidas. As frações 8 a 10 foram reunidas resultando em 183,7 mg e recromatografadas em coluna de sílica tipo *flash* (230-400 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 2,5 x 15 cm) eluída isocraticamente com hexano/diclorometano/acetato de etila (7:2:1). Foram coletadas 13 frações de 10 ml cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas. As frações 7 a 10 foram reunidas resultando em 36,9 mg de um sólido cristalino, em forma de agulhas brancas codificado como **TRIT-3** (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol).

As frações 31 a 46 foram reunidas, resultando em 737,9 mg que foram aplicados ao topo de outra coluna, também com empacotamento misto de sílica comum e alumina neutra (70-230 *mesh*,  $\varnothing$  x h = 2,0 x 35 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 41 frações de 15 ml cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas conforme similaridade cromatográfica. As frações 12-18 foram reunidas e colocadas no topo de uma coluna sílica ( $\varnothing$  x h = 2,0 x 38 cm) eluída com hexano/acetato de etila (8:2). Coletaram-se 11 frações. A fração 5 a 7 (12,3 mg) apresentou-se como sólido que foi recristalizado em metanol e codificado como **EST-1** (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol). As frações 35 a 38 foram reunidas e adicionadas ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (h x  $\varnothing$  = 32 x 1,5 cm) eluída com hexano, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 19 frações. Das frações 8 a 11 obteve-se (10,6 mg) um sólido branco codificado como **EST-2** (24-metileno-colesterol). As frações 3 a 5 foram reunidas e aplicadas em coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x  $\varnothing$  = 36 x 2,0 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 13 frações de 15 ml cada. A fração 4 (hexano/acetato de etila 8:2) apresentou 32,5 mg de um sólido branco,

codificado como **EST-3** (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol).

### 3.11.2 Substância do extrato em diclorometano de frutos

Esta substância, ao contrário das isoladas a partir do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida*, não foi obtida de maneira bio-monitorada, uma vez que não se dispunha de quantidade suficiente. Entretanto, por considerar-se de grande relevância o conhecimento a respeito do efeito da referida substância sobre a traça *T. absoluta*, resolveu-se incluí-la nos bioensaios, juntamente com as demais substâncias isoladas de folhas.

Nesse sentido, de maneira resumida, descrevem-se as principais etapas realizadas no isolamento do limóide gedunina (Figura 5).

O extrato em diclorometano de frutos de *T. pallida* foi inicialmente submetido ao fracionamento cromatográfico por uma coluna de *Sephadex* LH-20 ( $\emptyset$  x h= 3,0 x 65 cm) que foi eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 30 frações de aproximadamente 20 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a similaridade observada, resultando assim em 6 frações.

Da terceira fração (reunião das frações 10 a 12) foram obtidos 135,2 mg de um pó branco amorfo. Então foi recromatografado em coluna *Sephadex* LH-20 ( $\emptyset$  x h= 3,0 x 65 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 15 frações de aproximadamente 20 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a similaridade observada, resultando assim em 4 frações. Da fração 3 (10 a 14) foram obtidos 17,9 mg de um sólido em forma de agulhas codificado como **LIM** (gedunina).

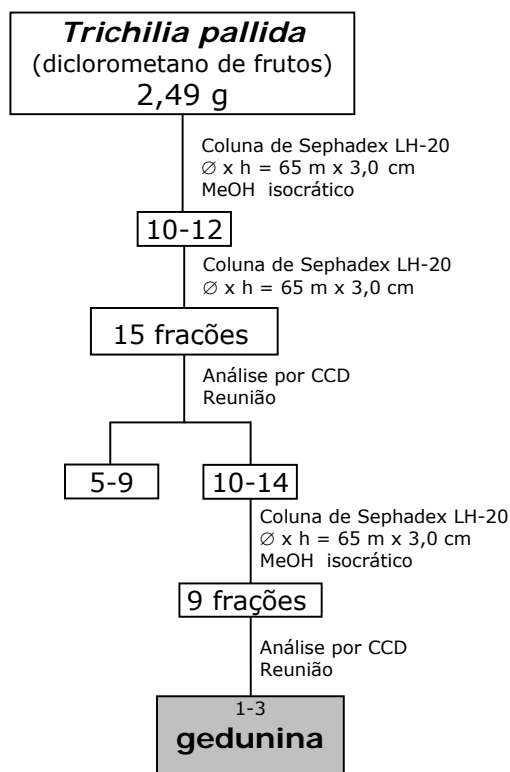


Figura 5 - Esquema de isolamento do limonóide gedunina

### 3.12 Avaliação preliminar da atividade de substâncias isoladas de folhas de *Trichilia pallida* sobre *Tuta absoluta*

A partir do isolamento dos triterpenos cicloartanos, 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) e 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2), de folhas de *T. pallida*, fez-se este bioensaio a fim de ter-se um referencial de concentração/atividade.

Nesse sentido, avaliaram-se as substâncias TRIT-1 e TRIT-2 a 0,04 %, acrescidas de um controle com acetona. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 repetições.

Após o tratamento de folíolos de tomateiro, por meio de mini-



atomizador, com as substâncias acima mencionadas, seus pecíolos foram envolvidos com algodão hidrófilo, umedecido diariamente, a fim de manter a turgescência, sendo que, para a eliminação do excesso de umidade, permaneceram durante cerca de 5 min sobre papel filtro. Em cada folíolo, sendo 4 por repetição, foram liberadas 5 lagartas, totalizando 120 indivíduos por tratamento. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas (6 cm de diâmetro) onde permaneceram até 6 DAI.

Foram consideradas as mortalidades (%) aos 3 e 6 DAI de folíolos com lagartas. Na comparação de tratamentos empregou-se o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.12.1 Efeito de substâncias isoladas de *Trichilia pallida* na biologia de *Tuta absoluta***

Isolaram-se 7 substâncias, sendo 6 oriundas do extrato em diclorometano de folhas e uma do extrato em diclorometano de frutos de *T. pallida*.

As substâncias isoladas foram avaliadas em bioensaio conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições e 9 tratamentos, sendo: sete (7) substâncias a 0,1 % [24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1); 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2); cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol (TRIT-3); 24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol (EST-1); 24-metileno-colesterol (EST-2); 24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol (EST-3) e gedunina (LIM)], acrescidas dos controles acetona e água.

Após o tratamento de folíolos de tomateiro, por meio de mini-atomizador, com as substâncias acima mencionadas, seus pecíolos foram envolvidos com algodão hidrófilo, umedecido diariamente, a fim de manter a turgescência, sendo que, para a eliminação do excesso de umidade, permaneceram durante cerca de 5 min sobre papel filtro. Em cada folíolo, sendo 3 por repetição, foram liberadas 6 lagartas, totalizando 108 indivíduos

por tratamento. Depois de infestados, os folíolos foram transferidos para placas plásticas (6 cm de diâmetro) onde permaneceram até 9 DAI. Decorrido este período, as lagartas remanescentes foram transferidas para folíolos de tomateiro não tratados, porém preparados conforme descrito anteriormente. Avaliaram-se diariamente a mortalidade de lagartas até a formação de pupas. Estas, à medida que formavam-se, eram retiradas dos folíolos e transferidas, individualmente, para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura). Em seguida, fez-se a separação por sexo e avaliou-se o peso (mg) de pupas com 24h de idade. Tais procedimentos foram realizados diariamente até a emergência dos adultos. Após aproximadamente 24h da emergência dos adultos, avaliou-se a ocorrência de possíveis deformações morfológicas, visualizadas a "olho nu", principalmente nas asas.

Consideraram-se os seguintes parâmetros: mortalidade de lagartas (%) aos 5 e 9 DAI, duração (dias) e viabilidade (%) da fase de larva, peso de pupas (mg) machos e fêmeas, duração (dias) e viabilidade (%) da fase de pupa e adultos deformados (%).

Na comparação de tratamentos empregou-se o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ), sendo as transformações dos dados, quando necessárias, realizadas com base em teste (Hartley) para avaliação de homocedasticidade de variâncias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens* com atividade sobre *Tuta absoluta*

Os rendimentos de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *T. pallida* e *T. pallens* apresentaram maior variação de rendimento na comparação entre espécies do que na comparação entre estruturas de uma mesma espécie (Tabela 1). O extrato de folhas de *T. pallens* foi o que deu maior rendimento (12,24 %), sendo cerca de 4 vezes o obtido com folhas de *T. pallida* (2,84 %). Neste sentido, com o objetivo de evitar-se que a atividade inseticida de extratos de plantas seja sub ou superestimada, é importante que seja adotada a concentração com base no que foi realmente extraído, em vez de esta ser considerada com base no peso inicial (p/v) do material submetido à extração.

Tabela 1. Rendimento na obtenção de extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *Trichilia pallida* e *Trichilia pallens*

Espécie	Estrutura	Rendimento <sup>1</sup>	
		g	%
T. pallida	Folhas	1,99	2,84
	Ramos	1,00	1,43
T. pallens	Folhas	8,57	12,24
	Ramos	3,44	4,91

<sup>1</sup>Obtido a partir de 70 g da respectiva estrutura moída.

Constatou-se que o extrato aquoso liofilizado (EAL) de folhas de *T. pallida* (3 %) ocasionou 57,5 % de mortalidade de lagartas de *T. absoluta* aos 5 dias após a infestação (DAI), diferindo significativamente do EAL de ramos (6,7 %) e do controle com água (2,0 %). Aos 10 DAI, novamente o EAL de folhas foi o mais eficiente, sendo responsável por 92,6 % de mortalidade de lagartas, diferindo do EAL de ramos (17,6 %) e do controle (4,3 %) (Tabela 2). Tais resultados conferem com os de Thomazini et al. (2000) e Vendramim & Thomazini (2001), que constataram maior atividade sobre *T. absoluta* do extrato aquoso (não liofilizado) de folhas de *T. pallida* (1 e 5 % - p/v) em relação ao extrato aquoso de ramos. Como estes autores utilizaram método diferente para a aplicação dos extratos aquosos (não liofilizados) em folíolos de tomateiro, pode-se inferir que a maneira como se realiza o tratamento pode influenciar na atividade inseticida dos extratos, porém, sem alterar a ordem de importância das estruturas a partir das quais tais extratos foram obtidos.

Tabela 2. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 5 e 10 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados<sup>1</sup> com extratos aquosos liofilizados (3 %) de folhas e ramos de *Trichilia pallida*

Tratamento	5 DAI	10 DAI
Extrato de Folhas	57,5 ± 6,72 a	92,6 ± 6,12 a
Extrato de Ramos	6,7 ± 2,91 b	16,3 ± 6,04 b
Controle (água)	2,0 ± 1,50 b	4,3 ± 1,61 b

<sup>1</sup>Aos 5 DAI as lagartas foram transferidas para folíolos não tratados.

Médias (± EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ .

Thomazini et al. (2000) comprovaram que o extrato de folhas de *T. pallida* a 5 % (p/v) ocasionou 80,56 % de mortalidade ao final da fase de larva de *T. absoluta*, sendo os folíolos substituídos por outros tratados a cada 3 dias. Portanto, houve diferença de atividade inseticida em função da maneira como os extratos foram preparados (não liofilizados ou liofilizados) e aplicados (imersão ou atomização), pois a mortalidade observada (Tabela 2) com o EAL de folhas numa menor concentração (3 %) e até 10 DAI foi de 92,6 %. Além do mais, as lagartas se alimentaram de folíolos com o EAL de folhas durante apenas 5 dias, pois no 5º DAI os novos folíolos oferecidos não tinham sido tratados.

Na comparação entre o EAL a 3 % de folhas e de ramos de *T. pallens*, constatou-se que a mortalidade de larvas foi maior com o EAL de folhas a qual diferiu de forma significativa dos valores obtidos com o EAL de ramos e do controle com água tanto aos 5 como aos 10 DAI (Tabela 3). Neste sentido, o EAL de folhas, em relação ao EAL de ramos, é o que apresenta maior atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta*, independente se obtido de *T. pallida* ou de *T. pallens*. Entretanto, observou-se que a mortalidade de lagartas ocorrida aos 10 DAI (47,6 %) com EAL de folhas de *T. pallens* (Tabela 3) foi 48,6 % inferior à verificada com o EAL de folhas de *T. pallida* (92,6 %) (Tabela 2), sendo que os incrementos de mortalidades de lagartas ocorridos do 5º para o 10º DAI, para os EAL de folhas de *T. pallida* e de *T. pallens* foram de 61 e 17,2 % respectivamente.

Apesar do efeito inseticida do EAL de folhas de *T. pallens* não ser tão expressivo como o que ocorre com *T. pallida*, há de se ressaltar o provável efeito agudo ou de "choque" sobre as lagartas, enquanto que o EAL de folhas de *T. pallida* parece apresentar um efeito crônico, haja vista o grande incremento de mortalidade do 5º para o 10º DAI. Wheeler & Isman (2001), avaliando o efeito crônico do extrato bruto de *Trichilia americana* sobre lagartas de *Spodoptera litura*, inferiram que a ação provável seria no trato intestinal, interferindo, conseqüentemente, no processo digestivo do inseto. Entretanto, estes autores após transferirem lagartas que estavam se

alimentando em dieta contendo o referido extrato, para dieta controle (sem extrato), observaram que as lagartas desenvolveram-se normalmente, com índices nutricionais comparáveis àquelas alimentadas somente na dieta controle. Embora não tenham conseguido elucidar o modo de ação, os autores sugeriram que pode ocorrer, pelo menos parcialmente, uma ação crônica do extrato de *T. americana* sobre lagartas de *S. litura*.

Tabela 3. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 5 e 10 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados<sup>1</sup> com extratos aquosos liofilizados (3 %) de folhas e ramos de *Trichillia pallens*

Tratamento	5 DAI	10 DAI
Extrato de Folhas	40,6 ± 9,49 a	47,6 ± 10,04 a
Extrato de Ramos	7,0 ± 3,35 b	13,2 ± 5,10 b
Controle (água)	2,0 ± 1,50 b	4,3 ± 1,61 b

<sup>1</sup>Aos 5 DAI as lagartas foram transferidas para folíolos não tratados.

Médias (± EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ .

Ao contrário do observado com *T. absoluta*, em que o EAL de folhas de *T. pallida* superou o de *T. pallens*, Bogorni & Vendramim (2003) observaram que extratos aquosos de folhas de *T. pallens* (5 % - p/v) ocasionaram 100 % de mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* até o 5º dia, superando significativamente os extratos de folhas e de ramos de *T. pallida*. O efeito do extrato de folhas de *T. pallens* sobre *S. frugiperda* foi comparável ao obtido com *Azadirachta indica*, espécie com atividade inseticida amplamente comprovada (Martinez, 2002; Schmutterer, 1988). Neste sentido, dado ao excelente resultado do extrato aquoso de *T. pallens* sobre *S. frugiperda*, pode ocorrer um efeito mais pronunciado também sobre

*T. absoluta*, porém, utilizando-se como extratores solventes menos polares.

#### **4.2 Estimativa da CL<sub>50</sub> de extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* para lagartas de *Tuta absoluta***

A CL<sub>50</sub> estimada para lagartas de *T. absoluta* alimentadas durante 6 dias em folíolos de tomateiro tratados com o extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* foi de 4,9 % (Tabela 4).

O fato de a CL<sub>50</sub> ser relativamente alta provavelmente tenha se devido à baixa concentração do extrato empregada, já que os folíolos foram tratados apenas uma vez com baixo volume do extrato, o qual foi aplicado através de um mini-atomizador que propiciava gotas uniformes e de diâmetro reduzido. Como o extrato foi ressuspensionado apenas em acetona, ficaria inviável usar a técnica de imersão, principalmente em função do dano que seria ocasionado pelo solvente aos folíolos. Gonçalves-Gervásio (2003) realizou a imersão de folíolos de tomateiro, por dois segundos, em extratos não aquosos de *T. pallida* ressuspensionados em acetona (5 ml) e água (95 ml). Entretanto, a autora realizava a substituição dos folíolos a cada dois dias por outros igualmente tratados. Esta técnica, embora tenha sido utilizada por diversos autores (Bogorni, 2003; Brunherotto & Vendramim, 2001; Roel et al., 2000a e b; Roel & Vendramim, 1999; Thomazini et al., 2000; Torrecillas & Vendramim, 2001; Torres et al., 2001; Vendramim & Scampini, 1997; Vendramim & Thomazini, 2001), principalmente visando à seleção de extratos de plantas com atividade inseticida, pode não ser viável quando se busca o isolamento de substâncias de plantas, em razão, principalmente da grande quantidade de extrato exigida para a realização dos bioensaios. Em se tratando de substâncias puras, em que a quantidade disponível é da ordem de miligramas, o grau de dificuldade na realização de bioensaios é ainda maior.

Tabela 4. Estimativa da CL<sub>50</sub> (%) de extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* para lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação

CL <sub>50</sub> ; (IC <sub>0,10</sub> )	n <sup>1</sup>	gl <sup>2</sup>	χ <sup>2</sup>
4,9; (4,0 - 6,4)	140,4	2	3,58 n.s.

<sup>1</sup>número médio de insetos/concentração;

<sup>2</sup>graus de liberdade;

n.s.= não significativo ( $P \geq 0,05$ ).

Na avaliação do efeito do extrato em diclorometano sobre o peso de lagartas de *T. absoluta*, constatou-se, através de análise de regressão linear, uma redução significativa desta variável à medida em que a concentração do extrato foi aumentada (Figura 6).

Através da equação linear gerada a partir da associação entre o peso de lagartas (P) e a concentração do extrato (C), foi possível estimar que este a 4,9 % (CL<sub>50</sub>) foi capaz de reduzir em cerca de 61,3 % o peso das lagartas sobreviventes em relação ao controle com acetona. Isto sugere o efeito fagodeterrente do extrato, demonstrando, portanto, conforme Vendramim (1997), que, em se tratando de plantas inseticidas, outros parâmetros, além da mortalidade, devem ser avaliados.



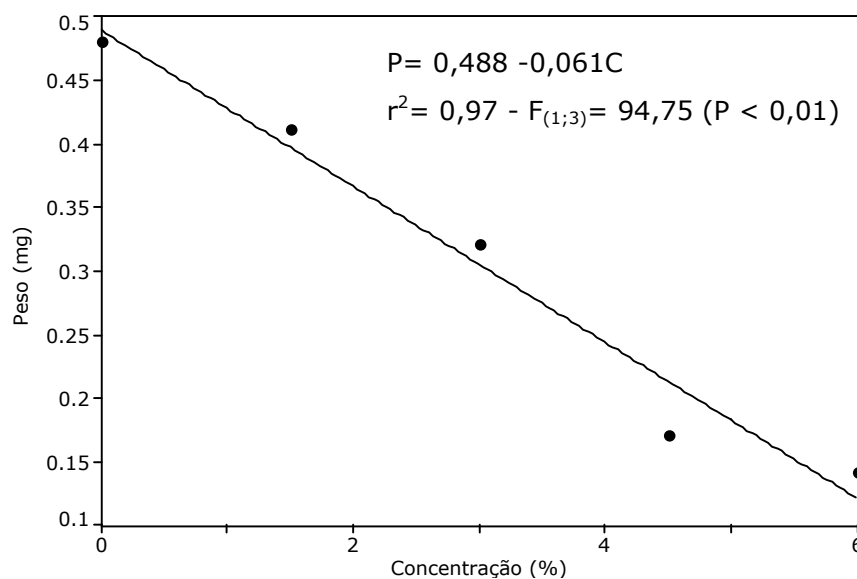


Figura 6 - Relação entre concentração de extrato (C) em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* e o peso de lagartas (P) de *Tuta absoluta* aos 6 dias após infestação

### 4.3 Seleção de extratos não aquosos com atividade sobre *Tuta absoluta*

#### 4.3.1 Extratos de folhas de *Trichilia pallida*

O rendimento do extrato em hexano de folhas de *T. pallida* foi de 4 %, superando o extrato em metanol e o em diclorometano com 3,13 e 1,67 % respectivamente (Tabela 5).

A mortalidade de lagartas de *T. absoluta* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos aos 3 DAI. Entretanto, aos 6 DAI os extratos em hexano, diclorometano e metanol, embora não tenham diferido entre si, superaram significativamente os controles água e acetona (Tabela 6). No entanto, mesmo não tendo ocorrido diferença significativa entre os extratos em relação à mortalidade, observou-se que o peso de lagartas alimentadas em folíolos tratados com o extrato em diclorometano foi

significativamente menor que o peso de lagartas expostas ao extrato em hexano e aos controles água e acetona (Figura 7).

Tabela 5. Rendimento na obtenção de extratos, através do processo de maceração até exaustão, em hexano, diclorometano e metanol de folhas de *Trichilia pallida*

Extrato	Rendimento <sup>1</sup>	
	g	%
Hexano	34,75	4,00
Diclorometano	14,50	1,67
Metanol	27,12	3,13

<sup>1</sup>Obtido a partir de 867 g de folhas moídas.

Tabela 6. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de *Trichilia pallida*

Tratamento	3 DAI	6 DAI
Hexano	1,6 ± 4,57 a	11,5 ± 4,79 a
Diclorometano	1,5 ± 4,58 a	17,1 ± 4,90 a
Metanol	1,8 ± 1,03 a	9,4 ± 3,12 a
Controle - acetona	0,2 ± 0,70 a	0,7 ± 1,38 b
Controle - água	0,0 ± 0,00 a	0,4 ± 0,70 b

Médias (± EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\log(x + 0,5)$  (3DAI) e  $\sqrt{x + 0,5}$  (6DAI).

Nesse sentido, o extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* foi considerado o mais promissor como fonte de substância(s) com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro. Este resultado equivale ao constatado por Gonçalves-Gervásio (2003), que identificou o extrato em clorofórmio (5 % - p/v) de folhas de *T. pallida* como o mais eficiente, pois ocasionou 73,8 % de mortalidade de lagartas de *T. absoluta*, superando significativamente o extrato aquoso (46,9) e o hexânico (26,4 %).

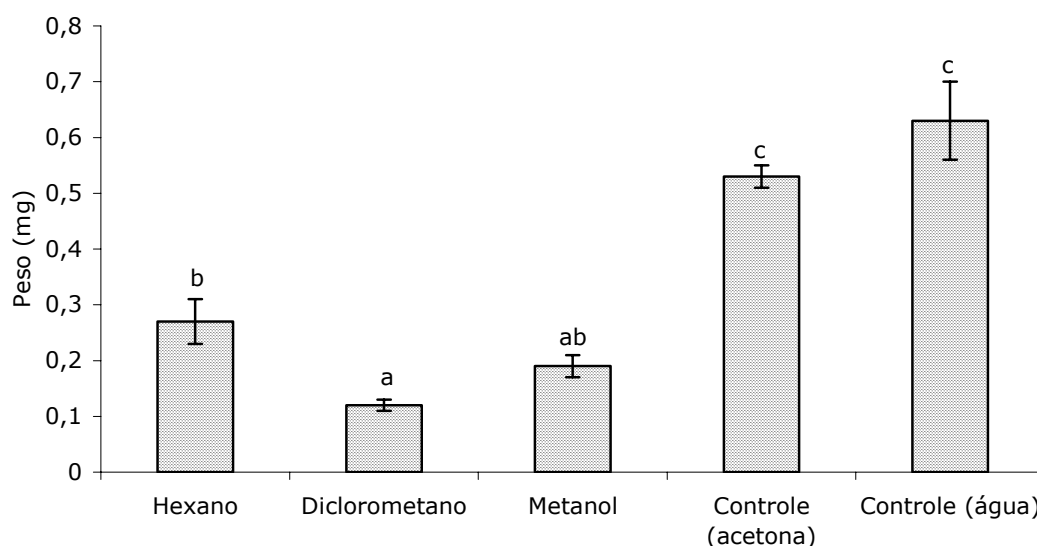


Figura 7 - Peso de lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de *Trichilia pallida*. Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

#### 4.3.2 Extratos de *Trichilia pallens*

Os rendimentos dos extratos de *T. pallens* foram superiores aos obtidos com *T. pallida* (Tabela 5), chegando, no caso do extrato em

diclorometano, a 6,78 % (Tabela 7). Entretanto, tais diferenças de rendimento, apenas numéricas, não significam que haverá maior facilidade de obtenção de substância com atividade inseticida nessa espécie de planta, uma vez que compostos sem esta característica também podem ter sido extraídos.

Tabela 7. Rendimento na obtenção de extratos, através do processo de maceração até exaustão, em hexano, diclorometano e metanol de folhas de *Trichilia pallens*

Extrato	Rendimento <sup>1</sup>	
	g	%
Hexano	7,96	5,31
Diclorometano	10,17	6,78
Metanol	5,10	3,40

<sup>1</sup>Obtido a partir de 150 g de folhas moídas.

A mortalidade de lagartas de *T. absoluta* alimentadas em folíolos tratados com o extrato em diclorometano (1 %) de folhas de *T. pallens*, foi a única que diferiu significativamente dos controles com água e acetona aos 3 DAI (Tabela 8). Já, aos 6 DAI, todos os extratos ocasionaram mortalidades de lagartas significativamente superiores aos controles, embora não tenham diferido entre si (Tabela 8).

Os extratos em hexano, diclorometano e metanol reduziram de maneira significativa os pesos de lagartas aos 6 DAI em relação aos controles água e acetona, sem haver, no entanto, diferença significativa entre os referidos extratos (Figura 8).

De maneira similar ao observado com *T. pallida*, o extrato em diclorometano de folhas de *T. pallens* apresentou-se mais promissor como fonte de substâncias com atividade sobre a traça-do-tomateiro que os

extratos em hexano e em metanol. Tal resultado concorda com o obtido por Gonçalves-Gervásio (2003), que identificou o extrato em clorofórmio (equivalente ao diclorometano) de folhas de *T. pallida* como mais eficiente sobre *T. absoluta*.

Tabela 8. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de *Trichilia pallens*

Tratamento	3 DAI	6 DAI
Hexano	1,9 ± 4,34 abc	12,3 ± 3,27 a
Diclorometano	4,4 ± 1,78 a	15,2 ± 2,97 a
Metanol	2,6 ± 4,90 ab	12,4 ± 4,87 a
Controle – acetona	0,2 ± 0,70 bc	0,7 ± 1,38 b
Controle – água	0,0 ± 0,00 c	0,4 ± 0,70 b

Médias (± EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\log(x + 0,5)$  (3DAI) e  $\sqrt{x + 0,5}$  (6DAI).

Outros autores também têm avaliado extratos de plantas obtidos a partir de solventes de diferentes polaridades, sobre diversas espécies de insetos. McMillian et al. (1969), avaliando os extratos em água, hexano, metanol e em clorofórmio de *Melia azedarach* sobre *S. frugiperda*, observaram que o extrato em clorofórmio foi o que apresentou maior atividade inseticida.

Nesta mesma linha, Jaglan et al. (1997) testaram extratos não aquosos de sementes e de folhas de nim (*A. indica*) sobre *Helicoverpa armigera*. Estes autores observaram que os extratos em clorofórmio: metanol (9:1) de sementes e de folhas de nim tiveram maior atividade

inseticida que os extratos destas mesmas partes de planta obtidos apenas em metanol. Ademais, o extrato em clorofórmio:metanol (9:1) de sementes de nim também ocasionou efeitos morfogenéticos adversos sobre vários parâmetros biológicos de *H. armigera*. Os autores atribuíram a menor atividade inseticida do extrato em metanol a sua alta polaridade. Desta forma, uma maior quantidade de substâncias inativas, como açúcares e taninos, teriam sido extraídas, e portanto, causado uma diluição das substâncias ativas no extrato. Por outro lado, o extrato clorofórmio:metanol (9:1), tendo como principal solvente o clorofórmio, de menor polaridade, teria impedido a extração de tais substâncias inativas, e em razão de sua polaridade teria extraído uma maior quantidade de substâncias ativas.

Ramírez et al. (2000) realizaram extrações com diclorometano da madeira de *Trichilia trifolia* e observaram que o extrato obtido ocasionou significativo efeito deterrente alimentar no gorgulho-do-arroz *Sitophilus oryzae*. Além disso, fracionamentos do referido extrato e biomonitoramento levaram ao isolamento de 3 diterpenos.

Souza (2004) testou extratos em hexano, clorofórmio, metanol e etanol de ramos de *T. pallida* sobre ninfas da mosca-branca *B. tabaci* biótipo B, sendo que o extrato em clorofórmio a 5 % (p/v) foi considerado o mais ativo sobre o inseto. Observa-se, todavia, que extratos em clorofórmio ou diclorometano são capazes de apresentar resultados muito promissores, sobre diversas espécies de insetos, mesmo sendo obtidos de estruturas e de espécies de plantas inseticidas distintas.

Embora se tenha constatado diferenças de atividade sobre a traça-do-tomateiro *T. absoluta* entre os extratos aquosos liofilizados de folhas e ramos de *T. pallida* e *T. pallens*, observou-se que os extratos em diclorometano de folhas dessas meliáceas apresentaram atividades inseticidas bastante similares sobre lagartas da traça.

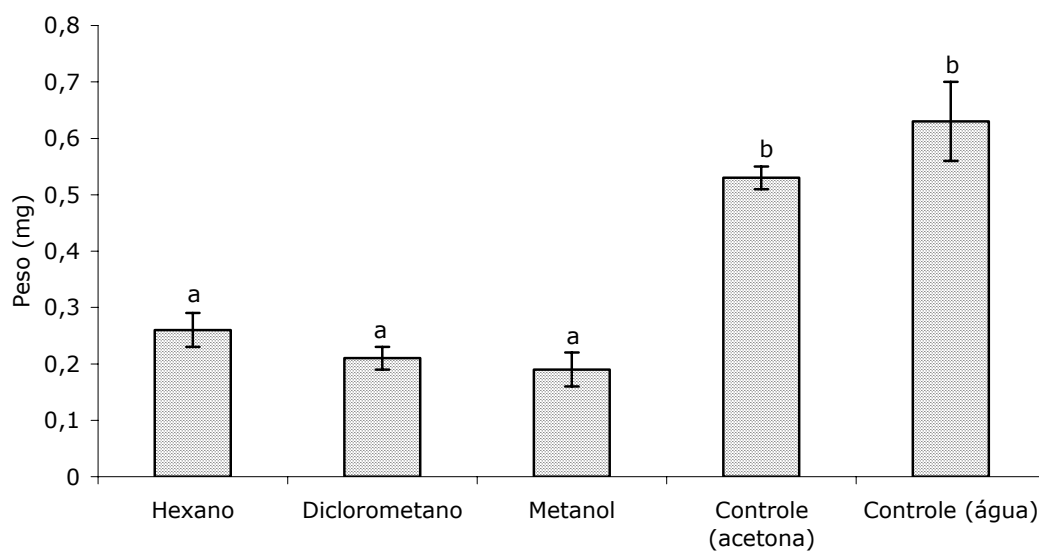


Figura 8 - Peso de lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com extratos não aquosos (1 %) de folhas de *Trichilia pallens*. Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

#### 4.4 Seleção de frações do extrato em diclorometano com maior atividade sobre *Tuta absoluta*

##### 4.4.1 Frações do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*

Os rendimentos das frações obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* variaram de 0,79 a 69,87 % para as frações em n-butanol e em metanol respectivamente. Para as demais frações a variação foi de 2,38 a 15,68 % (Tabela 9).

Tabela 9. Rendimento na obtenção de frações, após partição líquido-líquido, do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*

Fração	Rendimento <sup>1</sup>	
	g	%
Hexano	0,99	15,68
Metanol	4,41	69,87
Acetato de etila	0,15	2,38
n butanol	0,05	0,79
Aquosa	0,63	9,98

<sup>1</sup>Obtido a partir de 6,312 g do extrato em diclorometano.

Aos 3 DAI observou-se que apenas a mortalidade de lagartas de *T. absoluta* alimentadas em folíolos tratados com a fração acetato de etila (13,2 %) a 0,15 % de concentração superou significativamente o controle com água (3,3 %). Nas demais frações, com exceção da aquosa, que foi menos eficiente (2,6 %) que a acetato de etila, constataram-se valores intermediários não diferentes dos extremos (Tabela 10). No entanto, aos 6 DAI, a mortalidade de lagartas ocasionada pela fração acetato de etila (20,9 %) superou de maneira significativa ambos os controles (7,4 e 7,5 %) e as demais frações cujos valores variaram de 5,4 a 11,8 % (Tabela 10).

Os resultados positivos verificados com a fração acetato de etila, de certa maneira concordam com os obtidos por outros autores. Roel et al. (2000a) avaliaram a atividade dos extratos em hexano, acetato de etila, acetona e metanol de folhas e ramos de *T. pallida* sobre *S. frugiperda*. Os extratos em hexano e em acetato de etila resultaram da partição do extrato bruto em acetona. Em relação à atividade inseticida, os autores registraram que o extrato acetato de etila superou o em hexano, tanto a 0,008 quanto a 0,04 % independentemente se obtido de folhas ou de ramos de *T. pallida*. Comparando os 4 extratos, o em acetona também se destacou pela atividade inseticida. Mortalidade total de lagartas de *S. frugiperda* foi



ocasionada pelo extrato em acetato de etila de folhas e ramos de *T. pallida* a 0,05 %, sendo a sobrevivência e o desenvolvimento afetados já a partir da concentração de 0,006 %. Alongamento da fase de larva e diminuição do peso de lagartas e de pupas foram verificados com o extrato a 0,001 % (Roel et al., 2000b; Roel & Vendramim, 1999). Simmonds et al. (2001) constataram que o extrato bruto em acetona (100 ppm) de *T. pallida* tem atividade fagodeterrente sobre lagartas de *Spodoptera littoralis*. Entretanto, a atividade sobre o inseto dos tetranortriterpenóides isolados foi menor que a observada com o referido extrato bruto. Abdelgaleil & Nakatani (2003) também observaram atividade deterrente à alimentação em lagartas de *S. littoralis*, porém de extratos em éter e acetona da casca do tronco da Meliaceae *Khaya senegalensis*.

Pesquisas realizadas com o extrato bruto em acetato de etila obtido a partir de diferentes estruturas e de espécies de plantas, de maneira geral, têm mostrado boa atividade desse extrato sobre diversas espécies de insetos. Tal atividade possivelmente esteja relacionada à polaridade intermediária desse solvente, o que lhe proporciona maior espectro de afinidade polar. Além disso, segundo Ferri (1996), considerações sobre a permeabilidade em membranas e metabolismo indicam que o balanceamento entre a hidrofiliabilidade e a lipofiliabilidade é importante para as substâncias apresentarem afinidade por receptores biológicos, e que extratos extremamente polares (aquosos) ou extremamente apolares (hexânico ou em éter de petróleo) apresentam menor atividade comparados a extratos de polaridade intermediária, como o etanólico, metanólico, clorofórmico ou hidroalcoólicos.

Nesse sentido, é importante destacar o grande potencial da fração em acetato de etila de folhas de *T. pallida* em apresentar substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro *T. absoluta*. Todavia, a fim de viabilizar a realização de fracionamentos cromatográficos e de ensaios para biomonitoramento, é necessária a obtenção de um grande volume do extrato em diclorometano, em razão do baixo rendimento (2,38 %) na

obtenção da fração acetato de etila (Tabela 9).

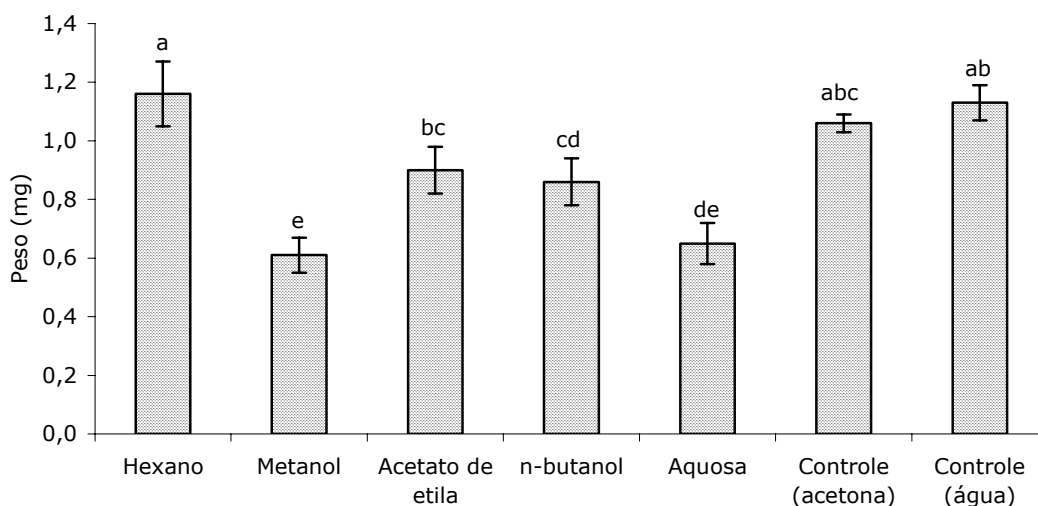
Tabela 10. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,15 %) do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*

Tratamento	3 DAI	6 DAI
Hexano	5,8 ± 2,19 ab	5,8 ± 2,19 b
Metanol	7,7 ± 1,64 ab	11,8 ± 2,20 b
Acetato de etila	13,2 ± 4,85 a	20,9 ± 5,37 a
n-butanol	7,4 ± 3,37 ab	10,3 ± 3,25 b
Aquosa	2,6 ± 1,86 b	5,4 ± 2,84 b
Controle – acetona	5,2 ± 2,01 ab	7,5 ± 1,17 b
Controle – água	3,3 ± 1,04 b	7,4 ± 1,67 b

Médias (± EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

Apesar de a fração acetato de etila ter apresentado boa atividade inseticida sobre a traça *T. absoluta* aos 3 e 6 DAI, não se constatou diferença significativa entre o peso de lagartas alimentadas em folíolos tratados com a referida fração em relação aos controles água e acetona (Figura 9). No entanto, a fração em metanol ocasionou redução significativa do peso de lagartas alimentadas até 6 DAI em relação às frações em hexano, acetato de etila, n-butanol e ambos os controles (Figura 9). Em função deste resultado, constatou-se ser a fração em metanol, juntamente com a em acetato de etila, altamente promissoras como fontes de substâncias inseticidas para *T. absoluta*. Além do mais, a fração em metanol apresentou alto rendimento (69,87 %) (Tabela 9) permitindo a execução

das demais etapas de fracionamentos cromatográficos, bem como dos bioensaios para monitoramento da atividade sobre o inseto.



**Figura 9** - Peso de lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,15 %) do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*. Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

#### 4.4.1.1 Atividade de subfrações da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida* sobre *Tuta absoluta*

Dentre as subfrações F17-37, F1-9, F41-49 e F9-16 obtidas a partir da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* (Figura 4), a F17-37, a 0,3 %, foi a única que ocasionou mortalidade de lagartas significativamente superior ao controle (acetona) e às demais subfrações, tanto aos 3 quanto aos 6 DAI (Figura 10).

No entanto, exceto para a F41-49, as subfrações F17-37, F1-9 e F9-16 não ocasionaram redução significativa no peso de lagartas de *T. absoluta* aos 6 DAI em relação ao controle (Figura 11).

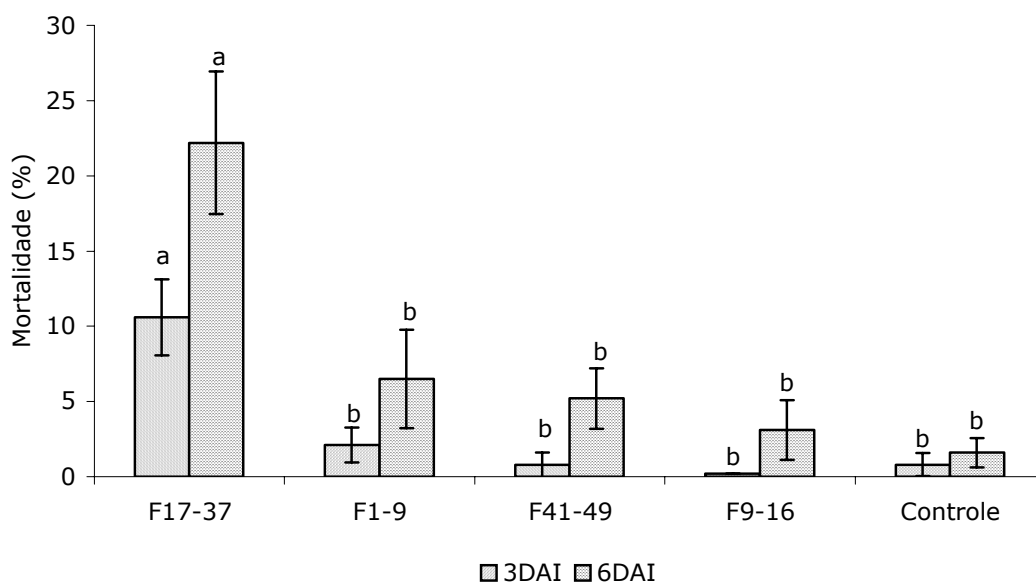


Figura 10 - Mortalidade de lagartas de *Tuta absoluta* aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com subfrações (0,3 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*. Médias ( $\pm$  EP), para cada época de avaliação, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

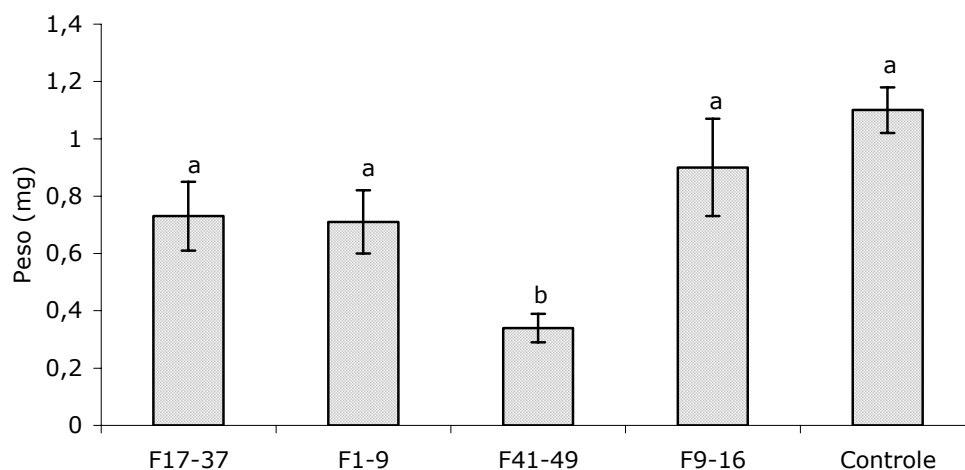


Figura 11 - Peso de lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com subfrações (0,3 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*. Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

#### 4.4.1.1.1 Atividade de subfrações da F17-37 sobre *Tuta absoluta*

Embora tenha ocorrido efeito significativo da subfração F17-37, a 0,3 %, na mortalidade de lagartas aos 3 e 6 DAI (Figura 10), o mesmo não foi verificado à medida em que esta foi fracionada, haja vista que a subfração resultante (FC7 a 0,117 %) não ocasionou mortalidade de lagartas de *T. absoluta* significativamente superior ao controle aos 3 e 6 DAI (Figura 12) e tampouco redução de peso de lagartas aos 6 DAI (Figura 13).

Tem sido constatado que a atividade inseticida ou fagodeterrente de determinado extrato ou fração nem sempre é incrementada à medida em que novos fracionamentos cromatográficos são realizados (Simmonds et al., 2001), embora este seja o comportamento, via de regra, esperado. Também há de se considerar que a subfração FC7 (0,117 %) foi testada a uma concentração 61 % inferior à da fração original F17-37 (0,3 %), o que deve

ter contribuído sobremaneira para a ocorrência de tal resultado. Além disso, a atividade inseticida da fração F17-37 poderia estar relacionada à ocorrência de interações aditivas ou sinérgicas entre os compostos, passíveis de serem desfeitas em virtude do fracionamento cromatográfico.

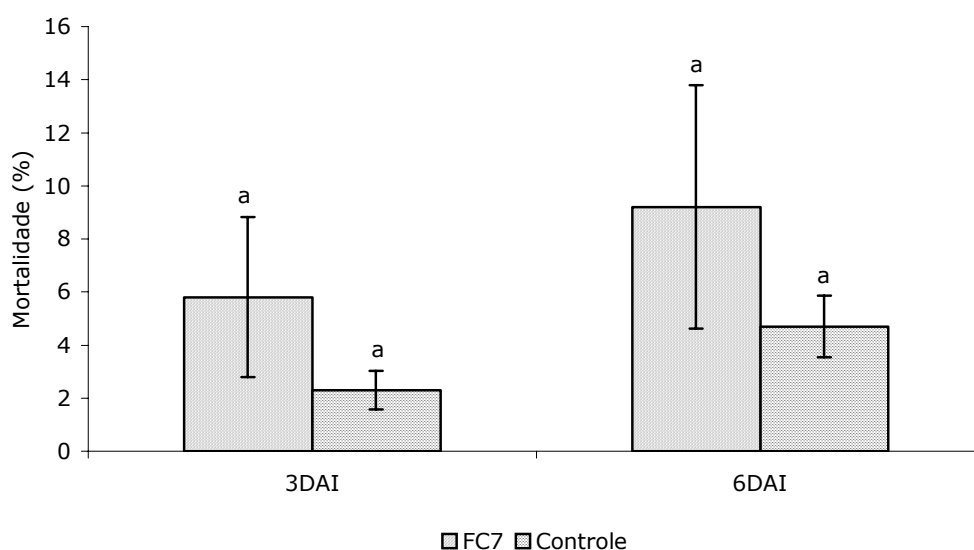


Figura 12 - Mortalidade de lagartas de *Tuta absoluta* aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com subfração (0,117 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*. Médias ( $\pm$  EP), para cada época de avaliação, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$

Simmonds et al. (2001), em pesquisa visando descrever o isolamento, elucidar a estrutura de 3 tetranortriterpenóides de *T. pallida* e dos compostos hirtina e desacetilhirtina, bem como avaliar a atividade destes em bioensaios com chance de escolha, relataram que o extrato bruto

em acetona de *T. pallida* a 100 ppm apresentou grande atividade fagodeterrente em lagartas de *S. littoralis*. No entanto, à semelhança do observado com a subfração FC7, os autores relataram que a atividade fagodeterrente dos tetranortriterpenóides, quando avaliados individualmente, foi inferior à observada com o extrato em acetona que lhes deu origem. Tal resultado foi atribuído à ocorrência de possíveis interações aditivas ou sinérgicas entre os compostos presentes no referido extrato.

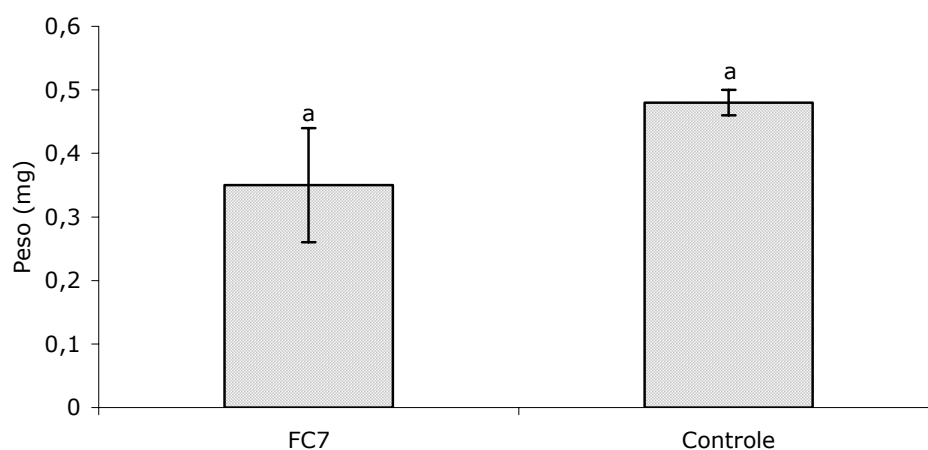


Figura 13 - Peso de lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com subfração (0,117 %) da fração em metanol do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*. Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste t ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$

#### 4.4.1.2 Substâncias isoladas a partir da fração em diclorometano de folhas e de frutos de *Trichilia pallida*

A partir do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* foram isoladas 6 substâncias, sendo 3 triterpenóides (TRIT) e 3 esteróides (EST) (Figura 14). A outra substância, identificada como sendo o limonóide (LIM) gedunina, foi obtida do extrato em diclorometano de frutos da referida espécie (Figura 15).

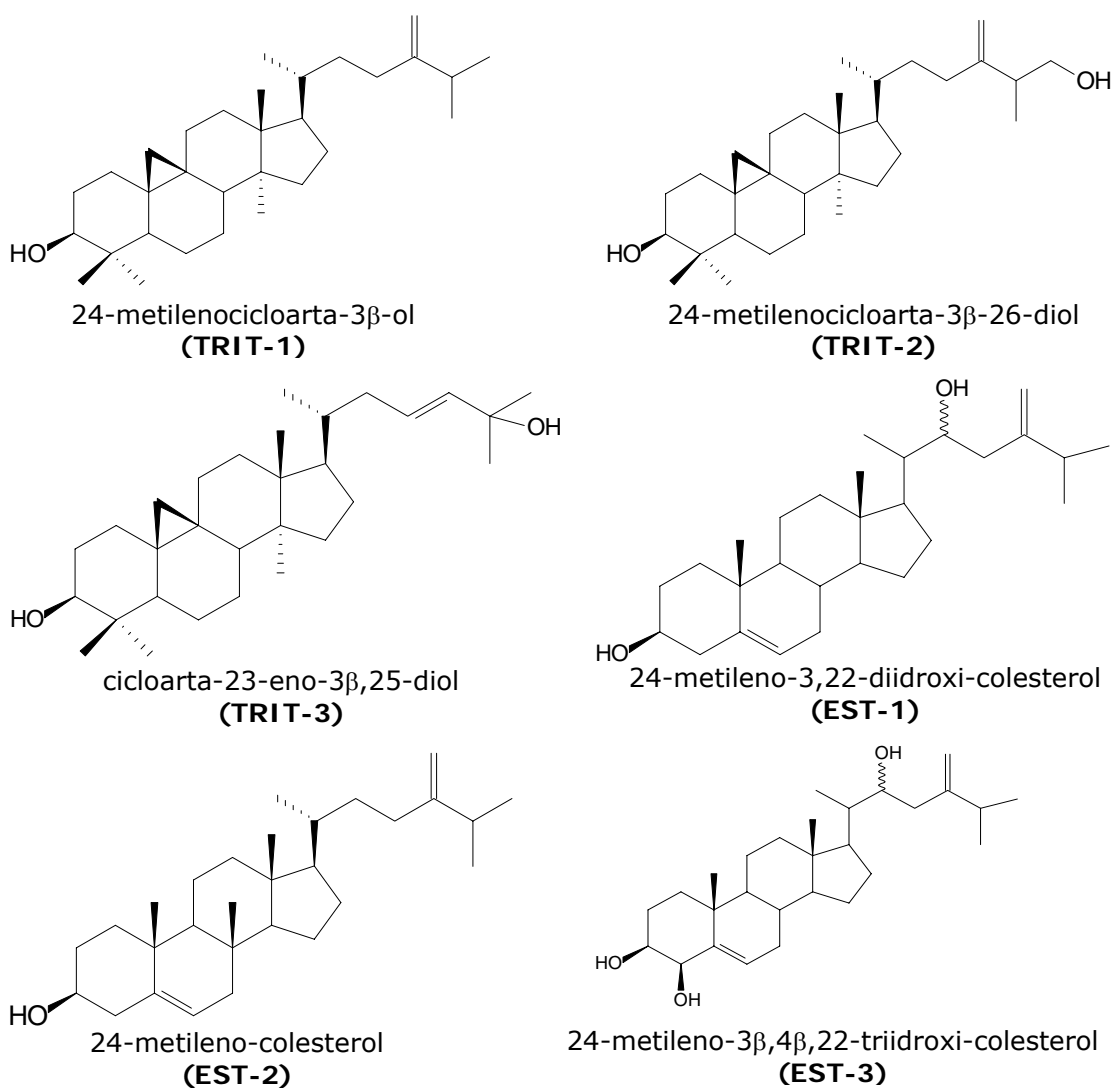


Figura 14 - Substâncias isoladas a partir da fração em diclorometano de folhas de *Trichilia pallida*



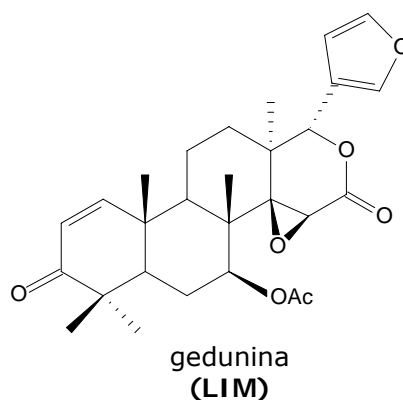


Figura 15 - Substância isolada a partir da fração em diclorometano de frutos de *Trichilia pallida*

#### 4.4.1.2.1 Avaliação preliminar da atividade de substâncias isoladas de folhas de *Trichilia pallida* sobre *Tuta absoluta*

Os triterpenóides 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) e 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2) avaliados a 0,04 % não ocasionaram mortalidade significativa de lagartas de *T. absoluta*, aos 3 e 6 DAI, em relação ao controle (Figura 16). Nesse sentido, para a avaliação da atividade destas substâncias, bem como das demais, considerou-se a concentração de 0,1 %, 2,5 vezes superior à testada preliminarmente (0,04 %).

Com o aumento da concentração para 0,1 %, os triterpenos TRIT-1 e TRIT-2 ocasionaram respectivamente, aos 5 DAI, um incremento de mortalidade de 4,8 e 3,3 vezes em relação ao observado preliminarmente (Figura 17), o que sugere que a mortalidade seja dependente da concentração. Neste sentido, espera-se que tais substâncias em maiores concentrações tenham efeito inseticida ou fagodeterrente mais pronunciado sobre *T. absoluta*.

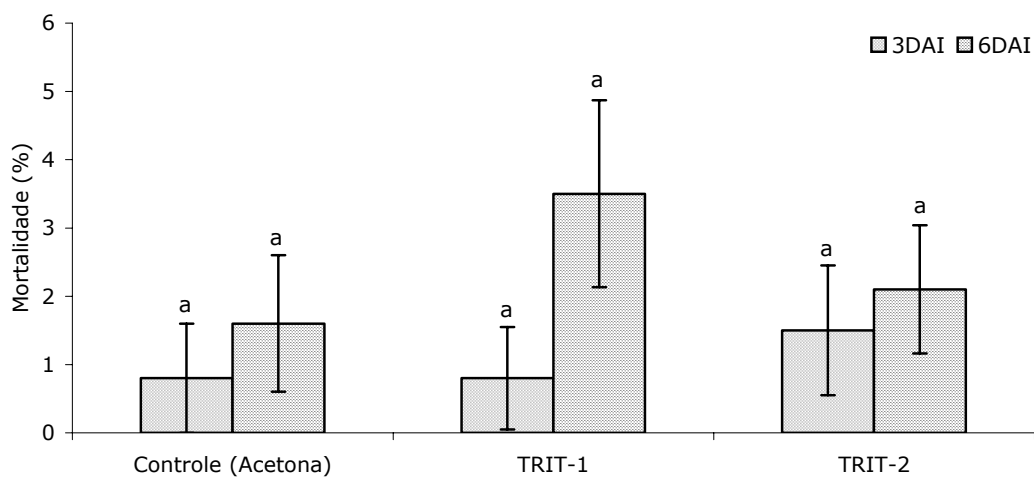


Figura 16 - Mortalidade de lagartas de *T. absoluta* aos 3 e 6 dias após infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com 24-metilenocicloarta-3β-ol (TRIT-1) e 24-metilenocicloarta-3β-26-diol (TRIT-2) a 0,04 %, isolados de folhas de *Trichilia pallida*. Médias seguidas por letras distintas, para cada época de avaliação, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

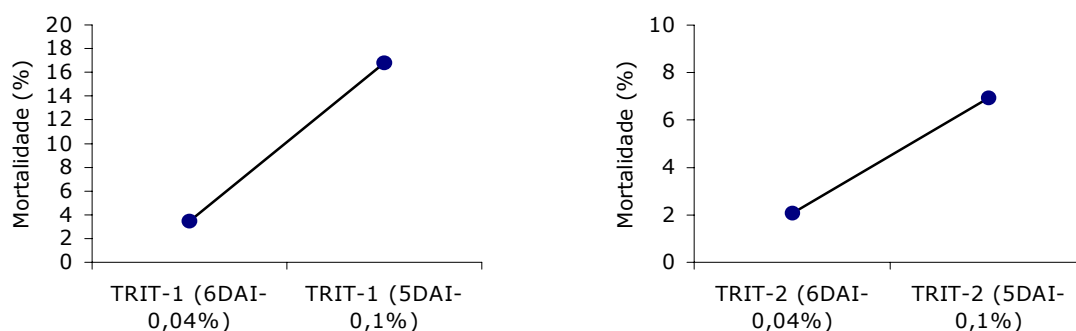


Figura 17 - Mortalidade de lagartas de *T. absoluta* aos 6 e 5 dias após infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com 24-metilenocicloarta-3β-ol (TRIT-1) e 24-metilenocicloarta-3β-26-diol (TRIT-2) ambos a 0,04 e 0,1 %, isolados de folhas de *Trichilia pallida*

#### 4.4.1.2.2 Efeito de substâncias isoladas de *Trichilia pallida* na biologia de *Tuta absoluta*

As mortalidades de lagartas de *T. absoluta* observadas aos 5 DAI com as substâncias (a 0,1 %) 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) e gedunina (LIM) (16,8 e 15,4 % respectivamente) superaram de forma significativa aquelas registradas com as substâncias 24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol (EST-1); 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol (TRIT-2); 24-metileno-colesterol (EST-2); 24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol (EST-3); cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol (TRIT-3) nas quais as mortalidades variaram de 3,9 a 9,3 % e os controles água (2,0 %) e acetona (4,6 %) (Tabela 11). O esteróide EST-1, embora não tenha ocasionado mortalidade significativamente superior aos controles, foi a única substância, aos 5 DAI, que não diferiu do triterpenóide TRIT-1 e do limonóide LIM.

Aos 9 DAI, à semelhança do observado aos 5 DAI, se constatou que apenas as substâncias LIM (20,9 %) e TRIT-1 (19,6 %) diferiram de maneira significativa dos controles acetona (7,2 %) e água (3,9 %), sendo que a EST-1, além de não diferir da TRIT-1 e LIM, também ocasionou mortalidade de lagartas superior à do controle água (Tabela 11). Além disso, do 5º para o 9º DAI, observou-se um incremento de mortalidade de lagartas de 77,4 % para a EST-1, enquanto que para a TRIT-1 e LIM os incrementos foram de 16,7 e 35,7 % respectivamente. Assim, pode-se inferir que o efeito tóxico causado às lagartas pelo esteróide EST-1 pode ser crônico, levando maior tempo para ocasionar a morte do inseto em relação ao triterpenóide TRIT-1 e ao limonóide LIM.

As substâncias TRIT-1, LIM e EST-1, além de terem sido responsáveis pelos maiores índices de mortalidade de lagartas de *T. absoluta* aos 5 e 9 DAI, também ocasionaram maior duração da fase de larva (Tabela 12). Os valores de duração desta fase, com o limonóide LIM e o esteróide EST-1 foi de 15,2 e 14,9 dias respectivamente, diferindo significativamente dos controles acetona (13,5 dias) e água (12,8 dias),

sendo que para o triterpenóide TRIT-1 (14,3 dias), apenas houve diferença em relação ao controle com água (Tabela 12). Além disso, o LIM e o EST-1 ocasionaram redução significativa da viabilidade da fase de larva (67,3 e 65,0 % respectivamente) em relação aos controles acetona (85,6 %) e água (92,5 %), sendo que o TRIT-1 também reduziu a viabilidade (74,5 %), porém, apenas em relação ao controle com água (Tabela 12).

Segundo Rodríguez & Vendramim (1996), é interessante que haja prolongamento da fase de larva, pois em condições de campo, o inseto ficaria por mais tempo propenso ao ataque de inimigos naturais, além do que, haveria uma assincronia entre os adultos desta população em relação aos indivíduos da população normal.

Tabela 11. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 5 e 9 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de *Trichilia pallida*

Tratamento <sup>1</sup>	5 DAI <sup>2</sup>	9 DAI
TRIT-1	16,8 ± 5,01 a	19,6 ± 5,57 ab
LIM	15,4 ± 2,26 a	20,9 ± 2,19 a
EST-1	9,3 ± 2,75 ab	16,5 ± 5,03 abc
TRIT-2	6,9 ± 2,67 b	9,0 ± 2,79 cd
EST-2	5,6 ± 1,52 b	10,5 ± 3,23 bcd
EST-3	4,6 ± 2,03 b	6,5 ± 2,26 cd
TRIT-3	3,9 ± 0,79 b	7,0 ± 1,88 cd
Controle - acetona	4,6 ± 1,69 b	7,2 ± 1,81 cd
Controle - água	2,0 ± 1,50 b	3,9 ± 1,47 d

<sup>1</sup>TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol). Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>2</sup>Dados originais; para análise estatística foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ .

Neste sentido, o triterpenóide TRIT-1, o limonóide LIM e o esteróide EST-1, além de apresentarem um efeito tóxico sobre lagartas de *T. absoluta*, caracterizado pelos maiores índices de mortalidade (Tabela 11), possivelmente também tenham exercido um efeito fagodeterrente, que por sua vez, teria afetado o desenvolvimento do inseto e influenciado na redução da viabilidade da fase de larva (Tabela 12).

Tabela 12. Duração e viabilidade da fase de larva de *Tuta absoluta* em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de *Trichilia pallida*

Tratamento <sup>1</sup>	Duração (dias)	Viabilidade (%)
TRIT-1	14,3 ± 0,18 bc	74,5 ± 6,36 bc
LIM	15,2 ± 0,46 a	67,3 ± 7,07 c
EST-1	14,9 ± 0,28 ab	65,0 ± 8,82 c
TRIT-2	14,2 ± 0,29 bc	86,6 ± 3,97 ab
EST-2	13,6 ± 0,10 c	81,2 ± 5,59 abc
EST-3	14,0 ± 0,36 c	85,9 ± 4,30 ab
TRIT-3	13,9 ± 0,12 c	90,7 ± 2,76 ab
Controle – acetona	13,5 ± 0,21 c	85,6 ± 2,26 ab
Controle – água	12,8 ± 0,16 d	92,5 ± 3,35 a

<sup>1</sup>TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol). Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

Além dos efeitos tóxico e provavelmente fagodeterrente, também se observou que lagartas alimentadas em folíolos tratados com o triterpenóide

TRIT-1 (0,1 %) apresentaram alterações possivelmente relacionadas ao sistema endócrino, que é responsável pelo controle do crescimento e da ecdise. Observou-se que algumas lagartas não conseguiram se livrar completamente da exúvia, o que ocasionou o anelamento do abdome do inseto, impedindo-o de se alimentar e de se locomover, ocorrendo então a morte por ocasião da ecdise (Figura 18). Roel et al. (2000b) também constataram alterações semelhantes às observadas com o triterpenóide TRIT-1, porém, em lagartas de *S. frugiperda* sob efeito do extrato acetato de etila de folhas e de ramos de *T. pallida*. Os autores observaram que, principalmente nas maiores concentrações (3 % - p/v), muitas lagartas morreram durante a ecdise por não conseguirem se livrar da exúvia, que ficava presa geralmente na parte posterior do abdome. Como se trata da mesma espécie de planta inseticida e de sintomas muito semelhantes, pode ser que o efeito observado por Roel et al. (2000b) também estivesse associado à substância 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1).

Os efeitos observados devido ao TRIT-1 em *T. absoluta* e os citados por Roel et al. (2000b), também foram observados em outras espécies de insetos e atribuídos ao tetranortriterpenóide (limonóide) azadiractina, principal substância com atividade inseticida do nim (Martinez & van Emden, 2001; Mordue (Luntz) & Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000). Em trabalho visando avaliar o efeito da azadiractina na liberação e ação do ecdisônio (hormônio da muda), Mordue (Luntz) & Nisbet (2000) injetaram azadiractina na hemolinfa de ninfas de quinto ínstar de *Locusta migratoria* L. antes e por ocasião do pico de liberação do referido hormônio. Quando a azadiractina foi injetada antes do pico, os autores observaram que houve um bloqueio na liberação do ecdisônio, sendo que alguns insetos morreram sem terem atingido a ecdise, enquanto que os sobreviventes tiveram o ínstar ninfal prolongado. Por outro lado, quando a azadiractina foi injetada por ocasião do pico de liberação do ecdisônio na hemolinfa, os insetos foram incapazes de absorver ar o suficiente e morreram durante a ecdise, presos à exúvia.

Nesse sentido, pode-se inferir que a substância 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) teria se acumulado na hemolinfa de lagartas de *T. absoluta* na medida em que estas se alimentavam dos folíolos tratados, de forma que do terceiro para o quarto ínstar teria interferido na liberação do ecdisônio, à semelhança da azadiractina, provavelmente reduzindo sua concentração na hemolinfa, e por conseguinte, levado as lagartas à morte pela incapacidade de se livrarem da exúvia (Figura 18).

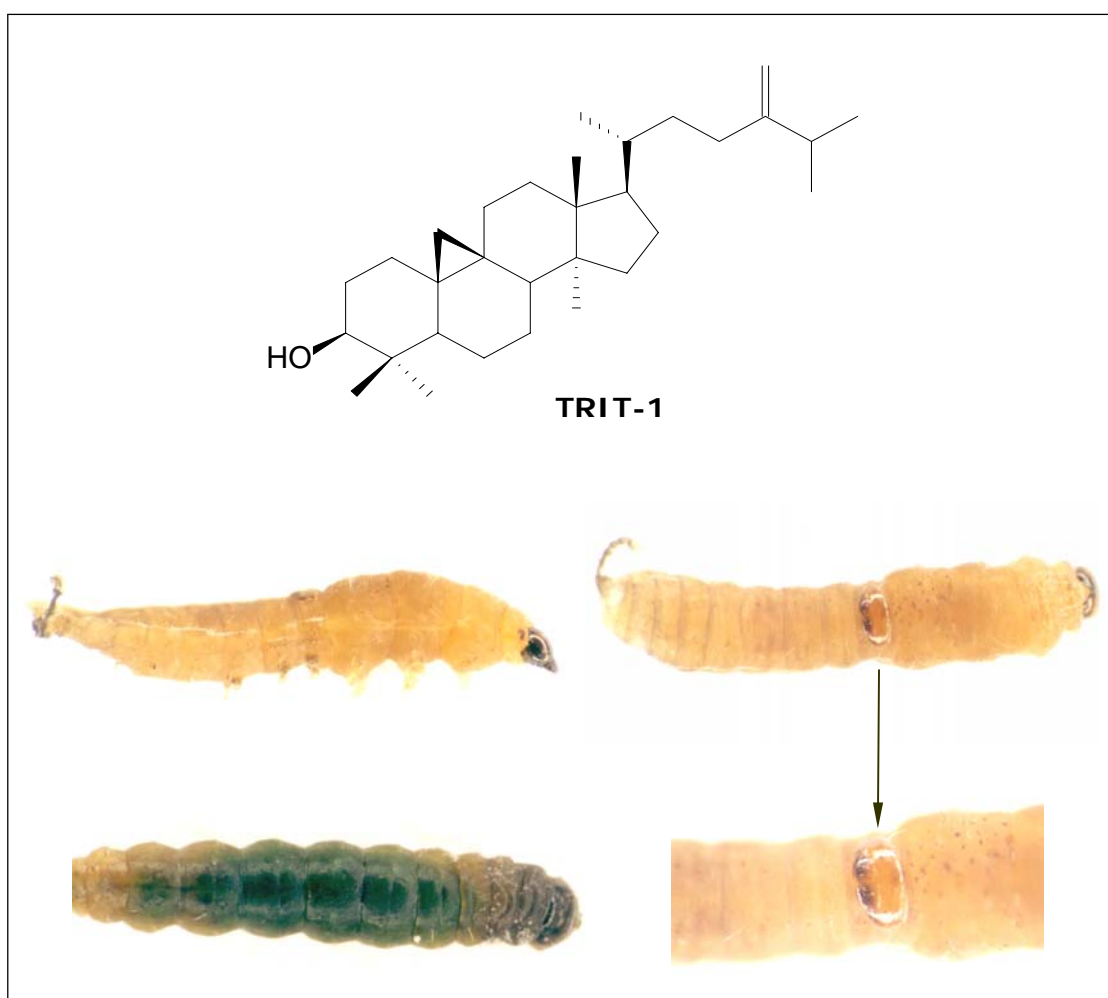


Figura 18 - Lagartas de *Tuta absoluta* alimentadas em folíolos de tomateiro tratados com o triterpeno 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol (TRIT-1) de folhas de *Trichilia pallida* a 0,1 %

Mesmo as substâncias TRIT-1, LIM e EST-1, que ocasionaram maiores índices de mortalidade de lagartas, verificados aos 5 e 9 DAI (Tabela 11), prolongamento e redução da viabilidade da fase de larva (Tabela 12), não foram capazes de reduzir significativamente o peso de pupas machos (Figura 19) e fêmeas (Figura 20) e prolongar e reduzir a viabilidade da fase de pupa (Tabela 13) em relação aos controles (acetona e água). Resultados semelhantes foram observados por Rodríguez & Vendramim (1996), que ao avaliarem o efeito de extratos aquosos de diferentes estruturas vegetais de 11 espécies de Meliaceae sobre *S. frugiperda*, constataram que os parâmetros relacionados à fase de larva foram mais afetados que os da fase de pupa. De acordo com Tanzubil & McCaffery (1990), tais resultados estariam associados a baixas doses de substância tóxica, uma vez que houve inibição do crescimento de lagartas (Tabela 12), porém, estas não reduziram o consumo de alimento, o que se refletiu em pupas com pesos equivalentes às pupas de ambos os controles (Figuras 19 e 20).

No entanto, como foi aventada a hipótese de que as substâncias em concentrações maiores causariam um efeito inseticida ou fagodeterrente mais pronunciado sobre *T. absoluta* (Figura 17), também é de se esperar que nestas condições haveria uma redução significativa do peso de pupas, aumento da duração e redução da viabilidade da fase de pupa.

Como se observa na Figura 20, o peso de pupas fêmeas, formadas a partir de lagartas alimentadas em folíolos tratados com o triterpenóide TRIT-1, foi significativamente superior ao peso de pupas do controle (água). Este resultado, a princípio contraditório, uma vez que a referida substância causou as maiores mortalidades de lagartas aos 5 e 9 DAI (Tabela 11), prolongou a fase de larva e reduziu de maneira significativa sua viabilidade (Tabela 12), pode ser explicado, de acordo com Vendramim & Scampini (1997), que também observaram resultado semelhante em pesquisa com extratos aquosos de *M. azedarach* e *S. frugiperda*, como sendo em razão de uma possível seleção natural, de maneira que apenas os indivíduos



vigorosos (com maior peso), e portanto mais aptos a atingir a fase adulta, teriam sobrevivido.

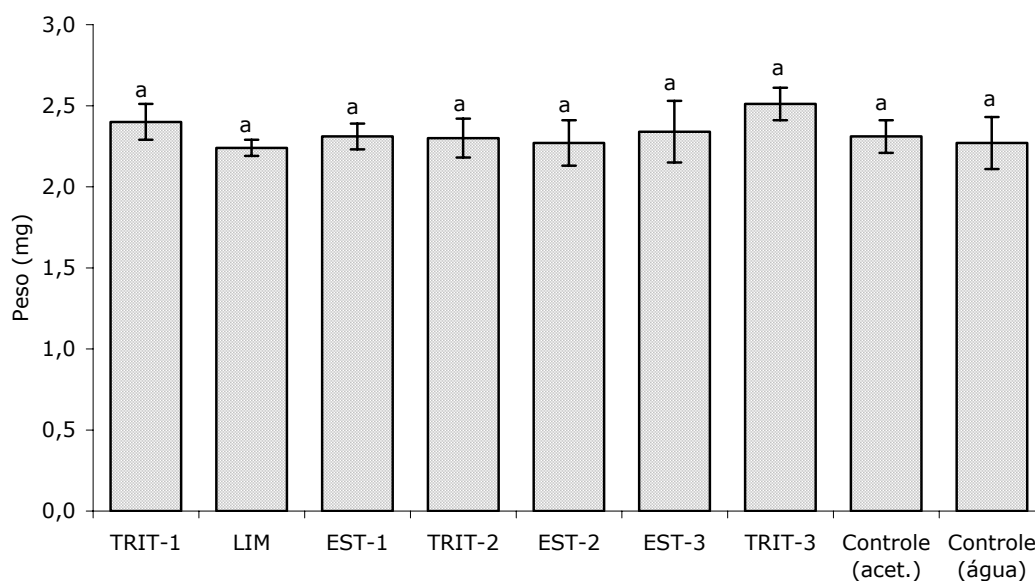


Figura 19 - Peso de pupas machos de *Tuta absoluta* em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de *Trichilia pallida*. TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol). Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

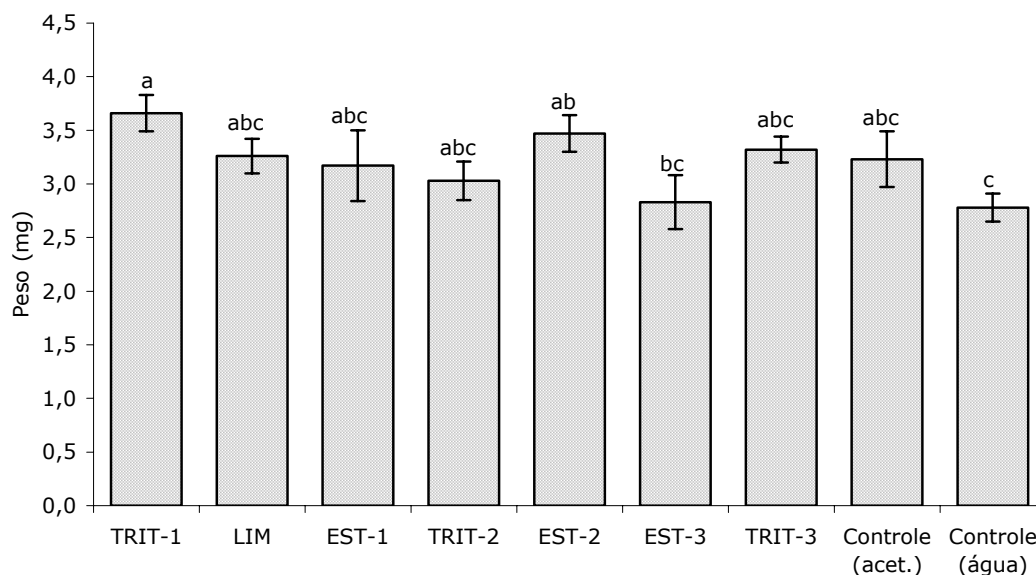


Figura 20 - Peso de pupas fêmeas de *Tuta absoluta* em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de *Trichilia pallida*. TRIT-1 (24-metilenocicloart-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2(24-metilenocicloart-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloart-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol). Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Como se pode observar na Tabela 13, houve maior viabilidade da fase de pupa para a substância EST-1 em relação a EST-2. Este resultado também parece contraditório, uma vez que o esteróide EST-1 ocasionou maior mortalidade de lagartas aos 9 DAI comparada aos controles (acetona e água), prolongou a fase larval e reduziu de maneira significativa sua viabilidade. No entanto, de maneira similar ao observado com o peso de pupas fêmeas envolvendo a TRIT-1 e o controle (água) (Figura 20), possivelmente também possa ter ocorrido uma seleção dos indivíduos mais aptos, segundo Vendramim & Scampini (1997).

Tabela 13. Duração e viabilidade da fase de pupa de *Tuta absoluta* em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de *Trichilia pallida*

Tratamento <sup>1</sup>	Duração (dias)	Viabilidade (%)
TRIT-1	7,6 ± 0,10 ab	87,3 ± 4,76 ab
LIM	7,6 ± 0,19 ab	83,9 ± 2,64 ab
EST-1	7,6 ± 0,05 ab	95,2 ± 3,37 a
TRIT-2	7,4 ± 0,08 abc	83,3 ± 3,15 ab
EST-2	7,1 ± 0,15 c	81,8 ± 3,54 b
EST-3	7,3 ± 0,13 bc	86,2 ± 5,08 ab
TRIT-3	7,3 ± 0,14 bc	87,6 ± 3,04 ab
Controle – acetona	7,7 ± 0,07 a	87,5 ± 4,35 ab
Controle – água	7,4 ± 0,19 abc	84,6 ± 1,16 ab

<sup>1</sup>TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol). Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

Em relação ao percentual de adultos deformados (Figura 21), não foi possível identificar efeito significativo das substâncias avaliadas em comparação aos controles (acetona e água). Para este parâmetro, como houve grande variabilidade entre as diferentes repetições, caracterizada pelo maior desvio (EP) em relação às médias de tratamentos, o que confere baixa precisão ao se avaliar os resultados, é conveniente se considerar em trabalhos futuros maior número possível de indivíduos a fim de que a variabilidade observada seja minimizada.

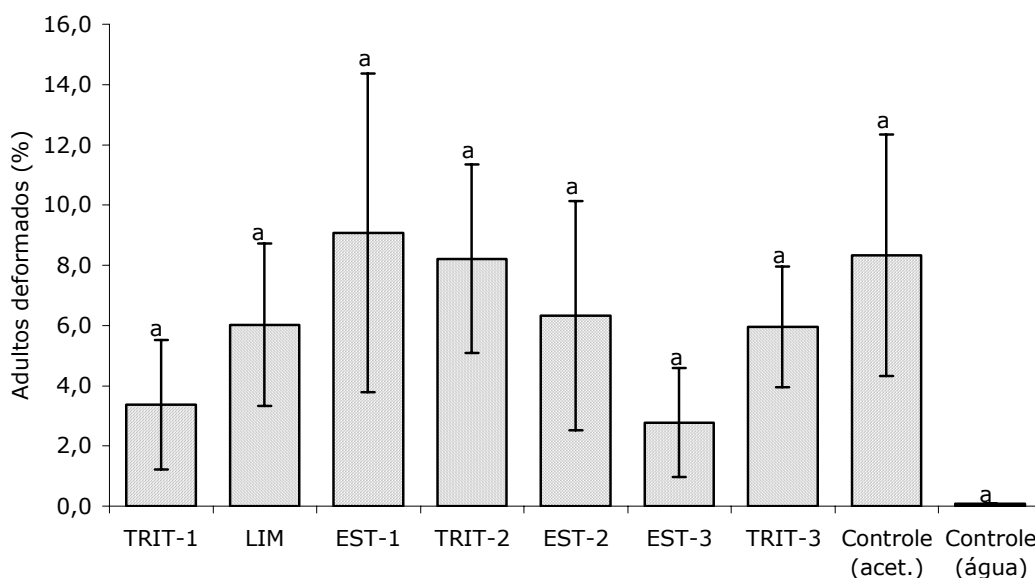


Figura 21 -Adultos deformados de *Tuta absoluta* em folíolos de tomateiro tratados com substâncias (0,1 %) isoladas de *Trichilia pallida*. TRIT-1 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol); LIM (gedunina); EST-1 (24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol); TRIT-2 (24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol); EST-2 (24-metileno-colesterol); EST-3 (24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol) e TRIT-3 (cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol). Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Dados originais; para análise estatística foram transformados em log de  $x+0,5$

#### 4.4.2 Frações do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallens*

Em relação aos rendimentos das frações obtidas pela partição líquido-líquido do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallens*, se observou comportamento semelhante ao ocorrido com *T. pallida* (Tabela 9), sendo as frações em metanol (36,52 %) e em hexano (46,07) as que

tiveram maiores rendimentos, enquanto para as demais o rendimento não atingiu 10 % (Tabela 14).

Tabela 14. Rendimento na obtenção de frações, após partição líquido-líquido, do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallens*

Fração	Rendimento <sup>1</sup>	
	g	%
Hexano	0,82	46,07
Metanol	0,65	36,52
Acetato de etila	0,04	2,25
n butanol	0,07	3,93
Aquosa	0,17	9,55

<sup>1</sup>Obtido a partir de 1,78 g do extrato em diclorometano.

Diferentemente do que foi observado com *T. pallida*, aos 3 DAI se constatou que a mortalidade de lagartas de *T. absoluta* (20,6 %) que se alimentaram em folíolos tratados com a fração aquosa do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallens* a 0,1 %, superou significativamente as frações em hexano, metanol, acetato de etila e n-butanol, bem como os controles água e acetona, sendo que estas frações não diferiram entre si e nem dos controles (Tabela 15). Aos 6 DAI foi verificada a ocorrência de comportamento semelhante, sendo a fração aquosa a única que ocasionou mortalidade de lagartas (22,6 %) superior aos controles água (7,4 %) e acetona (7,5 %). Todavia, nessa avaliação, não ocorreu diferença significativa de mortalidade de lagartas entre a fração aquosa e as frações em acetato de etila (18,3 %) e em metanol (12,6 %) (Tabela 15). Exceto a aquosa, à semelhança do que foi observado com *T. pallida* (Tabela 10), estas duas últimas frações foram consideradas as mais importantes em

termos de atividade inseticida sobre a traça *T. absoluta*.

Igualmente ao que foi constatado em relação ao incremento de mortalidade de lagartas de *T. absoluta*, do 3º para o 6º DAI, com o extrato aquoso liofilizado de folhas de *T. pallens* a 3 % (Tabela 3), também foi observado com a fração aquosa (0,1 %), uma vez que o aumento do percentual de mortalidade de lagartas do 3º para o 6º DAI foi de apenas 2 % (Tabela 15). A manutenção deste comportamento reforça a hipótese de ocorrência de um efeito inseticida agudo de extratos de *T. pallens* sobre a traça-do-tomateiro, já que grande parte ( $\cong 90$  %) da atividade inseticida foi manifestada nos primeiros 3 dias após alimentação do inseto em folíolos tratados.

O efeito da fração aquosa na sobrevivência de lagartas da traça aos 3 e 6 DAI, refletiu-se em drástica redução do peso (cerca de 60 %) de lagartas alimentadas em folíolos tratados com o referido extrato até os 6 DAI, diferindo significativamente das demais frações e dos controles água e acetona (Figura 22). Assim, a fração aquosa do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallens*, além ter grande potencial como fonte de substâncias inseticidas, também se destacou pelo provável efeito fagodeterrente em lagartas de *T. absoluta*.

Embora não existam trabalhos relatando a atividade inseticida e/ou fagodeterrente de frações aquosas obtidas a partir de um extrato não aquoso de *T. pallens*, há fortes evidências, de acordo com Bogorni & Vendramim (2003), do grande potencial de extratos mais polares desta espécie apresentarem substâncias com atividade inseticida. Avaliando a atividade de extratos aquosos a 5 % (p/v) de folhas e ramos de 6 espécies de *Trichilia* e de sementes de *A. indica* sobre lagartas de *S. frugiperda*, estes autores constataram que, dentre os extratos aquosos de folhas das espécies de *Trichilia* avaliadas, apenas o de *T. pallens* (98,7 %) causou mortalidade de lagartas (5º dia) significativamente semelhante à observada com o extrato de sementes de *A. indica* (98,7 %). Além disso, no trabalho desses autores, lagartas alimentadas durante 5 dias com folhas de milho tratadas

com o extrato aquoso de folhas de *T. pallens* sofreram redução de 91,7 % do peso em relação à testemunha, igualando-se ao efeito causado pelo extrato de *A. indica*, que reduziu 93,3 % do peso das lagartas.

Tabela 15. Mortalidade de lagartas (%) de *Tuta absoluta* aos 3 e 6 dias após a infestação (DAI) em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,1 %) do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallens*

Tratamento	3 DAI	6 DAI
Hexano	8,1 ± 3,06 b	10,4 ± 2,63 b
Metanol	9,5 ± 2,87 b	12,6 ± 3,00 ab
Acetato de etila	9,7 ± 2,46 b	18,3 ± 5,38 ab
n-butanol	10,7 ± 3,16 b	12,4 ± 3,90 b
Aquosa	20,6 ± 4,95 a	22,6 ± 5,15 a
Controle – acetona	5,2 ± 2,01 b	7,5 ± 1,17 b
Controle – água	3,3 ± 1,04 b	7,4 ± 1,67 b

Médias (± EP) seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

Cabe ressaltar, entretanto, segundo Shimizu (1998), que a purificação de moléculas solúveis em água é de certa forma evitada por muitos pesquisadores em função do seu grande grau de dificuldade. Em razão disso, principalmente, a maior parte das substâncias novas purificadas são solúveis em lipídeos. Todavia, o progresso de técnicas como a cromatografia de alta performance e computação auxiliada pela ressonância magnética nuclear de alta resolução, têm contribuído sobremaneira na elucidação de muitas estruturas de substâncias importantes biologicamente.

Com base no exposto, além da fração aquosa, deve-se considerar como fontes promissoras de substâncias inseticidas de *T. pallens* sobre *T. absoluta*, por ordem decrescente de importância, a fração acetato de etila e a em metanol. No entanto, a fração acetato de etila, pelo baixo rendimento na sua obtenção (2,25 %) (Tabela 14), exige maior volume inicial de extrato a fim de ser viável seu fracionamento cromatográfico bem como a realização dos ensaios para biomonitoramento.

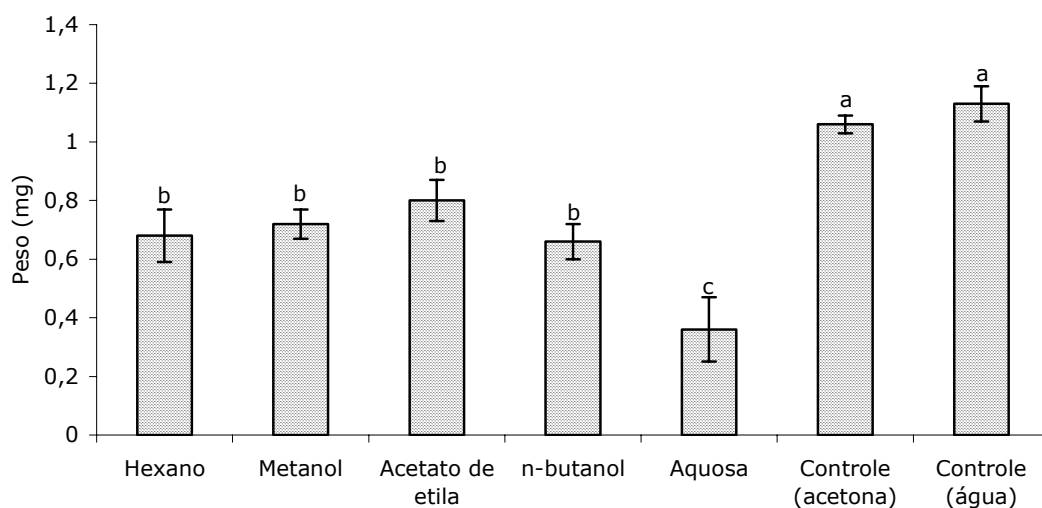


Figura 22 - Peso de lagartas de *Tuta absoluta* aos 6 dias após a infestação em folíolos de tomateiro tratados com frações (0,1 %) do extrato em diclorometano de folhas de *Trichilia pallens*. Médias ( $\pm$  EP) seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ )



#### 4.5 Considerações finais

Os extratos aquosos liofilizados (EAL) de folhas de *T. pallida* e *T. pallens*, a 3 %, foram responsáveis por mortalidades relativamente altas de lagartas de *Tuta absoluta*, chegando a atingir 92,6 % devido ao EAL de folhas de *T. pallida*. É importante ressaltar, entretanto, que altas mortalidades de insetos constatadas com o uso de extratos aquosos, nem sempre se devem a substâncias promissoras pela atividade inseticida e que sejam capazes de despertar interesse pelos fitoquímicos. Nesse sentido, segundo Silva et al. (1998), quando a água é utilizada como único solvente, o que não é desejável quando se busca identificar substâncias ativas, muitos constituintes de plantas são extraídos, quais sejam: carboidratos, flavonóides, alcalóides quaternários, saponinas e taninos. Estes últimos, principalmente, de acordo com Hostettmann et al. (2003b), ao se ligarem de maneira inespecífica a enzimas podem levar a resultados falsos positivos, exigindo, portanto, certa prudência quando da interpretação desses resultados.

Em relação aos extratos não aquosos (em hexano, diclorometano e metanol) avaliados a 1 %, observaram-se que as mortalidades de lagartas foram de no máximo 15,2 e 17,1 % aos 6 DAI para os extratos em diclorometano de folhas de *T. pallens* e de *T. pallida* respectivamente. Quando avaliaram-se as frações oriundas dos extratos em diclorometano de folhas de *T. pallida* e de *T. pallens* (a 0,1 %) observou-se aumento dos índices de mortalidade para ambas as espécies, embora com concentração 10 vezes inferior a dos extratos originais (1 %). As mortalidades máximas aos 6 DAI foram de 20,9 e 22,6 % com as frações em acetato de etila de *T. pallida* e aquosa de *T. pallens* respectivamente.

Nesse sentido, embora não tenham sido constatados altos índices de mortalidades do inseto, há de se considerar que os referidos extratos e frações foram aplicados, através de mini-atomizador, apenas uma vez sobre os folíolos de tomateiro e com um volume de solução (extrato + solvente)

relativamente baixo (40 ml para 24 folíolos) em se considerando que boa parte é perdida devido à deriva e evaporação do solvente (acetona) antes mesmo de atingir o alvo. Assim, acredita-se que as lagartas de *T. absoluta* tenham se contaminado principalmente pela ingestão do(s) composto(s) tóxico(s) presente(s) nos respectivos extratos, uma vez que o efeito por contato deve ter sido mínimo, já que as lagartas penetram rapidamente a epiderme e passam a se alimentar do mesófilo foliar. No entanto, como se buscava identificar os extratos e frações mais promissores como fonte de substâncias com atividade inseticida sobre a traça-do-tomateiro *T. absoluta*, considerou-se que a técnica empregada atendeu perfeitamente aos objetivos propostos, uma vez que possibilitou a realização de bioensaios com pequeno volume de extratos e frações, permitindo, por conseguinte, a execução das demais etapas, como os fracionamentos cromatográficos, o isolamento e a avaliação do potencial inseticida das substâncias puras. Além desses aspectos, tornou viável o emprego da acetona pura como solvente, o que seria impossível através da técnica de imersão de folíolos.

No que se refere à busca de substâncias de plantas com atividade inseticida, é importante que se considere como primordial a realização de projetos multidisciplinares, envolvendo entomologistas e fitoquímicos, de maneira que haja constante interação entre esses profissionais, a fim de que avanços realmente consistentes sejam alcançados.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições em que os bioensaios foram realizados conclui-se que:

- ⌘ Extratos aquosos liofilizados de folhas de *Trichilia pallida* e de *Trichilia pallens*, avaliados a 3 %, são mais eficientes para lagartas de *Tuta absoluta* que os respectivos extratos de ramos.
- ⌘ Dentre os extratos em hexano, diclorometano e metanol de folhas de *T. pallida* e de *T. pallens*, a 1 %, o em diclorometano é o mais promissor como fonte de substância(s) com atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta*.
- ⌘ A fração em acetato de etila do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallida* é a que apresenta maior atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta* em relação às frações em hexano, metanol, n-butanol e aquosa.
- ⌘ A fração aquosa do extrato em diclorometano de folhas de *T. pallens* causa maior atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta*, em relação às frações em hexano, metanol, acetato de etila e n-butanol.

- ⌘ Das substâncias isoladas a partir do extrato em diclorometano de *T. pallida* (a 0,1 %), o triterpeno 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol e o esteróide 24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol, ambos de folhas, juntamente com o limonóide gedunina de frutos, apresentam maior atividade inseticida sobre lagartas de *T. absoluta* que as substâncias 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -26-diol; 24-metileno-colesterol; 24-metileno-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,22-triidroxi-colesterol e cicloarta-23-eno-3 $\beta$ ,25-diol.
  
- ⌘ O triterpeno 24-metilenocicloarta-3 $\beta$ -ol, o limonóide gedunina e o esteróide 24-metileno-3,22-diidroxi-colesterol prolongam a fase de larva e reduzem a viabilidade desta fase, mas não afetam a duração, o peso e a viabilidade da fase de pupa de *T. absoluta*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGALEIL, S.A.M.; NAKATANI, M. Antifeeding activity of limonoids from *Khaya senegalensis* (Meliaceae). **Journal of Applied Entomology**, v.127, p.236-239, 2003.
- ARENAS, C.; RODRÍGUEZ-HAHN, L. Limonoids from *Trichilia havanensis*. **Phytochemistry**, v.29, n.9, p.2953-2956, 1990.
- BAHAMONDES, L.A.; MALLEA, A.R. Biología en Mendoza de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) Povolný (Lepidoptera-Gelechiidae) espécie nueva para la República Argentina. **Revista de la Facultad de Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p.96-104, 1969.
- BOGORNI, P.C. Biología e consumo foliar de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em diferentes cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. Porto Alegre, 1999. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.665-669, 2003.

- BOGORNİ, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; TAVARES, M.A.G.C.; PANSIERA, V.C.; CUNHA, U.S. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre o dano de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO - SICONBIOL, 8., São Pedro, SP. 2003. **Resumos**. São Pedro: SEB, 2003. p. 161.
- BOGORNİ, P.C.; CUNHA, U.S.; DIOGO, F.A.; VENDRAMIM, J.D.; CABRAL, K. de G. Ação inseticida de NeemAzal®-T/S sobre *Tuta absoluta* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., Gramado, RS. 2004. **Resumos**. Gramado: SEB, 2004a. p. 578.
- BOGORNİ, P. C.; CUNHA, U.S.; VENDRAMIM, J. D.; DIOGO, F.A.; CABRAL, K. de G. Avaliação do efeito residual de NeemAzal®-T/S em tomateiro sobre *Tuta absoluta* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., Gramado, RS. 2004. **Resumos**. Gramado: SEB, 2004b. p. 578.
- BRUNHEROTTO, R. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lep., Gelechiidae) criadas em diferentes genótipos de tomateiro. Piracicaba, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.455-459, 2001.
- CARBALLO, R.; BASSO, C.; SCATONI, I.; COMOTTO, F. Ensayo para el control de *Scrobipalpa absoluta* (Meyrick) temporada de 1980-81. **Revista Técnica**, v.50, p.41-46, 1981.
- CASTELO BRANCO, M. Flutuação populacional da traça do tomateiro no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v.10, n.1, p.25, 1992.

- CHAURET, D.C.; DURST, T.; ARNASON, J.T. Novel steroids from *Trichilia hirta* as identified by nanoprobe inadequate 2D-NMR spectroscopy. **Tetrahedron**, v.37, n.44, p.7875-7878, 1996.
- COELHO, M.C.F.; FRANÇA, F.H. Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p.129-135, 1987.
- CORTEZ, D.A.G.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. da; FERREIRA, A.G. Limonoids from *Trichilia hirta*. **Phytochemistry**, v.31, n.2, p.625-628, 1992.
- CORTEZ, D.A.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. da; FERREIRA, A.G. A limonoid from *Trichilia estipulata*. **Phytochemistry**, v.55, p.711-713, 2000.
- CORTEZ, D.A.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. da; FERREIRA, A.G.; CASS, Q.B. Separation and purification of meliacin butenolides from *Trichilia estipulata* by normal-phase HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.24, n.3, p.415-423, 2001.
- CORTEZ, D.A.G.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. da; FERREIRA, A.G.; CASS, Q.B.; PIRANI, J.R. Meliacin butenolides from *Trichilia estipulata*. **Phytochemistry**, v.49, n.8, p.2493-2496, 1998.
- CUNHA, U.S.; BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; DIOGO, F.A. Eficácia de NeemAza<sup>®</sup>-T/S no controle da traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO - SICONBIOL, 8., São Pedro, SP. 2003. **Resumos**. São Pedro: SEB, 2003a. p. 163.

- CUNHA, U.S.; BOGORNI, P.C.; VENDRAMIM, J.D.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R. Estimativa de concentrações letais de NeemAzal<sup>®</sup>-TS, formulação à base de nim, para a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO - SICONBIOL, 8., São Pedro, SP. 2003. **Resumos**. São Pedro: SEB, 2003b. p. 162.
- DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. cap.9, p.109-127.
- ESCOUBAS, P.; FUKUSHI, Y.; LAJIDE, L.; MIZUTANI, J. A new method for fast isolation of insect antifeedant compounds from complex mixtures. **Journal of Chemical Ecology**, v.18, n.10, p.1819-1832, 1992.
- FERNÁNDEZ, S.; MONTAGNE, A. Biología del minador del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Boletín de Entomología Venezolana**, v.5, n.12, p.89-99, 1990.
- FERRACINI, V.L.; WATANABE, M.A.; SILOTO, R.C. Controle da traça-do-tomateiro *Scrobipalpuloides absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Meyrick, 1917) em plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* (Mill.) envasadas, usando extratos vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., Piracicaba, SP. 1993. **Resumos**. Piracicaba: SEB, 1993. p.630.
- FERRACINI, V.L.; WATANABE, M.A.; FRIGHETTO, R.T.S.; SILOTO, R.C. Efeito repelente de extratos vegetais sobre a traça-do-tomateiro (*Scrobipalpuloides absoluta*, Lepidoptera, Gelechiidae). In: WORKSHOP SOBRE PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS, Jaguariúna, 1990. **Anais**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPDA, 1990. p.49.



- FERRACINI, V.L.; WATANABE, M.A.; FRIGHETTO, R.T.S.; SILOTO, R.C. Controle da traça do tomateiro *Scrobipalpula absoluta*, utilizando extratos vegetais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13., Recife, 1991. **Resumos**. Recife: SEB, 1991. p.356.
- FERREIRA, J.A.M.; ANJOS, N. Caracterização dos ínstares larvais de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: SEB, EMBRAPA, CNPMF, 1997. p.64
- FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. cap.10, p.129-156.
- FRANÇA, F.H.; CASTELO BRANCO, M. Ocorrência da traça-do-tomateiro (*Scrobipalpuloides absoluta*) em solanáceas silvestres no Brasil Central. **Horticultura Brasileira**, v.10, p.6-10, 1992.
- FRANÇA, F.H.; COELHO, M.C.F.; HORINO, Y. Controle químico da traça do tomateiro, broca pequena e broca grande em tomate, 1983. **Horticultura Brasileira**, v.3, n.1, p.43, 1985.
- FRANCISCO, I.A.; PINOTTI, M.H.P. Cyanogenic glycosides in plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, n.5, p.487-492, 2000.
- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; TSUTSUMI, M.T.; ROQUE, N.F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. **Phytochemistry**, v.45, n.1, p.141-148, 1997.
- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; RODRIGUES, E.D.; POTT, R.V.J.; ROQUE, N.F. Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. **Phytochemistry**, v.42, n.5, p.1399-1403, 1996.

- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; ROQUE, N.F.; CASTELLANO, E.E.; ZUKERMAN-SCHPECTOR. 7 $\beta$ - Oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. **Phytochemistry**, v.55, p.733-740, 2000.
- GIUSTOLIN, T.A. Efeito de dois genótipos de *Lycopersicon* spp. associados aos entomopatógenos *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *Beauveria bassiana* no desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lep. Gelechiidae). Piracicaba, 1996. 99p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GIUSTOLIN, T.A.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de duas espécies de tomateiro na biologia de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, n.3, p.511-517, 1994.
- GIUSTOLIN, T.A.; VENDRAMIM, J.D. Biologia de *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick), em folhas de tomateiro, em laboratório. **Ecossistema**, v.21, p.11-15, 1996.
- GIUSTOLIN, T.A.; VENDRAMIM, J.D.; PARRA, J.R.P. Desenvolvimento de uma dieta artificial para estudos do efeito de aleloquímicos sobre *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.2, p.265-272, 1995.
- GONÇALVES, C.R.; OLIVEIRA, A.; LIMA, A.F. *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera-Gelechiidae), uma nova broca do tomateiro no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., Brasília, 1983. **Resumos**. Brasília: SEB, 1983. p.73.
- GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R. Efeito de extratos de *Trichilia pallida* Swartz e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) e seu parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley. Piracicaba, 2003. 88p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- GRISOTO, E.A.; GARCIA, J.F.; TAVARES, M.A.G.C.; BOTELHO, P.S.M.; VENDRAMIM, J.D. Bioatividade de extratos vegetais sobre a cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stål., 1854) (Hemiptera: Cercopidae). In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., São Pedro. 2003. **Resumos**. São Pedro: SEB, 2003. p. 165.
- GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C.; MATIOLI, A.L.; ROCHA, R.M. Efeito de inseticidas e sistemas de condução do tomateiro no controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.321-325, 1994.
- GUNATILAKA, A.A.L.; BOLZANI, V. da S.; DAGNE, E. HOFMANN, G.A.; JOHNSON, R.K.; McCABE, F.L.; MATTERN, M.R.; KINGSTON, D.G. Limonoids showing selective toxicity to DNA repair-deficient yeast and other constituents of *Trichilia emetica*. **Journal of Natural Products**, v.61, p.179-184, 1998.
- HAJI, F.N.P. **Nova praga do tomateiro no Vale do Salitre no Estado da Bahia**. Petrolina: EMBRAPA, CPATSA, 1982. 2p. (Comunicado Técnico, 10).
- HAJI, F.N.P. **Aspectos biológicos da traça-do-tomateiro e seu controle**. Petrolina: EMBRAPA, CPATSA, 1984. 2p. (Comunicado Técnico, 13).
- HAJI, F.N.P.; SOUZA DIAS, R.C.; ANDRADE, M.W. **Controle da traça-do-tomateiro**. Petrolina: EMBRAPA, CPATSA, 1989. 2p. (Comunicado Técnico, 39).
- HAJI, F.N.P.; PARRA, J.R.P.; SILVA, J.P.; BATISTA, J.G.S. Biologia da traça-do-tomateiro sob condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.2, p.107-110, 1988a.

- Haji, F.N.P.; OLIVEIRA, C.A.V.; AMORIM NETO, M.S.; BATISTA, J.G.S. Flutuação populacional da traça do tomateiro, no submédio São Francisco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, n.1, p.7-14, 1988b.
- Haji, F.N.P.; FREIRE, L.C.L.; ROA, F.G.; SILVA, C.N. da; SOUZA JÚNIOR, M.M.; SILVA, M.I.V. da. Manejo integrado de *Scrobipalpuoides absoluta* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) no Submédio São Francisco. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.3, p.587-591, 1995.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003a. cap.2, p.43-58: A procura dos princípios ativos. (Série de textos da Escola de Verão em Química, 4).
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003b. cap.3, p.59-100: Técnicas de isolamento aplicadas aos produtos naturais. (Série de textos da Escola de Verão em Química, 4).
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003c. cap.4, p.101-146: Técnicas acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN). (Série de textos da Escola de Verão em Química, 4).
- IMENES, S.D.L.; UCHÔA-FERNANDES, M.A.; CAMPOS, T.B. de; TAKEMATSU, A.P. Aspectos biológicos e comportamentais da traça do tomateiro *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917), (Lepidoptera: Gelechiidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.57, n.1/2, p.63-68, 1990.

- INADA, A.; KONISHI, M.; MURATA, H.; NAKANISHI, T. Structures of a new limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*. **Journal of Natural Products**, v.57, n.10, p.1446-1449, 1994.
- JAGLAN, M.S.; KHOKHAR, K.S.; MALIK, M.S.; SINGH, R. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) extracts against american bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3262-3268, 1997.
- JARENKOW, J.A.; WAECHTER, J.L. Composição, estrutura e relações florísticas do componente arbóreo de uma floresta estacional no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.3, p.263-272, 2001.
- KLEIN, R.M. Meliaceae. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. As plantas meliáceas. Itajaí: Herbário "Barbosa Rodrigues", 1984. p.40-46.
- KUBO, I.; KLOCKE, J.A. An insect growth inhibitor from *Trichilia roka* (Meliaceae). **Experientia**, v.38, p.639-643, 1982.
- MARTINEZ, S.S. (Ed.). **O nim *Azadirachta indica* - natureza, usos múltiplos, produção**, Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002. 142p.
- MARTINEZ, S.S.; van ENDEM, H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.113-125, 2001.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 128p.

- McMILLIAN, W.W.; BOWMAN, M.C.; BURTON, R.L.; STARKS, K.J.; WISEMAN, B.R. Extract of chinaberry leaf as a feeding deterrent and growth retardant for larvae of the corn earworm and fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, v.62, n.3, p.708-710, 1969.
- MIHSFELDT, L.H.; PARRA, J.R.P. Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) em dieta artificial. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.769-776, 1999.
- MIKOLAJCZAK, K.L.; REED, D.K. Extractives of seeds of the Meliaceae: effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. **Journal of Chemical Ecology**, v.13, n.1, p.99-111, 1987.
- MIKOLAJCZAK, K.L.; ZILKOWSKI, B.W.; BARTELT, R.J. Effect of meliaceous seed extracts on growth and survival of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n.1, p.121-128, 1989.
- MORAES, G.J.; NORMANHA FILHO, J.A. Surto de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no trópico semi-árido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.3, p.503-504, 1982.
- MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, v.39, n.11, p.903-924, 1993.
- MORDUE (LUNTZ), A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.4, p.615-632, 2000.
- MOREIRA, J.O.T.; LARA, F.M.; CHURATA, M.G.C. Ocorrência de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick), (Lepidoptera - Gelechiidae) danificando tomate rasteiro em Jaboticabal, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7., Fortaleza, 1981. **Resumos**. Fortaleza: SEB, 1981. p.58.

- MUSZINSKI, T.; LAVENDOWSKI, L.M.; MASCHIO, L.M. Constatação de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) [*Gnorimoschema absoluta*] (Lepidoptera, Gelechiidae), como praga do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), no litoral do Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.11, n.2, p.291-292, 1982.
- NAKANISHI, K. Recent studies on bioactive compounds from plants. **Journal of Natural Products**, v.45, n.1, p.15-26, 1982.
- NAKANO, O.; PAULO, A.D. As traças do tomateiro. **Agroquímica**, n.20, p.8-12, 1983.
- NAKATANI, M.; JAMES, J.C.; NAKANISHI, K. Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the southern army worm. **Journal of the American Chemical Society**, v.103, p.1228-1230, 1981.
- NAKATANI, M.; IWASHITA, T.; NAOKI, H.; HASE, T. Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. **Phytochemistry**, v.24, n.1, p.195-196, 1985.
- OLUGBADE, T.A. Tetracyclic triterpenoides from *Trichilia prieuriana* leaves. **Phytochemistry**, v.30, n.2, p.698-700, 1991.
- OLUGBADE, T.A.; ADESANYA, S.A. Prieurianoside, a protolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia prieuriana*. **Phytochemistry**, v.54, p.867-870, 2000.
- ORTEGO, O.; LÓPEZ-OLGUÍN, J.; RUÍZ, M.; CASTAÑERA, P. Effects of toxic and deterrent terpenoids on digestive protease and detoxication enzyme activities of Colorado potato beetle larvae. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.63, p.76-84, 1999.

- PAULO, A.D. Época de ocorrência de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera-Gelechiidae) na cultura de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e seu controle. Piracicaba, 1986. 70p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PEREIRA, A. Química e atividade inseticida de *Trichilia catigua*. São Carlos, 2001. 100p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos.
- PICANÇO, M.; GUEDES, R.N.C.; LEITE, G.L.D.; FONTES, P.C.R.; SILVA, E.A. Incidência de *Scrobipalpuoides absoluta* em tomateiro sob diferentes sistemas de tutoramento e de controle químico. **Horticultura Brasileira**, v.13, n.2, p.180-183, 1995.
- POVOLNÝ, D. On three neotropical species of Gnorimoschemini (Lepidoptera, Gelechiidae) mining Solanaceae. **Acta Universitatis Agriculturae Facultas Agronomica**, v.2, p.379-393, 1975.
- POVOLNÝ, D. Gnorimoschemini of southern South America III: the scrobipalpuloid genera (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae). **Steenstrupia**, v.13, n.1, p.1-91, 1987. (Resumo em **Revista Chilena de Entomologia**, v.16, p.102, 1988).
- POVOLNÝ, D. Gnorimoschemini of southern America VI: identification keys, checklist of neotropical taxa and general considerations (Insecta, Lepidoptera, Gelechiidae). **Steenstrupia**, v.20, n.1, p.1-42, 1994.
- PRATISSOLI, D. Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879), nas traças *Scrobipalpuoides absoluta* (Meyrick, 1917) e *Phthorimaea operculella* (Veller, 1873) em tomateiro. Piracicaba, 1995. 130p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.



- PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. da A cycloartane triterpenoid and  $\omega$ - phenyl alkanolic and alkenolic acids from *Trichilia clausenni*. **Phytochemistry**, v.42, n.3, p.795-798, 1996.
- PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. da  $\gamma$ - lactones from *Trichilia clausenni*. **Phytochemistry**, v.48, n.2, p.307-310, 1998.
- QUIROZ, E.C. Nuevos antecedentes sobre la biología de la polilla del tomate, *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick). **Agricultura Técnica**, v.36, n.2, p.82-86, 1976.
- RAMÍREZ, M.C.; TOSCANO, R.A.; ARNASON, J.; OMAR, S.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; MATA, R. Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. **Tetrahedron**, v.56, p.5085-5091, 2000.
- RÁZURI, V.; VARGAS, E. Biología y comportamiento de *Scrobipalpula absoluta* Meyrick (Lep., Gelechiidae) en tomatera. **Revista Peruana de Entomología**, v.18, n.1, p.84-89, 1975.
- ROCHA, W.C. Estudo fitoquímico da casca do caule de *Salacia impressifolia* (Miers.) A. C. Smith (Hippocrateaceae). Manaus, 2001. 133p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Amazonas.
- ROCHA, W.C.; BOGORNÍ, P.C.; VIEIRA, P.C.; VENDRAMIM, J.D. Atividade inseticida de limonóides isolados de frutos de *Trichilia pallida* frente a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., Gramado, RS. 2004. **Resumos**. Gramado: SEB, 2004. p. 586.
- RODRÍGUEZ, B.; CABALLERO, C.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P. A new tetranortriterpenoid from *Trichilia havanensis*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.452-454, 2003.

- RODRÍGUEZ H., C.; VENDRAMIM, J.D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, n. 42, p.14-22, 1996.
- RODRÍGUEZ H., C.; VENDRAMIM, J.D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Agricultura**, v.72, n.3, p.305-318, 1997.
- RODRÍGUEZ H., C.; VENDRAMIM, J.D. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistático de extratos de meliaceas sobre *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Plagas**, n.48, p.11-18, 1998.
- RODRÍGUEZ-HAHN, L.; CÁRDENAS, J.; ARENAS, C. Trichavesin, a pteridic acid derivative from *Trichilia havanensis*. **Phytochemistry**, v.43, n.2, p.457-459, 1996.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Scientia Agricola**, v.56, n.3, p.581-586, 1999.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.4, p.799-808, 2000a.
- ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz) (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, v.59, n.1, p.53-58, 2000b.
- SALAS, J.; FERNÁNDEZ, S. Los minadores de la hoja del tomate. **FONAIIP Divulga**, v.2, n.18, p.21-22, 1985.

- SCARDINI, D.M.B.; FERREIRA, L.R.; GALVEAE, P.A.O. Ocorrência da traça-do-tomateiro *Scrobipalpa absoluta* (Meyr.) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., Brasília, 1983. **Resumos**. Brasília: SEB, 1983. p.72.
- SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Journal of Insect Physiology**, v.34, p.713-719, 1988.
- SHIMIZU, Y. Purification of water-soluble natural products. **Methods in Biotechnology**, v.4, p.329-341, 1998.
- SILVA, G.L.; LEE, I.S.; KINGHORN, A.D. Special problems with the extraction of plants. **Methods in Biotechnology**, v.4, p.343-363, 1998.
- SIMMONDS, M.S.J.; STEVENSON, P.C.; PORTER, E.A.; VEITCH, N.C. Insect antifeedant activity of three tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.1117-1120, 2001.
- SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae). **Journal of Applied Entomology**, v.124, p.233-238, 2000a.
- SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v.2, p.147-153, 2000b.
- SOUZA, A.P. Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) biótipo B. Piracicaba, 2004. 101p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.403-406, 2000a.
- SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, v.59, n.2, p.173-179, 2000b.
- SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.133-137, 2001.
- SOUZA, J.C. de; REIS, P.R. Controle da traça-do-tomateiro em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, p.343-354, 1986.
- SOUZA, J.C. de; REIS, P.R. **Traça-do-tomateiro: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1992. 19p. (EPAMIG. Boletim, 38)
- SOUZA, J.C. de; REIS, P.R.; GOMES, J.M.; NACIF, A.P.; SALGADO, L.O. **Traça-do-tomateiro, histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1983. 15p. (EPAMIG. Boletim, 2)
- TANZUBIL, P.B.; McCAFFERY, A.R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, v.9, n.5, p.383-386, 1990.
- THOMAZINI, A.P.B.W.; VENDRAMIM, J.D.; LOPES, M.R.T. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, p.13-17, 2000.

- TINTO, W.F.; JAGESSAR, P.K.; KETWARU, P. Constituents of *Trichilia schomburgkii*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.4, p.972-977, 1991.
- TORRECILLAS, S.M.; VENDRAMIM, J.D. Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.27-31, 2001.
- TORRES, A.L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J.V. de Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.151-156, 2001.
- TRINDADE, R.C.P.; MARQUES, I.M.R.; XAVIER, H.S.; OLIVEIRA, J.V. de Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.407-413, 2000.
- UCHOA-FERNANDES, M.A.; DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E. Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpaloides absoluta* (Meyr.) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.24, n.1, p.159-164, 1995.
- VARGAS, H. Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae). **Idesia**, v.1, p.75-110, 1970.
- VENDRAMIM, J.D. Uso de plantas inseticidas no controle de pragas. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA, 2., Campinas, 1997. **Anais**. Campinas:Fundação Cargill, 1997. p.64-69.
- VENDRAMIM, J.D.; SCAMPINI, P.J. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, v.72, n.2, p.159-170, 1997.

- VENDRAMIM, J.D.; THOMAZINI, A.P.B.W. Traça *Tuta absoluta* (Meyrick) em cultivares de tomateiro tratadas com extratos aquosos de *Trichillia pallida* Swartz. **Scientia Agricola**, v.58, n.3, p.607-611, 2001.
- VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M.W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J.T.B; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. (Org.). **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. cap.2, p.23-45. (Série de textos da Escola de Verão em Química, 3).
- WHEELER, D.A.; ISMAN, M.B. Effect of *Trichillia americana* extract on feeding behavior of Asian armyworm, *Spodoptera litura*. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, n.12, p.2791-2800, 2000.
- WHEELER, D.A.; ISMAN, M.B. Antifeedant and toxic activity of *Trichillia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.98, p.9-16, 2001.
- WHEELER, D.A.; ISMAN, M.B.; SANCHEZ-VINDAS, P.E.; ARNASON, J.T. Screening of Costa Rican *Trichillia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.347-358, 2001.
- XIE, Y.S.; ISMAN, M.B.; GUNNING, P.; MACKINNON, S.; ARNASON, J.T.; TAYLOR, D.R.; SÁNCHEZ, P.; HASBUN, C.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of extracts of *Trichillia* species and the limonoid hirtin against lepidoptera larvae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.22, n.2, p.129-136, 1994.