MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

DIVISÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA – DCEN

EFEITOS DE EXTRATOS DE *Casearia javitensis* KUNTH (SALICACEAE) SOBRE *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE)

ERNESTO AUGUSTO SILVA BARBOSA

Manaus, Amazonas

2015

ERNESTO AUGUSTO SILVA BARBOSA

EFEITOS DE EXTRATOS DE *Casearia javitensis* KUNTH (SALICACEAE) SOBRE *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE)

Orientadora: Dra. Beatriz Ronchi Teles

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Entomologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Biologia (Entomologia).

Manaus, Amazonas

2015

BANCA JULGADORA

Márcia Reis Pena
UFAM

José Wellington de Morais
INPA

Raimunda Liége de Souza de Abreu
INPA

BARBOSA, ERNESTO AUGUSTO SILVA BARBOSA

Efeitos de extratos de *Casearia javitensis* Kunth (Salicaceae) sobre *Sitophilus zeamai*s Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae)/Ernesto Augusto Silva Barbosa, Manaus: [s.n.], 2015. 52 f.
Dissertação (mestrado) – INPA, Manaus, 2015
Orientadora: Beatriz Ronchi Teles

Área de concentração: Entomologia.

1. Canela-de-velho, 2. Bioensaios, 3. Gorgulho-do-milho, 4. Inseticida vegetal.

Sinopse:

Foi avaliado a bioatividade de extratos orgânicos e aquosos de *Casearia javitensis* sobre adultos de *Sitophilus zeamais* por meio de bioensaios de mortalidade.

Palavra-chave:

Canela-de-velho, Bioensaios, Gorgulho-do-milho, Inseticida vegetal.

Dedico este trabalho a minha família. À minha filha Ana Laísa e à minha esposa Janaina, a elas atribuo total inspiração para realização deste. Aos que me amam apesar da distância e me deram total confiança, meus pais, Roldão Ribeiro Barbosa e Maria de Lourdes Silva Barbosa, e meus irmãos Gabriela e Raoni Silva Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e aos queridos professores, pelo apoio em minha formação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa.

A minha orientadora, Dra. Beatriz Ronchi Teles, pela confiança depositada em nosso trabalho, pelas lições, pelo apoio, pelo respeito e, sobretudo pela paciência. Tenho certeza que bons frutos serão colhidos dessa parceria ao logo dos anos.

À Cecília Verônica Nunez por ceder material vegetal para os bioensaios, os equipamentos para obtenção dos extratos e entre outras preciosas colaborações.À Universidade Federal do Amazonas, por conceder permissão para a coleta realizada em seu campus.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Agrícola, Bruno, Malu, Vivian, Vivi e Lucivânia, por me acolherem com carinho.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção em especial ao Yuri, Vanessa, Sabrina, David, Maite, Fabiele, Carol e Bel, que ajudaram e me ensinaram a utilizar os equipamentos para obter os extratos.

Aos queridos colegas da minha turma de mestrado, Juliana, Bruno, Eurico, André, Gustavo, Dayse, Marcus, José e Tohnson, pela amizade, descontração e aprendizado. E a toda galera do INPA, do porteiro aos pós-doutorandos, só tenho a agradecer pela simpatia e pelo respeito.

Agradecimentos especiais a todos aqueles que mesmo sem saber contribuíram com este trabalho, das mais diversas formas: Juciane, Flávio e a princesinha Sarah, filha deles, que me acolheram em sua casa tão logo que cheguei a Manaus .

Aos meus queridos amigos de Caxias-MA, Kayky, Maxcilene, Dona Creusa, Cássio Lauande, Erla, Joelma, Mery Jouse e Naura entre outros pelo grande incentivo.

Aos meus irmãos do Caminho Neocatecumenal, em especial ao Robson, Graça, Amanda e Dona Socorro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Ao longo de milhões de anos de ação da seleção natural, determinadas características vegetais foram aprimoradas e resultaram em espécies de plantas com diferentes níveis de suscetibilidade ao ataque de insetos herbívoros. Tais características são expressas de diferentes formas, entre estas, plantas capazes de produzir substâncias com propriedades inseticidas. É possível que exista cerca de duas mil plantas que apresentam possibilidades de uso no controle de organismos prejudiciais a agricultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade inseticida de extratos orgânicos e aquosos de *Casearia javitensis* em diferentes concentrações sobre *Sitophilus zeamais* em condições de laboratório. Os extratos utilizados nos bioensaios foram concentrados em rota-evaporador (extratos orgânicos) e aparelho liofilizador (extratos aquosos). Neste trabalho, foram utilizados seis tipos de extratos de *C. javitensis* que foram testados sob dois tipos de exposição, totalizando 12 bioensaios. Os dados foram analisados por testes de comparações múltiplas e por meio de regressão linear. Os extratos mais promissores foram: extratos aquosos de galhos e folhas, ambos em bioensaios de contato; e extratos diclorometânicos de galhos em bioensaios de ingestão. Entre os extratos diclorometânicos, a concentração com maior efetividade no controle de *S. zeamais* é 10,4 mg/ml de extrato de galhos aplicados através de ingestão de grãos contaminados, mortalidade registrada de 52%.

.

ABSTRACT

Over millions of years of action of natural selection, certain plant characteristics were improved and resulted in plant species with different levels of susceptibility to attack by herbivorous insects. These characteristics are expressed in different ways, among these, plants can produce substances with insecticidal properties. There may be about two thousand plants which have their uses in the control of organisms harmful to agriculture. The use of plant extracts in storage environments aims to decrease in all stages of development of individuals in the population causing damage. The objective of this study was to evaluate insecticidal activity of organic and aqueous extracts of *Casearia javitensis* in different concentrations on *Sitophilus zeamais* in laboratory conditions. The extracts used in the bioassays were concentrated on rota-evaporator (organic extracts) and freeze dryer apparatus (aqueous extracts). In this work, we used six types of C. javitensis extracts that have been tested under two types of exposure, totaling 12 bioassays. The data were analyzed by means of multiple linear regression comparison test. The most promising extracts were aqueous extracts of leaves and branches, both in contact bioassays; and dichloromethanic extracts branches in intake bioassays. Among dichloromethanic extracts, concentration more effectively in control of *S. zeamais* is 10.4 mg / ml extract branches applied through ingestion of contaminated grains, registered mortality of 52%.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pipeta automática (1,0 ml) utilizada nas diluições.....28

Figura 2. Determinação das concentrações a partir da solução estoque.....29

Figura 3. Procedimento seguido para montagem dos bioensaios de mortalidade por contato com superfície contaminada.....30

Figura 4. Placa de Petri com papel (a), aplicação dos extratos (b) e placa de Petri tampada.....31

Figura 5. Desenho amostral dos bioensaios de contato com superfície contaminada por extratos de *Casearia javitensis*. C1 a C5 são as concentrações testadas.....31

Figura 6. Procedimento seguido para montagem dos bioensaios de mortalidade por ingestão de grãos tratados por extratos de *Casearia javitensis*.....32

Figura 7. Grãos de milho pesados em balança de precisão (a), aplicação do extrato sobre os grãos (b) e etapa final de montagem do experimento (c)..... 33

Figura 8. Desenho amostral dos bioensaios de ingestão de grãos tratados por extratos de *Casearia javitensis*. C1 a C5 são as concentrações testadas.....33

Figura 9. Relação entre mortalidade de *Sitophilus zeamais* e extratos aquosos de folhas de *Casearia javitensis* aplicados sobre superfície contaminada. Onde: 0 = controle; 1 = 1,3 mg/ml; 2 = 6,5 mg/ml; 3 = 4,62 x 10^{-2} mg/ml; 4 = 15,6 mg/ml; 5 = 21,74 mg/ml.....39

Figura 10. Relação entre mortalidade de *Sitophilus zeamais* e extratos aquosos de galhos de *Casearia javitensis* aplicados sobre superfície contaminada. Onde: 0 = controle; 1 = 0,83 mg/ml; 2= 4,144 mg/ml; 3= 6,64 mg/ml; 4= 9,97 mg/ml; 5 = 13,88 mg/ml..... 40

Figura 11. Relação entre mortalidade de adultos de *S. zeamais* e concentrações progressivas de extratos diclorometânicos de galhos de *C. javitensis* testados através de ingestão de grãos de milho contaminados. Onde: 0 = controle; 1 = 2 x 10^{-4} mg/ml; 2 = 3,1 x 10^{-3} mg/ml; 3 = 4,62 x 10^{-2} mg/ml; 4 = 6,9 x 10^{-1} mg/ml; 5 = 10,4 mg/ml.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento dos extratos aquosos de Casearia javitensis.....27

Tabela 2. Rendimento dos extratos orgânicos de Casearia javitensis.....28

Tabela 3. Conversão das porcentagens de mortalidade em níveis de toxicidade....34

Tabela 4. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de contato com papel filtro contaminado por extratos de folhas de *Casearia javitensis*.....35

Tabela 5. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de ingestão de grãos de milho tratados com extratos de folhas de *Casearia javitensis*.....36

Tabela 6. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de contato com papel filtro contaminado por extratos de galhos de *Casearia javitensis*.....37

Tabela 7. Mortalidade *Sitophilus zeamais* em bioensaios de ingestão de grãos tratados com extratos de galhos de *Casearia javitensis*.....38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
1.1.Sitophilus zeamais Moltschulsky.....12
1.2. Extratos botânicos como método de controle de insetos.....13
1.2.1. Controle de *S. zeamais* por meio de extratos botânicos.....17
1.2.2. Bioatividade de espécies da família Salicaceae.....20
1.2.2.1. *Casearia javitensis* Kunth.....21

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.....23
2.2. Objetivos Específicos.....23

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação estoque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky.....24
3.2. Obtenção das plantas inseticidas.....25
3.2.1.Local de Coleta.....25
3.2.2. Método de Coleta.....25
3.3. Obtenção dos Extratos.....25
3.3.1. Extratos Aquosos.....25
3.3.2. Extratos Orgânicos.....26
3.4. Concentrações Obtidas Através de Diluições.....28
3.5. Bioensaios.....29
3.5.1. Mortalidade por Contato em Superfície Contaminada.....29
3.5.2. Mortalidade por ingestão de Grãos Tratados.....32
3.6. Análise de Dados.....34

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos Bioensaios de Mortalidade.....35
4.2. Análise de Correlação.....39

5. DISCUSSÃO.....42

6. CONCLUSÕES.....45

7. REFERÊNCIAS.....46

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Sitophilus zeamais* Moltschulsky

Sitophilus zeamais Mothschulsky, o gorgulho-do-milho, foi descrito em 1855, e classificado inicialmente dentro família Curculionidae, entretanto existem trabalhos sugerindo uma reclassificação dentro da família Dryophitoridae. Aparentemente, ainda não existe consenso, e muitos trabalhos continuam a classificá-lo como Curculionidae. Esta praga é comumente confundida com outra praga de grãos armazenados, *S. oryzae* (gorgulho-do-arroz), devido à aparência externa, o tamanho e por infestar também grãos-de-milho. As duas espécies podem ser encontradas infestando um mesmo local, e aparentemente sem conflitos, pois as duas espécies são encontradas quase que na mesma proporção. Isto poderia ser explicado pela abundância de recursos alimentares que pó.

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de propor uma técnica para diferenciar estas espécies de curculionidae. Em 1961, Kuschel propôs a diferenciação das espécies através de caracteres das genitálias do macho e da fêmea (Tavares 2006). HunKapiller e O'Donnell (1967), propuseram a separação taxonômica através da morfologia da cápsula cefálica das larvas de *Sitophilus*.

Os adultos de *S. zeamais* medem cerca de 3,0 mm de comprimento, são de coloração castanho-escura, com manchas avermelhadas nos élitros. O aparelho bucal é modificado em rostro, com mandíbulas mastigadoras. Nos machos o rostro é mais longo do que nas fêmeas. No pronoto são facilmente observadas pontuações e os élitros são densamente estriados. (Lorini e Schneider 1994).

O ciclo de vida completo de *S. zeamais* varia de 142 dias para os machos e 140 dias para fêmeas. O tempo de desenvolvimento entre a fase de ovo até a fase adulta dura em média 34 dias. Uma fêmea pode produzir em média 282 ovos ao longo da vida, porém apenas 27% se desenvolvem até a emergência dos adultos. (Santos e Fontes 1990)

No Brasil, *S. zeamais* é considerada umas das principais pragas de grãos armazenados, sobretudo, por possuir elevado potencial biótico, infestação cruzada

(capacidade de infestar tanto no campo quanto nos armazéns), elevado número de hospedeiros e pelo fato de tanto as larvas quanto os adultos serem potenciais causadores de danos. Estes ainda contaminam os grãos com seus resíduos, além de abrirem caminho para outros insetos e patógenos (Caneppele *et al.* 2003; Gallo *et al.* 2002). Os danos podem ser qualificados de duas formas: quantitativos e qualitativos. Os danos qualitativos se caracterizam por perdas no valor nutritivo, na aparência e uniformidade dos grãos e desvalorização do produto pela presença de orifícios. Os quantitativos estão relacionados com a perda de peso e diminuição da massa e água no interior do grão (Gallo *et al.* 2002; Anderson *et al.* 1990). Acredita-se que esta praga tenha como origem a Índia e atualmente está presente em todo o mundo, especialmente abundante em regiões tropicais (Tavares 2002).

Países que cultivam grãos enfrentam diversos problemas no período pós-colheita, principalmente na região tropical. Geralmente os grãos são estocados em depósitos ou armazéns antes de serem distribuídos aos compradores, ficando suscetíveis ao ataque de pragas caso não se adotem medidas preventivas. Infestações causadas por pragas de grãos armazenados são os maiores responsáveis pelas perdas neste tipo de cultivo (Lazzari e Lazzari 2009). Segundo Sinhá (1995), aproximadamente 10% dos grãos impróprios para uso são danificados por pragas.

1.2. Extratos botânicos como método de controle de insetos

Atualmente, no Brasil, como no resto do mundo, há um enorme investimento econômico em pesquisas tecnológicas que incrementam a produtividade agrícola, visando o aumento da produção de grãos (Martins e Farias 2002). No entanto, o aumento da produção resultante desses esforços tem sido anulado em virtude das significativas perdas ocorridas pelo ataque de pragas. Os prejuízos podem ocorrer desde a fase pré-colheita até a fase de armazenamento. As pragas são responsáveis em grande parte pela diminuição na produção agrícola, no Brasil as perdas por esse tipo de problema podem chegar a 20% da produção anual de grãos (Ribeiro 2010; Tavares e Vendramim 2005).

Os cuidados no armazenamento é que irão manter a qualidade dos grãos para futura comercialização (Embrapa 2012; Vilarinho 2012). Dentre os vários tipos de mecanismos para evitar as perdas, o controle químico é o mais largamente e historicamente utilizado. Durante várias décadas, desde a 2ª Guerra Mundial até o início dos anos de 1990, sua aplicação se tornou praticamente indispensável. Tido como o único método de controle de pragas agrícolas rentável, de fácil manejo e altamente efetivo. Entretanto, pesquisas posteriores revelaram que seus malefícios aos seres vivos e ao meio ambiente prevaleciam sobre os benefícios (Santos 1993; Santos *et al.* 2009). As aplicações com inseticidas químicos realizados de forma descontrolada resultaram em uma série de impactos negativos, como mortalidade de organismos não-alvos (por exemplo, polinizadores e inimigos naturais das pragas), insetos resistentes, além da acumulação de resíduos tóxicos no meio ambiente e alimentos consumidos por animais e pelo homem (Bogorni e Vendramim 2003).

Devido a pressões de organizações, mídia e governos (que anteriormente subsidiavam os inseticidas químicos), o uso dessas substâncias passou a ser controlado ou mesmo proibido. Assim, pesquisas têm buscado métodos alternativos ao controle de pragas, mas com impactos reduzidos a natureza e ao homem (Roel e Vandramim 2006).

Atualmente as plantas com substâncias inseticidas representam um considerável recurso para o controle alternativo de pragas, doenças e invasoras, porém esta informação é desconhecida pela maioria dos agricultores (Almeida *et al.* 1999). Os inseticidas derivados de produtos naturais já foram muito utilizados até 1940, porém caíram em desuso com a popularização dos inseticidas químicos após a 2ª Guerra Mundial (Soares 2010).

Ao longo de milhões de anos de ação da seleção natural, determinadas características vegetais foram aprimoradas e resultaram em espécies de plantas com diferentes níveis de suscetibilidade ao ataque de insetos herbívoros. Tais características são expressas de diferentes formas, entre estas, plantas capazes de produzir substâncias com propriedades inseticidas (Regnault-Roger 1997; Fazolin *et al.* 2007).

Estas substâncias são liberadas pelo metabolismo secundário das plantas que estão intimamente ligadas às estratégias de defesa vegetal, seja contra o

ataque de animais herbívoros, contra infecção microbiana ou mesmo, para proteger as plantas contra os raios ultravioletas. Os metabólitos secundários são considerados compostos com potente atividade biológica (Dewick 2009; Mann *et al.* 1994), que quando liberados causam mudanças fisiológicas e/ou comportamentais em outros organismos (Corrêa e Sant'Ana 2007).

Nos insetos, os metabólitos secundários podem inibir a alimentação e a oviposição, provocar esterilização, e interferir no desenvolvimento, sem necessariamente causar a morte do inseto. As substâncias inseticidas presentes nos extratos vegetais podem ser encontradas em diversas partes da planta, desde a raiz até as flores e frutos, incluindo resinas e óleos essenciais (Medeiros 1990; Lacher 2000).

Algumas substâncias botânicas têm atividade inseticida conhecida, tais como, piretrinas (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), rotenona (*Lonchocarpus nicou*), nicotina (*Nicotiana tabacum*), cevadina (*Veratrum album*), rianodina (*Ryania speciosa*), quassinoides (*Quassia mara, Q. acutuan*), azadiractina (*Azadirachta indica*) e biopesticidas voláteis. Estes últimos são, normalmente, óleos essenciais presentes nas plantas aromáticas (Isman 2000).

O emprego de substâncias extraídas de plantas com poder inseticida apresenta vantagens quando comparados aos inseticidas químicos. As substâncias produzidas pelas plantas são rapidamente degradadas (não se acumulando no meio natural), ação rápida, baixa toxicidade a mamíferos (não são tóxicos ao ser humano, quando a Concentração Letal mediana-CL_{50} tem como alvo os insetos), seletividade (geralmente menos danosos a insetos benéficos) e baixa fitotoxicidade. Entretanto essas substâncias apresentam algumas desvantagens, pois se ele apresenta uma rápida degradação, deverá ocorrer um maior número de aplicações para se obter um controle satisfatório do inseto alvo. Além disso, alguns inseticidas vegetais podem ser tóxicos a insetos não-alvo e peixes, como é o caso da rotenona e da nicotina. Também, os compostos podem variar conforme a espécie e variedade da planta, elementos climáticos (como luz, temperatura, umidade relativa e chuvas). E finalmente, a falta de dados de pesquisa quanto a efeitos secundários e toxicidade crônica. (Moreira *et al.* 2005).

Guerra (1985) afirma existir cerca de duas mil plantas que apresentam possibilidades de uso no controle de organismos prejudiciais a agricultura e destaca a importância desta área de pesquisa.

Dentre as famílias botânicas as espécies de Meliaceae (ordem Sapindales) vêm se destacando devido as suas propriedades inseticidas, tanto pelo número de insetos sobre os quais atuam quanto pela eficiência de seus extratos (Vendramim1997). Entre as meliáceas, *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como “nim”, tem mostrado resultados promissores e seus extratos têm sido reportados como tão potentes quanto inseticidas sintéticos (Vacari *et al.* 2004).

Outras famílias botânicas que se destacam são Lamiaceae (Labiatae), Umbelliferae, Asteraceae (Compositae), Lauraceae, Asteraceae, Annonaceae, Canellaceae e Rutaceae. Das famílias citadas, algumas são facilmente encontradas, e todas se destacam como promissoras para o desenvolvimento de novos inseticidas de origem vegetal (Oliveira 1997; Jacobson 1989; Miana *et al.* 1996)

As plantas inseticidas podem ser empregadas na forma de pós, extratos aquosos ou orgânicos (acetônico, hexânico, clorofórmico, metanólico etc.) e óleos (fixos ou essenciais). Para obtenção dos extratos aquosos, após a coleta, a secagem e moagem, os pós são submetidos à imersão em água (a frio ou a quente), homogeneização e extração propriamente dita (por aproximadamente 24 horas) e filtração (com a utilização de um tecido fino, peneira ou papel filtro). Existem diferentes formas para obtenção de extratos orgânicos provenientes de plantas. Para preparo destes extratos, uma das técnicas que pode ser utilizada é, após a secagem do material vegetal, a imersão deste em solvente (hexano, metanol, diclorometano), com posterior filtragem, evaporação a vácuo e concentração dos extratos (Tavares 2006).

A eficiência de um extrato vegetal no controle de pragas em alguns casos poderá estar associada à forma como ele é aplicado sobre o inseto, e o método de exposição a ser empregado por sua vez deve levar em conta a biologia do inseto (estágio de desenvolvimento, tempo de vida, etc.). Existem vários métodos de exposição às toxinas encontradas nos extratos vegetais. Muitos insetos são mais suscetíveis a ação das toxinas vegetais quando administrados através de ingestão (na forma de pós, óleos essenciais ou extratos líquidos aplicados sobre fonte

nutricional). Outros são mais sensíveis ao contato com superfície de um substrato impregnado ou em contato direto com a pele.

1.2.1. Controle de *S. zeamais* por meio de extratos botânicos

O uso de extratos vegetais em ambientes de armazenamento tem por objetivo a diminuição de todos os estágios de desenvolvimento dos indivíduos da população causadora de dano (Gallo *et al.* 2002). Nesse sentido, estudos abordando preparados vegetais via de intoxicação por contato (aplicação em substrato impregnado ou sobre o inseto/tópica), ingestão (aplicação do extrato sobre a fonte nutricional do inseto) ou fumigação (exposição por meio de vapor ou gás) contra adultos de *S. zeamais* e outras pragas de grãos armazenados já, vêm sendo realizados. Os resultados indicam que os adultos tendem a ser mais suscetíveis que os estágios de ovo e pupa, devido sua exposição ao ambiente externo, o que não ocorre com os estágios iniciais que se encontram protegidos no interior do milho (Rajendran e Sriranjini 2008).

Estrela *et al.* (2006) testaram a toxicidade de espécies de Piperaceae, *Piper hispidinervum* e *P. aduncum* sobre *S. zeamais*, obtendo o resultado que ambos são eficientes no controle do gorgulho dependendo da forma de aplicação. *P. hispidinervum* mais eficiente quando a via de intoxicação é por superfície de contato, enquanto que *P. aduncum* é mais eficaz quando a via de intoxicação é por fumigação e por contato por aplicação tópica.

Oliveira *et al.*(2012) testaram extratos aquosos e orgânicos de *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) e *Vitex cymosa* (Vebenaceae) sobre *S. zeamais,* e obtiveram os seguintes resultados: Extratos metanólicos dos galhos de *V. cymosa* interferiram em mais de 40% na sobrevivência dos adultos pelo método de ingestão, e diminuir em 40% o número de indivíduos na primeira geração F1, atuando como redutor de infestação de *S. zeamais*.

Almeida *et al.* (2013), testaram extratos hidroalcoólicos de *Mormodica charantia* (Curcubitaceae) e *Capsicum baccatum* (Solanaceae) sobre *S. zeamais*

através de fumigação, e obtiveram de *C. baccatum* mortalidade próximo a 100% a partir de 4 ml de dose.

Ashamo *et al.* (2014), analisaram extratos aquosos de quatro espécies vegetais, onde três delas- *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae), *Aristolochia ringens* (Aristolochiaceae), *Colocasia esculenta* (Araceae) - exibiram taxa de mortalidade de *S. zeamais* próxima a 100% após 24 horas da aplicação dos tratamentos através de contato por superfície contaminada.

Kim e Lee (2014) testaram óleos essenciais de *Citrus x sinensis* (Rutaceae) e *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) sobre duas pragas de grãos armazenados. Os óleos essenciais de *C.x sinensis*, em *S .zeamais* a CL_{50} para aplicação tópica foi de 0,074 mg/adulto e por fumigação foi 0,106 mg/ml. Em *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae), para aplicação tópica foi de 0,257 mg/adulto e por fumigação foi 0,130 mg/ml. Com *O. basilicum*, em *S. zeamais* a CL_{50} para aplicação tópica foi de 0,130 mg/adulto e por fumigação foi 0,014 mg/ml. Em *T. castaneum*, para aplicação tópica foi de 0,361 mg/adulto e por fumigação foi 0,020 mg/ml.

Lawal *et al.* (2015), analisaram extratos de folhas de *Chromolaena odorata* (Asteraceae) com diferentes solventes sobre *S. zeamais*, em experimentos de contato em superfície contaminada. O mais eficiente foi extrato metanólico, cuja concentração que obteve a CL_{50} foi 39,13 µg/ml, seguido de etil-acetato com 46,63 mg/ml, e clorofórmio com 155,14 mg/ml e hexano com 372,61 mg/ml.

Napoleão *et al.* (2013), alisaram efeitos deletérios de folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) na forma de pós, ingeridos por *S. zeamais*. A concentração que ocasionou 50 % de mortalidade sobre os gorgulhos foi 72,4 mg/g (extrato/farinha de trigo) após sete dias.

Ogendo *et al.* (2008), testaram o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) e dois de seus constituintes,através de fumigação, sobre cinco espécies de pragas de grãos armazenados, entre eles *S. oryzae*. O óleo essencial na concentração de 1µl/L foi responsáveis por causar quase 100% de mortalidade sobre *Rhyzopertha Dominica* (Bostrychidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Silvanidae) e *Calosobruchus chinensis* (Chrysomelidae) após 24 horas, entretanto, *S. oryzae*

(Curculionidae) e *T.* castaneum foram mais tolerantes com 94% e 23% de mortalidade após 168 horas.

Ribeiro *et al.* (2014), analisaram extratos de várias estruturas vegetais de *Annona montana* (Annonaceae), *Aristolochia paulistana* (Aristolochiaceae) e *C. sylvestris* (Solanaceae) através de grãos contaminados ingeridos por *S. zeamais*. Os extratos hexânico e diclorometânico de semente de *A. montana* foram os mais efetivos, para a concentração de 1,5 mg/kg observadas às seguintes médias: 100% de mortalidade após 10 dias; 0,5 insetos emergidos após 60 dias; 2,7 de grãos danificados.

Santos *et al.* (2014), analisaram extratos com diferentes solventes de várias estruturas vegetais de *Montrichardia linifera* (Araceae) sobre *S. zeamais*. O extrato hexânico de folhas apresentou atividade inseticida dose-dependente.

Savaris *et al.* (2014), analisaram extratos e óleos essenciais das folhas de *Cunila angustifólia* (Lamiaceae), através de contato por superfície contaminada, sobre *S. zeamais*. O óleo essencial apresentou resultados promissores, entretanto os extratos orgânicos e aquosos não demonstraram efetividade.

Suleiman *et al.* (2014), analisaram três espécie de temperos *Allium sativum* (Amaryllidaceae), *Capsicum frutecens* (Solanaceae) e *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) através de pós misturados ao sorgo ingeridos por *S. zeamais*. As três espécies demonstraram alta toxicidade sobre o gorgulho, provocando 100% de mortalidade em todos os bioensaios.

Temitope (2014) analisou extratos de folhas de três espécies de plantas medicinais, *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *C. x cinensis* e *Psidium guajava* (Myrtaceae) sobre *S. zeamais*, através de ingestão de grãos de milho tratados com pós. Ainda que as três espécies não tenham apresentado atividade inseticida, as toxinas destas demonstraram afetar *atividade* fisiológica normal dos insetos, ao impedir o acasalamento e oviposição

Martins *et al.* (2014), por meio de análises com extratos orgânicos e aquosos de diferentes estruturas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae), em testes de ingestão de grãos e superfície contaminada sobre *S. zeamais*, mostraram que

extratos *metanólicos* dessa planta possuem toxicidade moderada sobre os gorgulhos-do-milho.

Wei *et al.* (2014), analisaram extratos orgânicos de *Illicium verum* (Illiciaceae) sobre *S. zeamais*, onde todos apresentaram alta toxicidade. O extrato etil-acetato foi o mais eficiente, apresentou CL_{50} com concentração de 21,2 µg/cm^2 após 72 horas de aplicação.

1.2.2. Bioatividade de espécies da família Salicaceae

Espécies da família Salicaceae são produtoras de um largo espectro de substâncias bioativas (Mosaddick *et al.* 2004), como as espécies do gênero *Ryania* que possuem substâncias tóxicas em todas as partes vegetais (Jefferies *et al.* 1992). A substância rianodina foi isolada da espécie *Ryania speciosa*, sendo que esta substância foi um dos primeiros produtos naturais utilizados como inseticidas (Roel *et al.* 2000). Alguns gêneros, tais como *Laetia*, *Casearia*, e *Zuelania*, contém ésteres de diterpenos clerodânicos, as quais apresentam atividade citotóxica e fagoinibitória (Beutler *et al.* 2000). Nos estudos realizados por Mosaddik *et al.* (2004), foram avaliados os extratos de vários gêneros de Salicaceae, como *Casearia costulata*, e *C. grewiifolia*, *C. grayi*, *C. multinervosa*, *Homalium brachbotrys*, *H. circumpinnatum*, *Scolopia braunii*, *Xylosma terrae-reginae*. Quanto a suas atividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, e atividades citotóxicas e antioxidantes, reforçando o interesse cada vez maior em pesquisas em áreas médico-farmacêuticas (Mosaddik *et al.* 2004). *C. sylvestris* tem sido bem trabalhada em estudos voltados aos efeitos antitumorais, antifúngicos, antibióticos, abortivos e de combate a úlceras (Silva *et al.* 1986, Basile *et al.* 1990, Barbosa *et al.* 1994, Bolzani *et al.* 1999).

O gênero *Casearia* tem se caracterizado pela ocorrência de substâncias de interesse, como cumarinas, flavonóides, lignanas, e diversos diterpenos, especialmente os clerodânicos, sendo estes últimos diretamente relacionados às atividades antiulcerogênica, citotóxica e anti-inflamatória apresentada pelos extratos dessas plantas (Silva *et al.* 2008; Tininis *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2005).

Alguns tipos de plantas medicinais servem de indício para estudos mais detalhados de busca à atividade inseticida. Por meio de estudos fitoquímicos, busca-se investigar e detectar classes de metabólitos com possíveis aplicações como inseticidas naturais. Uma variedade de substâncias químicas consideradas inseticidas e detectadas em uma determinada espécie vegetal podem ser encontradas em outras espécies de plantas. Tornando necessários bioensaios que comprovem ou não essa ação.

Dentro do manejo ecológico de pragas se busca a identificação de um extrato vegetal com uma concentração que diminua a população de insetos-praga a um nível que não cause danos à produção e principalmente que não afete o meio ambiente nem a população dos inimigos naturais (Webber 2009).

1.2.2.1. Casearia javitensis Kunth

A espécie *Casearia javitensis*, conhecida como caneleira, mata-calado ou canela-de-velho (região norte), era classificada dentro da família Flacourtiaceae, que foi extinta após a revisão da APG II (Angiosperm Phylogeny Group II) de 2003. , atualmente as espécies de *Casearia*, e outros 50 gêneros da extinta família, passaram a integrar a família Salicaceae, que passou a ter no total 57 gêneros.

C. javitensis possui porte arbóreo, folhas oblongas, com a base obtusa e borda do limbo serrilhada (Flora Brasiliensis 1871). Estas características são em fascículos axilares e sésseis, e as flores são monoclamídias e dialissépalas. O fruto é uma cápsula ovóide e subglobosa (Vasquez 2005). Ela é encontrada com grande frequência na região Amazônica, sendo também relatada sua ocorrência na floresta Atlântica, na restinga e no Cerrado da região nordeste do Brasil (Corrêa 2007; Costa *et al.* 2004). Buscando estudar a defesa foliar de espécies de restinga à herbivoria. Corrêa (2007) verificou, por meio de análises por cromatografia em camada delgada e reagentes reveladores, as seguintes classes de metabolitos para *C. javitensis*: quercetina, proantocianidinas, saposídeos, triterpenos e esteróides. Tais metabólitos foram registrados em outras espécies de planta e são de reconhecida atividade inseticida.

Comandolli-Wyrepkowski (2010) estudou a fitoquímica e avaliou a bioatividade de extratos orgânicos e aquosos de *C. javitensis,* e detectou uma forte atividade antimicrobiana sobre a bactéria *Aeromonas hydrophila* com extratos polares (aquoso e MeOH), além de baixa atividade citotóxica sobre *Artemia salina* (Crustacea), organismo este muito sensível a variações no ambiente. E ainda, verificou que esses extratos, aquoso e MeOH, apresentaram poteciais antioxidante, que pode ser devido à possível maior concentração de substâncias fenólicas.

Os compostos fenólicos possuem diferentes efeitos sobre os insetos e outros seres herbívoros em geral, atuam como deterrentes (dificultam a absorção de nutrientes) do consumo foliar, inibidores de consumo foliar e formadores de radicais livres (um dos responsáveis pelo envelhecimento celular, multiplicação desordenada de células) (Appel 1993).

C. javitensis foi escolhida para este trabalho por a considerarmos como uma espécie promissora para bioatividade inseticida, quando consideramos a sua composição química. Ainda que, até o momento, não se encontre qualquer estudo que relate qualquer tipo de reação sobre *Sitophilus zeamais* ou a outro inseto. Destaca-se a importância de se utilizar uma planta adaptada totalmente ao Bioma Amazônico, caso no futuro, esta planta venha a ser empregada em um manejo integrado de praga, seja possível plantar e produzir em larga escala seus extratos com finalidade de suprir a demanda para a região.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade inseticida de extratos orgânicos e aquosos de *Casearia javitensis* em diferentes concentrações sobre *Sitophilus zeamais* em condições de laboratório.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar o modo de aplicação/exposição mais eficiente (contato ou ingestão) para cada tipo de extrato de C. javitensis testado no controle de *S. zeamais*
- Identificar a concentração mais eficiente de cada extrato de *C. javitensis* no controle de *S. zeamais*
- Determinar os extratos de *C. javitensis* mais promissores no controle de S. zeamais

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação estoque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky

Todos os adultos de S. zeamais utilizados nos ensaios foram provenientes de criação-estoque mantida no Laboratório de Entomologia Agrícola do INPA. Com frequência a criação-estoque original recebe indivíduos selvagens com objetivo de obter uma maior heterogeneidade genética da população de S. zeamais.

Os indivíduos foram criados em potes de vidro de 14 cm de altura por 8 cm de diâmetro contendo milho (Zea mays L.) comercial, tipo duro, classe 2, devidamente vedados com tecido do tipo *Voile*, presos por ligas de elástico para evitar a fuga e permitir as trocas gasosas. Semanalmente essa criação foi vistoriada, e a manutenção foi feita adotando o seguinte procedimento: (a) retirada dos adultos com o auxílio de peneira (furos com abertura de 0,5 mm), (b) descarte dos indivíduos mortos e grãos inviáveis (padronizamos como inviável os grãos que tiveram boa parte da sua composição física consumida ou danificada), (c) limpeza do recipiente, (d) grãos viáveis introduzidos em novo recipiente e (e) os gorgulhos vivos foram reintroduzidos juntos a adultos selvagens em recipiente limpo com grãos de milho íntegros e sadios, para aumentar a variabilidade genética. Tal criação foi mantida com o objetivo de obter adultos entre 10 e 12 dias de idade em quantidade suficiente para a realização dos experimentos.

3.2. Obtenção das plantas inseticidas

3.2.1. Local de Coleta

Foi realizada uma coleta no mês de julho de 2014, município de Manaus, no Campus da Universidade Federal do Amazonas - UFAM (03°05'44"S, 59°58'24"W). A área do Campus da UFAM é constituída por floresta de platô, floresta aberta, campinarana, áreas de vegetação secundária e área antrópica (Silva-Forsberg 1999). A vegetação do Campus da UFAM é caracterizada como floresta secundária com um número grande de árvores jovens e espécies de trepadeiras de floresta primária (Prance 1975). Manaus tem clima do tipo "Am", quente e úmido ao longo de todo o ano (Classificação de Köppen).

3.2.2. Método de Coleta

A espécie vegetal foi coletada com a utilização de tesouras de poda. As plantas foram postas a secar em ambiente climatizado em temperatura de 20ºC± 2º e umidade relativa de 60%± 10%. A identificação das espécies vegetais foi realizada por pesquisadores da Coordenação de Pesquisas em Botânica do INPA e por meio de comparação com o material biológico depositado no herbário do INPA. A exsicata foi encaminhada ao herbário do instituto e depositada com respectivo número de registro 261559.

3.3. Obtenção dos Extratos

3.3.1. Extratos Aquosos

O preparo dos extratos foi feito com acompanhamento da equipe de pesquisa do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA, município de Manaus, Amazonas. Seguindo método adaptado de Tavares e Vendramim (2005),

após a coleta das folhas e os galhos de *C. javitensis* foram separados e transferidos para secagem em uma sala climatizada, com temperatura média de 20ºC± 2º, umidade relativa de 60%± 10%, abrigada de luz solar. Este procedimento visava à retirada do excesso de umidade com objetivo de evitar sua deterioração pelos fungos. Após cerca de uma semana as folhas e galhos foram pré-cortados em pedaços menores para que em seguida fossem moídos separadamente, até se obter um fino pó de cada estrutura. Em seguida, cada um foi depositado em balão de Erlenmeyer (1,0 L de capacidade) e imersos em água destilada (quantidade suficiente para cobrir todo o pó). Os recipientes foram encaminhados para máquina de ultrassom cuja função foi acelerar a ação de retirada de substâncias químicas do pó pela substância solvente (neste caso, a água destilada) por 20 minutos a frio e depois a substância foi filtrada por meio de papel-filtro. Este processo é feito em triplicata. Posteriormente, os extratos são depositados em um *ultrafreezer* a -80ºC por pelo menos 24h. Só depois foram concentrados em liofilizador (onde ocorre a retirada da água, que passa da fase da fase sólida para a gasosa através de vácuo, deixando apenas o extrato vegetal bruto). Os rendimentos de todos os extratos aquosos foram detalhados na (Tab. 1).

TABELA 1. Rendimento dos extratos aquosos de *Casearia javitensis.*

Extrato	Rendimento
Folhas	1,2 g
Galho	1 g

3.3.2. Extratos Orgânicos

Os extratos orgânicos de *C. javitensis* utilizados nos bioensaios já se encontravam preparados, e foram cedidos para este trabalho pela Dr. Cecília Verônica Nunez (Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA). Este material foi proveniente de coletas efetuadas na Reserva Ducke entre os anos de 2005 e 2008, e se encontravam congelados em ultrafreezer a temperatura constante de -80°C. A exsicata foi depositada no herbário do INPA, como material testemunha, sob o número de registro 230759. A quantidade de material cedido também está descrito na Tabela 3.

Os solventes utilizados na extração foram metanol (MeOH) e diclorometano(DCM). A preparação dos extratos seguiu a ordem crescente de polaridade dos solventes: DCM e MeOH. Cada extração foi realizada em triplicata usando ultrassom (a frio) por 20 minutos. Após a filtragem, os extratos orgânicos foram concentrados em rota-evaporador. Após o preparo, os extratos foram acondicionados em freezer a -20°C (Tab. 3).

TABELA 3. Rendimento dos extratos orgânicos de *Casearia javitensis.*

EXTRATO	RENDIMENTO
Folha/DCM	0,169 g
Folha/MeOH	0,370 g
Galho/DCM	0,156 g
Galho/MeOH	0,370 g

3.4. Concentrações Obtidas Através De Diluições

Utilizou-se a fórmula da Diluição de Soluções para se determinar todas as concentrações em cada um dos bioensaios.

Fórmula da Diluição de Soluções

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Após o pré-estabelecimento das concentrações procedeu-se as diluições utilizando-se uma pipeta de precisão (Fig. 1) para se determinar a quantidade exata de solvente e de extrato bruto que foi colocado em cada recipiente para se obter as diferentes concentrações.

Figura 1: Pipeta automática (1,0 ml) utilizada nas diluições dos extratos brutos.

Os recipientes onde ocorreram as diluições foram previamente esterilizados para evitar qualquer tipo de contaminação. Todas as concentrações foram obtidas a partir da solução estoque que era composta pelo extrato bruto (compostos químicos extraídos das plantas e concentrados por liofilizador ou rota-evaporador) diluído em substância solvente, que para todos os efeitos eram consideradas como a concentração 100% (Fig. 2).

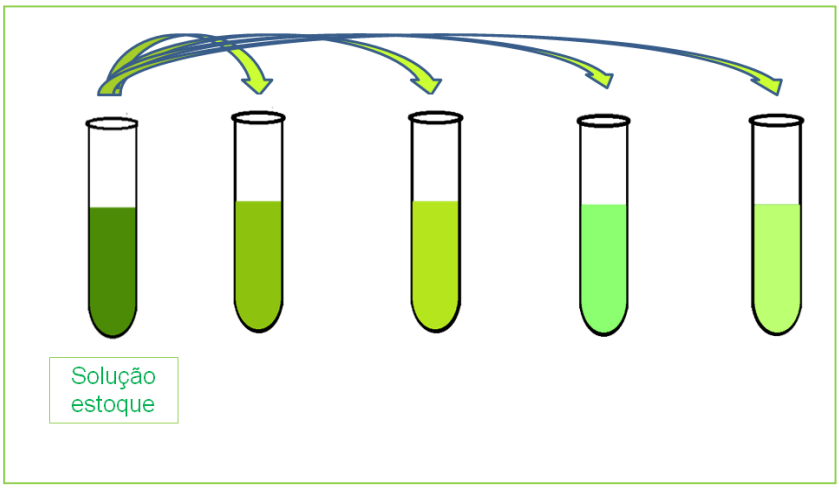

Figura 2. Determinação das concentrações a partir da solução estoque

3.5. Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Agrícola, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA; obedecendo as condições de temperatura de 25°C ± 2°C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fótofase de 12 horas como proposto por Tavares e Vendramim (2005).

3.5.1. Mortalidade por Contato em Superfície Contaminada

Os ensaios de exposição de via respiratória seguiram a metodologia proposta por Huang *et al.* (1997; 1998) com modificações de Tavares e Vendramim (2005). Foram utilizados extratos metanólicos de galhos e folhas, extratos diclorometânicos de galhos e folhas e extratos aquosos de galhos e folhas. Em

placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro foram postos discos de papel filtro no fundo, depois, em cada placa foi inoculado 1,0 ml do extrato por meio de uma pipeta mecânica. O extrato foi cuidadosamente espalhado por toda a superfície do papel filtro, processo repetido em todas as outras placas, e em seguida as placas foram deixadas a secar em temperatura controlada de laboratório (25°C ± 2°C, umidade relativa de 60 ± 10 %) por uma hora. Após esse período, as placas de Petri receberam cada uma 20 adultos não-sexados de *S. zeamais* com 10 a 15 dias de idade. Em seguida, as placas foram tampadas, rotuladas e envolvidas com plástico filme de PVC (policloreto de vinila), para evitar a fuga de *S. zeamais*. Após cinco dias da aplicação do bioensaio foram contabilizados os indivíduos mortos (Fig. 3 e 4).

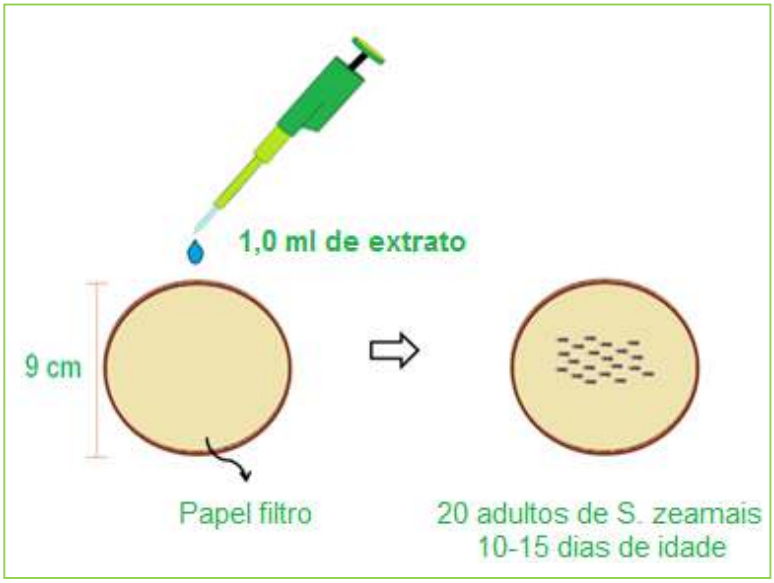

Figura 3. Procedimento seguido para montagem dos bioensaios de mortalidade por contato com superfície com'taminada por extratos de *Casearia javitensis*

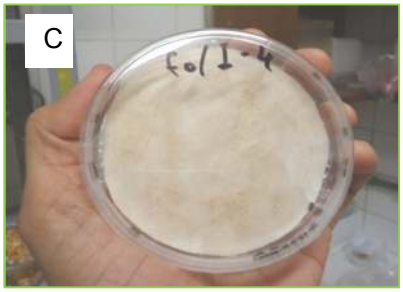

Figura 4. Placa de Petri com papel filtro (a), aplicação dos extratos (b) e placa de Petri tampada (c).

Para cada extrato foram testadas cinco concentrações por bioensaio. Para cada concentração foram feitas quatro repetições, igual número de repetições para os testes com o grupo controle. A montagem do experimento com grupo controle ocorreu tal como narrado no início deste tópico, diferindo apenas na substância utilizada para impregnar o papel filtro, ao invés de extrato, utilizou-se a substância solvente (ex.: em experimentos com extratos aquosos de galhos, a substância utilizada no controle foi a água destilada) (Fig. 5).

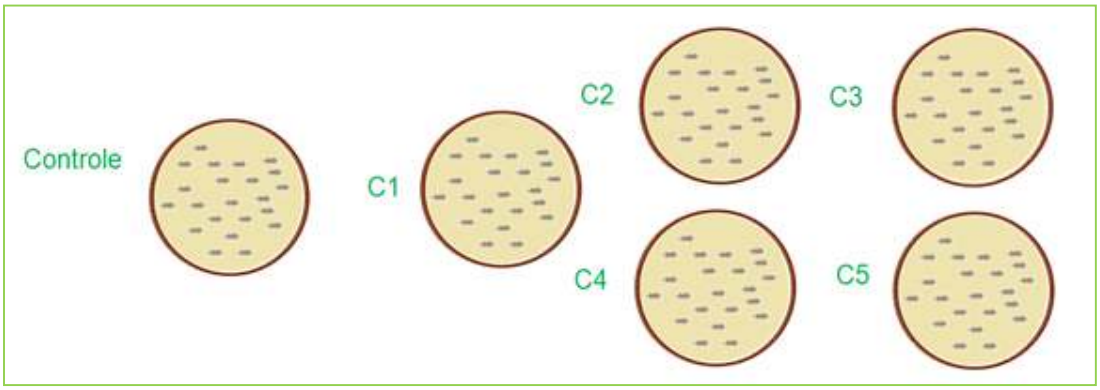

Figura 5. Desenho amostral dos bioensaios de contato com superfície contaminada por extratos de *Casearia javitensis.* C1 a C5 são as concentrações testadas

3.5.2. Mortalidade por Ingestão de Grãos Tratados

Os experimentos de ingestão tiveram base no trabalho realizado por Llanos *et al.* (2008). Foram utilizados extratos metanólicos de galhos e folhas, extratos diclorometânicos de galhos e folhas e extratos aquosos de galhos e folhas. Inicialmente os grãos de milho foram pesados dentro de potes de plástico de 500 ml de capacidade, onde em cada um foi depositado 20 g de grãos de milho, depois, em cada pote foi inoculado 2,0 ml do extrato por meio de uma pipeta mecânica. O extrato foi cuidadosamente espalhado sobre os grãos de milho, e depois, estes foram mexidos por um minuto até que as superfícies de todos os grãos tivessem contato com o extrato, processo repetido em todos os potes. Em seguida, os potes foram deixados a secar em temperatura controlada de laboratório (25 C ± 2°C, umidade relativa de 60 ± 10 %) por uma hora. Após esse período, os potes receberam, cada uma, 20 adultos não-sexados de *S. zeamais* com 10 a 15 dias de idade. Em seguida, os potes tiveram sua abertura vedada com tecido *voile*, o qual ficou preso com ajuda de uma tampa de plástico com abertura quadrangular de aproximadamente 2 x 2 cm. Essa vedação permitia que ocorresse a livre passagem de ar e impedisse a fuga de *S. zeamais.* Após 15 dias da aplicação do bioensaio foram contabilizados os indivíduos mortos (Fig. 6 e 7).

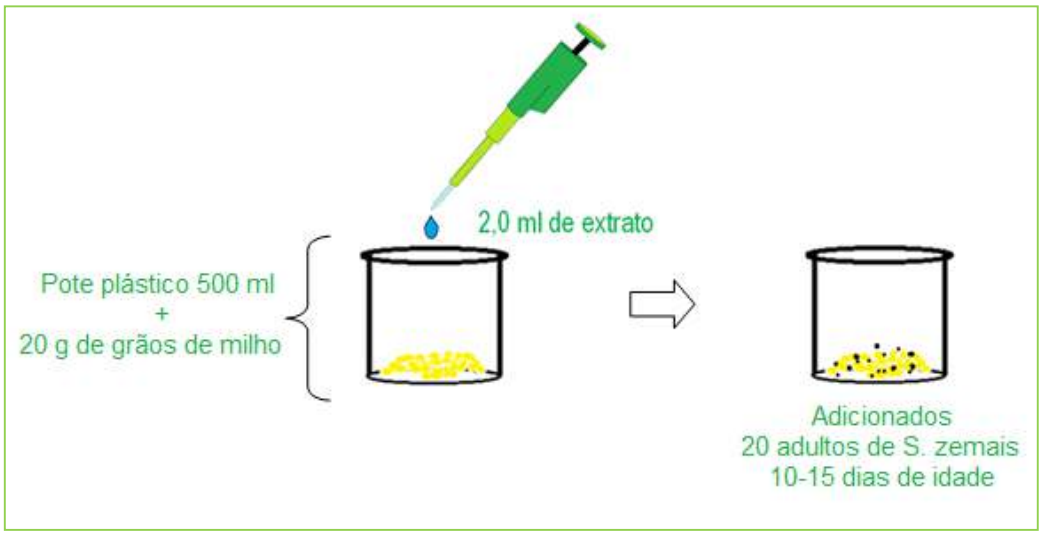

Figura 6. Procedimento seguido para montagem dos bioensaios de mortalidade por ingestão de grãos tratados por extratos de *Casearia javitensis*

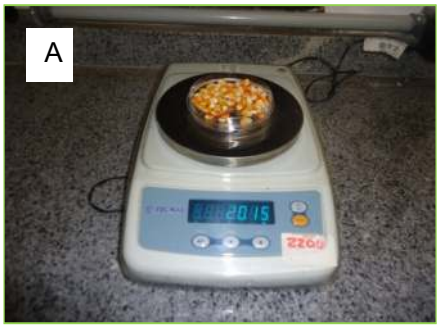

Figura 7. Grãos de milho pesados em balança de precisão (a), aplicação do extrato sobre os grãos (b) e etapa final de montagem do experimento (c).

Para cada extrato foram testadas cinco concentrações por bioensaio. Para cada concentração foram feitas quatro repetições, igual número de repetições para os testes com o grupo controle. A montagem do experimento com grupo controle ocorreu tal como narrado no início deste tópico, diferindo apenas na substância utilizada para impregnar o papel filtro, ao invés de extrato, utilizou-se a substância solvente (ex. em experimentos com extratos aquosos de galhos, a substância utilizada no controle foi a água destilada) (Fig.8).

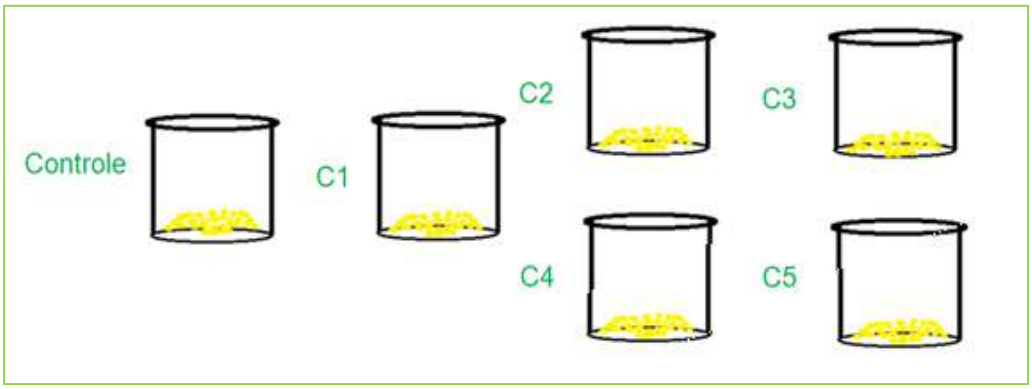

Figura 8. Desenho amostral usado nos bioensaios de ingestão de grãos tratados por extratos de *Casearia javitensis*

3.4. Análise dos Dados

Inicialmente todos os dados dos bioensaios foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para saber se os dados seguiam distribuição normal.

Para os dados que não seguiram distribuição normal, e era necessário fazer comparações múltiplas para identificar se existiam diferenças entre os grupos e o quão significativo era a diferença, optou-se por usar o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, nível de confiança de 5%. Para análise entre as médias de dois grupos, optou-se pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes, nível de confiança de 5%.

Além disso, cada um dos tipos de extratos foi submetido à análise de regressão linear para apontar o quão forte era a relação dos extratos com a mortalidade registrada de adultos de *S. zeamais*.

Os testes estatísticos foram feitos utilizando o programa de estatística Action como ferramenta de suplementar do Microsoft Excel 2010 e o programa de estatística R versão 3.1.2 (2014).

Por convenção, exclusivamente para este trabalho, adotamos os termos contidos na Tabela 3, onde as porcentagens de mortalidade foram convertidas em grupos nominais para melhor estabelecer comparações entre os extratos e facilitar o entendimento o nível do efeito de toxicidade sobre os adultos de *S. zeamais.*

Tabela 3. Conversão das porcentagens de mortalidade em níveis de toxicidade

Mortalidade (%)	Nível de Toxicidade
1-25	Baixa
26-50	Média
51-75	Alta
75-100	Muito Alta

4. RESULTADOS

4.1. Análise Dos Bioensaios De Mortalidade

Neste trabalho, foram utilizados seis tipos de extratos de *C. javitensis* que foram testados sob dois tipos de exposição, totalizando 12 bioensaios. Durante toda a pesquisa, foi utilizado um total de 10560 adultos de *S. zeamais,* com idades entre 10 e 15 dias, obtidos a partir da criação estoque do Laboratório de Entomologia Agrícola - INPA.

Ao analisarmos os testes de mortalidade de *S. zeamais* nos bioensaios de contato (Tab. 4), verificou-se que: Os extratos aquosos de folhas de *C. javitensis* apresentaram potencial inseticida sobre adultos de *S. zeamais*, a mortalidade média foi de 26% ± 8,1 e o nível de toxicidade foi considerado médio. O maior percentual de mortalidade ocorreu entre as concentrações 10,4 mg/ml e 15,6 mg/ml (35 % e 34%, respectivamente). Para os extratos orgânicos, diclorometano e metanol, as mortalidades observadas para ambos ficaram abaixo das expectativas, o nível de toxicidade foi considerado baixo, já que os percentuais de mortalidade ficaram abaixo de 10%. Para as concentrações utilizadas é possível afirmar que não há qualquer atividade inseticida.

Tabela 4. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de contato com papel filtro contaminado por extratos de folhas de *Casearia javitensis*.

Extratos	Mortalidade (%)					p-valor
Folha/Metanol	**5×10^{-5} mg/ml**	**$7{,}3 \times 10^{-3}$ mg/ml**	**$1{,}1 \times 10^{-1}$ mg/ml**	**1,64 mg/ml**	**24,7 mg/ml**	
	0% A	7% A	8% A	0% A	0% A	0,3370
Folha/Diclorometano	**2×10^{-5} mg/ml**	**$3{,}3 \times 10^{-3}$ mg/ml**	**5×10^{-2} mg/ml**	**$7{,}5 \times 10^{-1}$ mg/ml**	**11,3 mg/ml**	
	0% A	0% A	0% A	0% A	0% A	0,1210
Folha/Água	**1,3 mg/ml**	**6,5 mg/ml**	**10,4 mg/ml**	**15,6 mg/ml**	**21,74 mg/ml**	
	27% A	14% B	35% B	34% AB	20% A	0,0610

- p-valor calculado por meio do teste de Kruskal-Wallis (p=0,05)
- Médias seguidas de mesmas letras na linha não diferem entre si, determinadas pelo teste de Wilcoxon para amostras independentes.
- Mortalidade corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli

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

De acordo com o resultado dos testes de mortalidade de *S. zeamais* nos bioensaios de ingestão de grãos tratados (Tab. 5), observa-se que os extratos de diclorometano de folhas não ocasionaram mortalidade sobre adultos de *S. zeamais*, caracterizando a inexistência de qualquer atividade inseticida nas concentrações Testadas. Os extratos aquosos apresentaram baixa toxicidade para as concentrações testadas, a mortalidade média registrada foi de 3,8%±4. Os extratos metanólicos apresentaram baixa toxicidade também, com exceção da concentração 7,3 x10^{-3} mg/ml que registrou 15% de mortalidade de adultos de S. zeamais, as outras não passaram de 1%.

Tabela 5. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de ingestão de grãos de milho tratados com extratos de folhas de *Casearia javitensis.*

Extratos	**Mortalidade (%)****					**p-valor**
Folha/Metanol	**5 x 10^{-5} mg/ml**	**7,3 x 10^{-3} mg/ml**	**1,1 x 10^{-1} mg/ml**	**1,64 mg/ml**	**24,7 mg/ml**	
	0% A	15% A	1% A	0% A	1% A	0,4167
Folha/Diclorometano	**2 x 10^{-5} mg/ml**	**3,3 x 10^{-3} mg/ml**	**5 x 10^{-2} mg/ml**	**7,5 x 10^{-1} mg/ml**	**11,3 mg/ml**	
	0% A	0% A	0% A	0% A	0% A	0,4062
Folha/Água	**1,3 mg/ml**	**6,5 mg/ml**	**10,4 mg/ml**	**15,6 mg/ml**	**21,74 mg/ml**	
	1% A	8% A	4% A	6% A	0% A	0,1729

- p-valor calculado por meio do teste de Kruskal-Wallis (p=0,05)
- Médias seguidas de mesmas letras na linha não diferem entre si, determinadas pelo teste de Wilcoxon para amostras independentes.
- Mortalidade corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli

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

Quando se analisa os bioensaios de contato com os extratos de galhos de *C. javitensis* aplicados sobre papel filtro (Tab. 6), observou-se que: os extratos metanólicos e de diclorometano nas concentrações testadas não demonstraram toxicidade suficiente para ocasionar a morte de adultos de *S. zeamais* em contato com a superfície contaminada. Resultados um pouco melhores estão relacionados aos bioensaios com extratos aquosos de galhos onde quatro das cinco concentrações testadas foram capazes de ocasionar a mortalidade dos adultos de *S. zeamais*. O nível de toxicidade variou entre baixo e médio, a e o extrato aquosos na concentração 13,88 mg/ml registrou 28% de mortalidade sobre indivíduos adultos de *S. zeamais.*

Tabela 6. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de contato com papel filtro contaminado por extratos de galhos de *Casearia javitensis*

Extratos	**Mortalidade (%)**					**p-valor**
Galho/Metanol	**5×10^{-5} mg/ml**	**$7,3 \times 10^{-3}$ mg/ml**	**$1,1 \times 10^{-1}$ mg/ml**	**1,64 mg/ml**	**24,7 mg/ml**	
	8% A	0% A	0% A	0% A	0% A	0,3426
Galho/Diclorometano	**2×10^{-5} mg/ml**	**$3,1 \times 10^{-3}$ mg/ml**	**$4,6 \times 10^{-2}$ mg/ml**	**$6,9 \times 10^{-1}$ mg/ml**	**10,4 mg/ml**	
	0% A	3% A	17% A	0% A	0% A	0,4147
Galho/Água	**8×10^{-1} mg/ml**	**4,144 mg/ml**	**6,64 mg/ml**	**9,97 mg/ml**	**13,88 mg/ml**	
	19% AB	14% AB	20% AB	0% B	28% A	0,0148

- p-valor calculado por meio do teste de Kruskal-Wallis (p=0,05)

- Médias seguidas de mesmas letras na linha não diferem entre si, determinadas pelo teste de Wilcoxon para amostras independentes.

- Mortalidade corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli

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

De acordo com os bioensaios com extratos de galhos de *C. javitensis* aplicados sobre grãos de milho (Tab. 7), foram observados que: os extratos metanólicos e de diclorometano não apresentaram potencial inseticida sobre adultos de *S. zeamais* quando a forma de intoxicação foi por ingestão de grãos tratados. Já os extratos de diclorometano apresentaram atividade inseticida em quatro das cinco concentrações testadas, onde em apenas uma, na concentração 10,4 mg/ml, a toxicidade foi considerada alta, quando foi registrado 52% de mortalidade sobre adultos de *S. zeamais.*

Tabela 7. Mortalidade de *Sitophilus zeamais* em bioensaios de ingestão de grãos tratados com extratos de galhos de *Casearia javitensis*

Extrato	Mortalidade (%)					p-valor
Galho/Metanol	**5×10^{-5} mg/ml**	**$7{,}3 \times 10^{-3}$ mg/ml**	**$1{,}1 \times 10^{-1}$ mg/ml**	**1,64 mg/ml**	**24,7 mg/ml**	
	0% A	0% A	0% A	0% A	0% A	0,9220
Galho/Diclorometano	**2×10^{-5} mg/ml**	**$3{,}1 \times 10^{-3}$ mg/ml**	**$4{,}6 \times 10^{-2}$ mg/ml**	**$6{,}9 \times 10^{-1}$ mg/ml**	**10,4 mg/ml**	
	21% A	1% A	13% A	21% A	52% B	0,0192
Galho/Água	**8×10^{-1} mg/ml**	**4,14 mg/ml**	**6,64 mg/ml**	**9,97 mg/ml**	**13,88 mg/ml**	
	0% A	0% A	0% A	0% A	5% A	0,2086

- p-valor calculado por meio do teste de Kruskal-Wallis (p=0,05)

- Médias seguidas de mesmas letras na linha não diferem entre si, determinadas pelo teste de Wilcoxon para amostras independentes.

- Mortalidade corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli

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

4.2. Análise de Correlação

Os extratos considerados mais promissores foram analisados a fim de estabelecer a força da correlação.

A relação estabelecida entre os extratos aquosos de folhas de *C. javitensis* e a mortalidade de adultos de *S. zeamais* nos bioensaios de superfície contaminada (Fig. 9) é positiva, a mortalidade cresce com o aumento das concentrações. De acordo com o coeficiente de correlação, existe uma relação do tipo regular (r= 0,40), e o coeficiente de determinação (R^2) aponta que cerca de 16% da variação que ocorre com a mortalidade tem como responsável este extrato e neste tipo de aplicação.

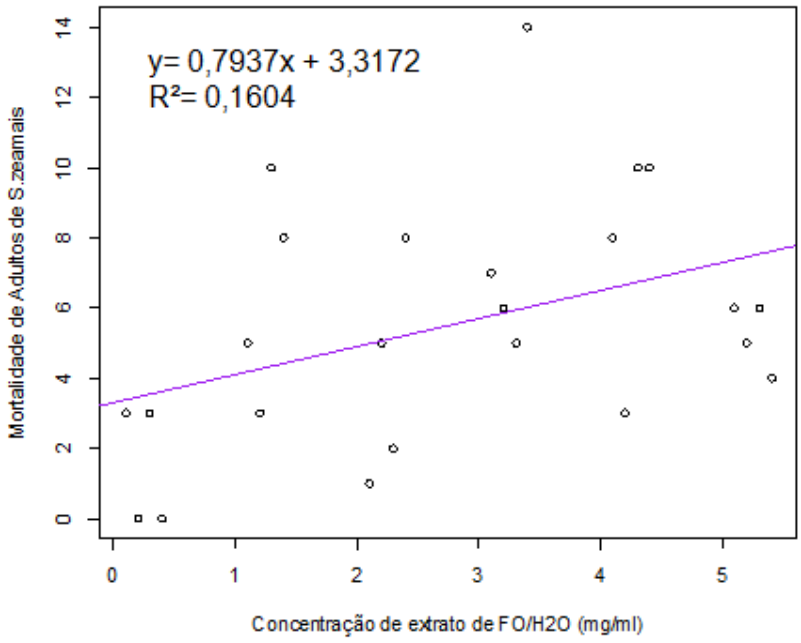

Figura 9. Relação entre mortalidade de *Sitophilus zeamais* e extratos aquosos de folhas de *Casearia javitensis* aplicados sobre superfície contaminada. Onde: 0 = controle; 1 = 1,3 mg/ml; 2 = 6,5 mg/ml; 3 = 4,62 x 10^{-2} mg/ml; 4 = 15,6 mg/ml; 5 = 21,74 mg/ml.

A relação estabelecida entre os extratos aquosos de galhos de *C. javitensis* e a mortalidade de adultos de *S. zeamais* nos bioensaios de contato com superfície contaminada (Fig. 10) é positiva, a mortalidade cresce com o aumento das concentrações. De acordo com o coeficiente de correlação, existe uma relação do tipo regular (r= 0,64), e o coeficiente de determinação (R^2) aponta que cerca de 42% da variação que ocorre com a mortalidade tem como responsável este extrato e neste tipo de aplicação.

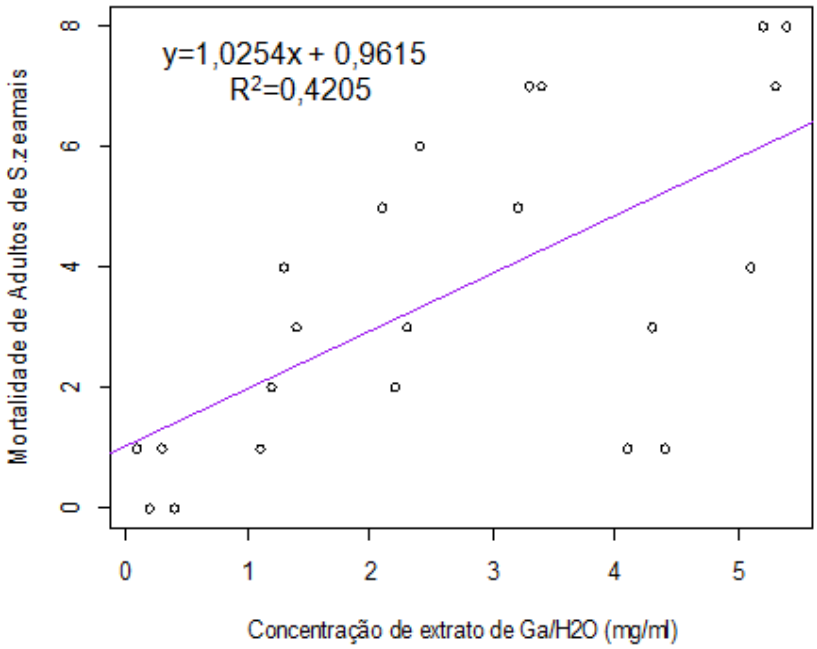

Figura 10. Relação entre mortalidade de *Sitophilus zeamais* e extratos aquosos de galhos de *Casearia javitensis* aplicados sobre superfície contaminada. Onde: 0 = controle; 1 = 0,83 mg/ml; 2= 4,144 mg/ml; 3= 6,64 mg/ml; 4= 9,97 mg/ml; 5 = 13,88 mg/ml

A relação estabelecida entre extratos diclorometânicos de galhos, nos testes de ingestão de grãos contaminados, e a mortalidade de adultos de *S. zeamais* (Fig. 11) apresentaram correlação moderada e positiva (r= 0,64). O coeficiente de determinação apontou que cerca de 40,5% das variações que ocorre com a mortalidade tem como responsável este extrato e neste tipo de aplicação.

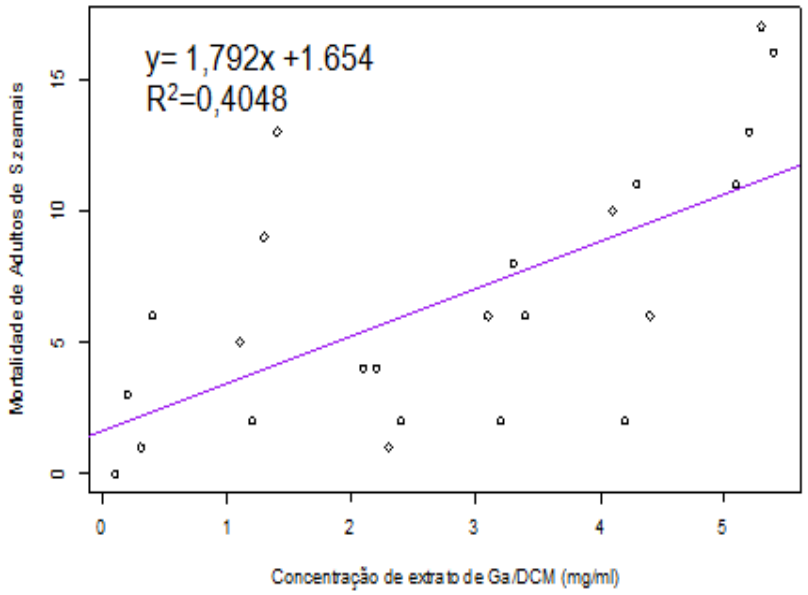

Figura 11. Relação entre mortalidade de adultos de *S. zeamais* e concentrações progressivas de extratos diclorometânicos de galhos de *C. javitensis* testados através de ingestão de grãos de milho contaminados. Onde: 0 = controle; 1 = 2 x 10^{-4} mg/ml; 2 = 3,1 x 10^{-3} mg/ml; 3 = 4,62 x 10^{-2} mg/ml; 4 = 6,9 x 10^{-1} mg/ml; 5 = 10,4 mg/ml.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, de acordo com os dados expostos, foi constatado que *C. javitensis* apresenta potencial inseticida sobre *S. zeamais*. Os extratos com melhor atividade foram: extratos aquosos de galhos e folhas, ambos em bioensaios de contato; e extratos diclorometânicos de galhos em bioensaios de ingestão. Dentre estes, os extratos diclorometânicos de galhos obtiveram os melhores resultados, pois a mortalidade de *S. zeamais* registrada aumentava ao mesmo tempo em que as concentrações se elevavam, indicando dose-dependência.

Os resultados demonstram também que as substâncias inseticidas estão presentes tanto nos galhos quanto nas folhas. É importante ressaltar que tais substâncias foram extraídas com solventes diferentes (diclorometano e água), o que pode indicar duas ou mais classes de substâncias inseticidas presentes na planta. Sugerimos que os extratos desta planta sejam melhores estudadas a fim de detectar quais substâncias são de fato responsáveis pela atividade inseticida, principalmente os extratos aquosos, por se tratar de um solvente abundante e de fácil acesso.

Trabalhos como o de Zuanazzi *et al*. (2000) afirmam que os compostos da classe dos fenóis, como os que estão presentes em *C. javitensis*, as proantocianidinas, têm papel biológico envolvido na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e contra microorganismos patogênicos, diminuição da palatabilidade pelo sabor adstringente, dificultando a digestão pela complexação dos taninos as enzimas digestivas, formando produtos tóxicos no trato digestivo. Alguns autores sugerem que os compostos fenólicos são extraídos de maneira mais eficiente por solventes com polaridade igual ou próxima do metanol. No presente trabalho, os extratos metanólicos não levaram a um aumento significativo na taxa de mortalidade de *S. zeamais*. Existe a possibilidade dos extratos não serem tóxicos para *S. zeamais*, entretanto, a baixa mortalidade registrada pode estar também relacionada às concentrações empregadas nos bioensaios, ou ao método usado na extração do extrato. Scalbert *et al.* (1989), afirmam que a extração de compostos fenólicos com metanol seja mais eficaz com extração a baixas temperaturas e pressão, ao contrário do método empregado neste estudo, cujos os extratos forma obtidos por meio de rota-evaporador, em que o solvente é separado do extrato vegetal bruto em

um processo de aquecimento semelhante a um “banho-maria”. Teoricamente, isso poderia ter levado a uma possível destruição das substâncias inseticidas pela temperatura alta. Por isso sugerimos que estes extratos sejam objetos de futuras pesquisas com outras metodologias de separação do solvente do extrato bruto. Ou até mesmo uma repetição do teste, uma vez que muitos trabalhos utilizam a forma de extração de metanol a quente (rota-evaporador) e registraram bons resultados sobre insetos-praga, podemos citar Oliveira (2011) que utilizou extratos metanólicos de flores e galhos de *V. cymosa* no controle de *S. zeamais*. Ademais, a quantidade de extrato bruto obtido pode ter sido também um fator limitante, já que impossibilitou os bioensaios com concentrações mais elevadas.

Embora, sem relatos de ação inseticida em literatura, *C. javitensis* apresenta em sua composição química substâncias bioativas reconhecidamente tóxicas a insetos pragas e causadores de doenças, tais substâncias foram relatadas por Corrêa (2006). É importante ressaltar que dentro do gênero *Casearia*, existem espécies que serviram de base para estudos sobre controle de insetos nocivos ao homem, como é o caso de *C. sylvestris* var. *lingua*, que em estudo de Rodrigues et al. (2006) testaram e comprovaram atividade inseticida sobre ovos de *Aedes aegypti* (Diptera). E mais, Ribeiro et al. (2014) testaram extratos hexânicos de ramos de *C. sylvestres* e observaram que este causou mortalidade média de 37% $\pm$4,48 sobre *S. zeamais*. E mediante as propriedades químicas de ambas as espécies e a hipótese de “evolução paralela”, a qual postula que: insetos tendem a selecionar preferencialmente plantas pertencentes à mesma família botânica ou a gêneros específicos, com exceções, as quais tendem a sintetizar metabólitos secundários semelhantes (Brues 1920, Pizzamiglio-Gutierrez 1991). Tudo isso, juntamente aos dados coletado, leva-nos a crer que *C. javitensis* pode ser utilizada no controle de S. zeamais.

Os seguintes fatores podem explicar também o fato de sido observado também baixa mortalidade em extratos de *C. javitensis* neste trabalho – especificamente falando de extratos diclorometânicos de folhas (bioensaios de contato e ingestão), aquosos de folhas (ingestão), diclorometânicos de galhos (contato) e aquosos de galhos (ingestão): a composição química da planta coletada (sendo esta dependente das condições ambientais), forma como a substância é ministrada (contato, ingestão ou vapor), escolha do preparado (extrato, pó ou óleo),

susceptibilidade dos insetos, época de coleta, estágio de desenvolvimento da planta coletada e técnica de extração (Regnault-Roger e Hamraoui 1995; Isman 2000; Gobbo-Neto e Lopes 2007). Ressalta-se que mesmo plantas bastante estudadas eventualmente podem não apresentar nenhuma atividade devido a alteração de algum dos fatores citados. Por exemplo, Liu *et al.* (2007), testaram extratos de 40 espécies vegetais com comprovada ação sobre adultos de *S. zeamais* e *Tribolium castaneum* por via de contato, fumigação e deterrência alimentar, entretanto dez espécies não apresentaram nenhum efeito sobre ambos os insetos avaliados.

Fazolin *et al.* (2007) sugerem que o efeito sobre a sobrevivência de insetos-alvo depende da escolha do tipo de material a ser testado (pós, óleos ou extratos vegetais) e da composição química em associação a escolha do método de exposição. Mesmo os extratos que registraram baixa mortalidade ou mesmo nenhuma atividade no presente trabalho, deveriam ser testados com outras metodologias. Sugere-se aplicações com torre de Poter ou aplicações tópicas, e também testar os extratos na forma de pós ou se possível testar os óleos essências. Tavares e Vendramim (2005) constataram essa variação na atividade inseticida de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), em que os extratos aquosos não obtiveram a mesma efetividade do pó sobre *S. zeamais*. Importante ressaltar que um estudo fitoquímico mais aprofundado deve estar atrelado aos bioensaios de mortalidade. Além dos bioensaios de mortalidade, recomenda-se fazer testes de repelência e testes de redução de infestação (redução da geração F1/progênie), além de analises de redução de peso, redução da longevidade e efeitos deletérios (má formação, alteração do ciclo biológico, esterilização).

Para este trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre os métodos de exposição, pois *S. zeamais* foi tão suscetível aos bioensaios de contato quanto aos bioensaios de ingestão. Entretanto, os resultados demonstram que cada extrato apresenta um método de aplicação que o torna mais eficiente. Ainda assim, algumas questões não puderam ser respondidas neste trabalho, como por exemplo, a razão dos extratos diclorometânicos de galhos terem tido grande atividade inseticida sobre S. zeamais nos bioensaios de ingestão e terem sido ineficiente nos bioensaios de contato. A mesma pergunta se faz para os extratos aquosos de folhas e galhos, em que ambos apresentaram atividade inseticida nos bioensaios de contato, mas foram ineficientes no bioensaios de ingestão. Sobre

essa ultima, Oliveira (2010) discorre sobre uma possível explicação para a ação dos extratos vegetais em bioensaios de contato, por meio de cruzamentos de informações sobre a fiosiologia da cutícula dos insetos, que são barreiras físicoquímicas naturais, e a capacidade de determinados extratos, principalmente os de baixa polaridade, de quebrar essas barreira. Extratos lipofílicos (baixa polaridade) como os diclorometânicos teriam maior efetividade em penetrar nas camadas mais profundas da pele dos insetos, cuja a parte mais superficial da cutícula (epicutícula) também é lipofílica. Com base nisso, sugere-se que os bioensaios de contato com extratos aquosos e diclorometânicos de galhos sejam novamente testados em outra oportunidade.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, a forma de exposição, entre extratos aquosos de *C. javitensis* testados sobre *S. zeamais,* que apresentou melhor atividade inseticida, foi por meio de contato sobre superfície contaminada. Enquanto que entre os extratos diclorometânicos, o bioensaio que obteve maior mortalidade de *S. zeamais* foi por meio da ingestão de grãos tratados. Quanto aos extratos metanólicos de *C. javitensis*, seriam necessários novos testes com concentrações mais altas para verificar atividade inseticida e também para detectar qual meio de exposição seria mais vantajoso no controle de *S. zeamais.*

Entre os extratos diclorometânicos, a concentração com maior efetividade no controle de *S. zeamais* é 10,4 mg/ml de extrato de galhos aplicados através de ingestão de grãos contaminados. Entre os aquosos, as concentração com maior efetividade foram 10,4 mg/ml e 15,6 mg/ml de extratos de folhas usados nos bioensaios de contato em superfície contaminada.

De acordo com a análise dos dados de mortalidades e de correlação, foi possível determinar que as substâncias extraídas dos galhos de *C. javitensis* com diclorometano e aplicadas por meio de ingestão de grãos é o método mais promissor no controle de *S. zeamais*.

7. REFERÊNCIAS

Almeida, F.A.C.; Goldfarb, A.C.; Gouveia, J.P.G. 1999. Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus* spp. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 1(1): 13-20.

Almeida, F.A.C.; Silva, J.F.; Melo, B.A.; Gomes, J.P.; Silva, R.G. 2013. Extratos botânicos no controle de *Sitophilus zeamais* Motshulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidade). *Revista verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 8(3):163-168.

Anderson, K.; Schurle, B.; Reed, C.; Pedersen, J. 1990. An economic analysis of producers decisions regarding insect control in stored grain. *North Central Journal of Agricultural Economics*.12: 23-29.

Ashamo, M.O.; Odeyemi, O.O.; Akinneye, J.O. 2013.Efficacy of some plant extracts as post harvest grain protectants against *Callosobruchus maculates* (F.) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *FUTA Jornal of Research in Sciences*. 2: 217-224.

Barbosa, A.D.; Ferreira, R.C.V.; Valente, P.H.M. 1994. Atividade antimicrobiana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. *Lecta*-USF. 12(2): 153-163.

Basile, A.C.; Sertié, A.S.; Panizza, S.; Oshiro, T.T.; Azzolini, C.A. 1990. Pharmacological assay of *Casearia javitensis* I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extracts. *Jornal Ethnopharmacol*. 30(2): 185-197.

Beutler, J.A.; McCall, K.L.; Herbert K.; Johnson, T.; Shoemarker, R.H.; Boyd, M.R. 2000.Cytotoxic clerodanediterpene esters from *Laetia corymbulosa*. *Phytochemistry*. 55: 233-236.

Bolzani, V.S.; Young, M.C.; Furlan, M.; Cavalheiro, A.J.; Araújo, A.R.;Silva, D.H.; Lopes, M.N. 1999. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic forest. *An. Acad. Brasil. Cienc*. 71(2): 181-187.

Bogorni, P.C.; Vendramim, J.D. 2003. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre*Spodopterafrugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotropical Entomology*, Londrina. 32: 665-669.

Borges, M. H.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M.; Oliveira, F.; Franshechi, A. M.; Rucavado, A.; Giglio, J. R.; Homsi-Brandeburgo, M. I. 2001.Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae).*Toxicon*. 39:1863-1869.

Caneppele, M.A.B.; Caneppele, C.; Lazzari, F.A.; Lazzari, S.M.N. 2003.Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais*Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae).*Revista Brasileira de Entomologia*.47:625-630.

Carvalho, E.S.; Santos, A.G.; Cavalheiro, A.J. 2009. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas*. 30(3). 277-284.

Chang, K. C.; Duh, C. Y.; Chen, I. S.; Tsai, I. L. 2003.A cytotoxic butenolide, two new dollabelane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative from *Casearia membranacea*.*Planta Medica*. 69: 667-672.

Comandolli-Wyrepkowski, C.D. 2010. *Estudos fitoquímicos e bioatividade de extratos e Casearia javitensis Kunth*. Dissertação de mestrados, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM. 125pp.

Corrêa, A.G.; Sant'Ana, J. 2007.*Fundamentos da comunicação química de insetos*. 9-17. In : Ferreira, J.T.B.; Corrêa, A.G.; Vieira, P.C. Produtos Naturais no controle de insetos. Séries de Textos de Escola de Verão em Química.Vol.3. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Corrêa, M.P. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, IBDF.6.

Corrêa, P. G. 2007.*Defesas Foliares em Resposta à Herbivoria em Espécies Lenhosas de Restinga, Ipojuca - PE*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Costa, I. R.; Araújo, F. S.; Lima-Verde, L. W. 2004. Flora e aspectos auto-ecológicos de um encrave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasileira*.18(4): 759-770.

Dewick, P.M. 2009. *Medicinal Natural Products*: a biosynthetic approach. 2. John Wiley e Sons Ltd., Chichester.

EMBRAPA. 2012. Cultivo do Milho: Importância(www.sistemasdeproducao. cnptia.embrapa.br/fonteshtml/milho/cultivodomilho/importancia.htm) Acesso: 26/07/2012

Esteves, I, Souza, I. R.; Rodrigues, M.; Cardoso, L. G. V.; Santos, L. S.; Sertie, J. A.; Perazzo, F. F.; Lima, L. M.; Schneerdof, J. M.; Bastos, J. K.; Carvalho, J. C. T. 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 191–196.

Estrela, J.L.V., Fazolin, M., Catani, V.; Alécio, M. R.; Lima, M.S. 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* Brasília. 41(2): 217-222.

Fazolin, M.; Estrela, J.L.V.; Catani, V.; Alécio, M.R.; Lima, M.S. 2007. Propriedade Inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC.,*Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur& K. Shum sobre *Tenebriomolitor*L.,1758. *Ciência Agrotec*. 31(1):113-120.

Fernandes, C.C.; Cursino, L. M. C.; Novaes, J. P.; Demetrio, C. A.; Pereira-Junior, O. L.; Nunez, C. V. 2009. Salicilatos isolados de folhas e talos de *Salix martiana* LEYB. (Salicaceae).*Química Nova*.32(4).983-986.

Finney, D.J. 1971.*Statistical Method in BiologicalAssay*. 2.ed.Griffin, London.

Flora Brasiliensis.1871.Vol.13(1):483-484.(http://florabrasiliensis.cria.org.br/fviewer).

Deshpande, S.S. 1992. Food legumes in Human nutrition: a personal perspective. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton. 32(4): 333-363

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2007 Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 30: 374-381.

Guerra, M.S. 1985. *Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e seus produtos*. EMBRATER, Brasília. 166pp.

Gunasekera, S. P.; Sultanbawa, M. U. S.; Balasubramaniam, S. 1977. Triterpenes of some species of Flacourtiaceae.*Phytochemistry*.16: 788-789.

Huang, Y.; Ho, S.H. 1998.Toxicity and Antifeedant Activities of Cinnamaldehydeagainst the Grain Storage Insects, *Triboliumcastaneum*(Herbst) and *Sitophilus zeamais*Motsch.*Journal Stored Prod. Res.,* 34: 11-17.

Huang, Y.; Tan, J.M.W.L.; Kini, R. M., Ho, S.H. 1997.Toxic and Antifeedant Action of Nutmeg Oil Against*Triboliumcastaneum*(Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal stored Prod. Res*. 33: 289-298.

Isman, M.B. 2000.Plant essential oils for pest and disease management.*Crop Protection*. 19: 603-608.

Isman, M.B. 2006.Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world.*Annual Review Entomology*. 51: 45-66.

Itokawa, H.; Totsuka, N.; Morita, H.; Takeya, K.; Iitaka, Y.; Schenkel, E. P.; Motidome, M. 1990. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae).*Chemical e Pharmaceutical Bulletin*.38(12). 3384-3388.

Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides (past, present and future). In: Arnason, J.T.; Philogene, B.J.R.; Morandd, P. (ed). Insecticides of plant origin. WashingtonACS.: 1-10.

Jefferies, P.R.; Lam, W.W.; Toia, R.F.; Casida, J.E. 1992.*Ryania* Insecticide: Structural Assignments of Four Natural 8-Hydroxy-10-epiryanoids. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 40. 509-512.

Kim, S.I.; Lee, D.W. 2014. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insects pest. *Jornal of Asia-Pacific Entomology*.17: 13-17.

Lacher, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RIMA, São Carlos. 519pp.In: Machado, L.A.; Silva, V.B.; Oliveira, M.M. 2007. Palestra: Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 69(2): 103-106.

Lawal, O.A.; Opoku, A.R.; Ogunwande, I.A. 2015. Phytoconstituents and Insecticidal Activity of different Solvent Leaf Extracts of *Chromolaena odorata* L., against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Medicinal Plants*. 5(3): 237-247.

Lazzari, S.M.N.; Lazzari, F.A. 2009.*Insetos-praga de produtos armazenados*, p667-731. *In*: Panizzi, A.R; Parra, J.R.P. (ed). Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas. Embrapa informação Tecnológica, Brasília, Distrito Federal.

Liu, Z.L.: Goh, S.H.; Ho, S.H. 2007. Screening of chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*. 43: 290-296.

Llanos, C.A.H.; Arango, D.L; Giraldo, M. C. 2008.Actividadinsecticid de extracts de semilla de *Annonamuricata*(Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Colombiana de Entomología*, 34: 76-82.

Mann, J.; Davidson, R.S.; Hobs, J. B.; Banthorpe, D. V.; Harborne, J. B. 1994. *Natural products: their chemistry and biological significance*. Logman Scientific e Technical.6.

Martins, C.R.; Farias, R.M. 2002. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas nas produção agrícola. *Revista FZVA*, Uruguaiana. 9(1): 20-32

Martins, D.; Fachin-Espinar, M.T.; Oliveira, T.A.; Lima, K.C.S.; Cavalcanti, R.M.; Ronchi-Teles, B.; Nunez, C.V. 2014. Tamizaje fitoquímico y evalución de las actividades biológicas de *Duroiamacrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy e Pharmacognosy Research*. 2(6): 158-171.

Merrit,A.T.;Ley, S.V. 1992.Clerodane diterpenoids.*Nat Prod Rep.* 9: 243–287.

Miana, G.A.; Rahman, A.U.; Iqbal, C.M.I.; Jilani, G.; Bibi, H.1996. Pesticides nature: present and future perspectives. In: Copping, L.G. (ed). Crop protection agents from nature: natural products and analogues. Cambridge. RSC. : 241-253.

Moreira, M.D.; Vezon, M.; Junior, T.J.P.; Pallini, A. 2005. *Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas*: Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa,EPMIG/CTZM. 89-120.

Morita, H.;Nakayama, M.;Kojima, H.;Takeya, K.;Itokawa, H.;Schenkel, E.P.;Motidome,M. 1991. Structure and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem Pharm Bull.* 39: 693–697.

Mosaddik, M.A.; Banbury, L.; Foster, P.; Booth, R.; Markham, J.; Leach, D.; Waterman, P.G. 2004. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidante, cytotoxic and antimicrobial activity.*Phytomedicine*.11: 461-466.

Napoleão, T.H.; Belmonte, B.R.; Pontual, E.V.; Albuquerque, L.P.; Sá, R.A.; Paiva, L.M.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G. 2013. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil. *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae).*Journal of Stored products Research*. 54: 26-33.

Oberlies,N.H.; Burgess, J.P.; Navarro, H.A.; Pinos, R.E.; Fairchild, C.R.; Peterson, R.W.; Soejarto, D.D.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Wani, M.C.; Wall, M. 2002. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*.*Journal ofNatural Products*. 65: 95–99.

Oliveira, J. V. 1997.Controle de pragas de grãos armazenados com substâncias de origem vegetal. In: Congresso Brasileiro de Entomologia. Salvador. 16: PP 10.

Oliveira, T.A.; Ronchi-Teles, B.; Fonseca, C.R.V.; Silva, S.L.R., Santos, P.A.; Nunez, C.V. 2012. Insecticidal activity of *Vitex cymosa* (Lamiaceae) and *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) extracts against Sitophilus zeamais adults (Curculionidae). *Emir. J. Food Agric*. 24(1): 49-56.

Ogendo, J.O; Kostyukovsky, M.; Ravid, U.; Matasyoh, J.C.; Deng, A.L.; Omolo, E.O.; Kariuki, S.T.; Shaaya, E. 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pest attacking stored food products.*Journal of Stored Products Research*. 44: 328-334.

Pena, M.R. 2012. Bioatividade de extratos aquosos e orgânicos de diferentes plantas inseticidas sobre a mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1915 (Hemiptera: Aleyrodidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. 188pp.

Peterson, G.S.; kandil, M.A.; Abdallah, M.D.; Farag, A.A.A. 1989.Isolation and characterization of biologically active compounds from some plants extracts. Pesticide Science. 25(4): 337-342.

Rajendran, S.; Sriranjini, V. 2008.Plants products as fumigants for stored-products insetc control.*Journal of Stored Products Research*. 44: 126-135.

Regnault-Roger, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insects pest control. *IntegratedPest Management Reviews*, The Netherlands. 2: 25-34.

Regnault-Roger, C.; Hamraoui, A. 1995.Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* l.). *Journal Stored Products Research*. 31: 291-299.

Ribeiro, L.P. 2010. Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais*Mots.(Coleoptera: Curculionidae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 154pp.

Ribeiro, L.P.; Vendramim, J.D.; Andrade, M. S.; Bicalho, K.U.; Silva, M.F.G.F.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B. 2014. Tropical plant extracts as sources of grain-

protectant compounds against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). 43: 470-482.

Roel, R. A. 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Revista Internacional de Desenvolvimento Local. 1(2): 43-50.

Roel, A.R.; Vendramim, J.D. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciência Rural*. 36(4): 1049-1054.

Roel, A. R.; Vendramin, J. D.; Frighetto, T.S.; Frighetto, N. 2000.Atividade Tóxica de Extratos Orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).*Anais Sociedade de Entomologia Brasileira*. 29(4). 799-808.

Rodrigues,A.M.S.;Paula,J.E.;Degallier,N.;Molez,J.F.;Espíndola,L.S. 2006. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 22: 314–317.

Santos, F.N.; Oliveira, T.A.; Lima, K.C.S.; Andrade, J.I.A.; Silva, D.X.; Amaral, L.V.; Moya, H.D.; Ronchi-Teles, B.; Matsura, T.; Nunez, C.V. *Montrichardia linifera* (Araceae) biological potential, phytochemical prospection and polyphenol content. *Journal of the Faculty of Sciences*, Pontificia Universidad Javeriana. 19(3): 213-224.

Santos, J.C; Faroni, L.R.D.; Simões, R.O.; Pimentel, M.A.G.; Sousa, A.H. 2009.Toxicidade de Inseticidas Piretróides e Organofosforados para Populações brasileiras de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae).*Bioscience Journal*, Uberlândia.25(6). 75-81.

Santos. J.P. 1993. Recomendações para o controle de pragas de grãos e de sementes armazenadas. In: *Simpósio Sobre Fatores Que Afetam A Produtividade Do Milho E Do Sorgo, 1990, Vitória, ES*. Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS. 197-248.

Santos, S.C.; Mello, J.C.P. 2004. Taninos. In: Simões, C.M.O; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2004. Farmacognosia: da palnta ao medicamento. Editora UFRGS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis: 615-656.

Savaris, M.; Sabedot-Bordin, S.M., Mendes, C.E.; Moura, N.F.; Teixeira, C.M.; Garcia, F.R.M. 2014. Evaluation of extracts and essential oils from “Poejo”, *Cunila angustifolia*(Lamiales: Lamiaceae) leaves to control adults of maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal ofEntomological Research*. 2(1): 23-28.

Scalbert, A.; Monties, B.; Jannin, G. 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 37: 1324-1329.

Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. 1965.An analysis of variance test for normality (complete samples).*Biometrika*, London, 52. 591-611.

Silva, D.H.S. 1997. Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Silva, F.A.; Silva, E.S.; Apolinário, J.C.G., Baish, A.L.N., Alam, M.F.; Oliveira, B.T.; Battastini, A.M., Torres, F.; Racoski, G.; Lapa, A.J. 1986. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos de *Casearia sylvestris* Swartz. Vitale. 57-99.

Silva-Forsberg, M.C. 1999.*Protecting an urban forest reserve in the Amazon. A muti-scale analysis of edge effects population pressure, and institutions.* Dissertation Series, Center for the Study of Institutions, Population and Enviromental, Indiana University, Indiana.

Silva, S.L.; Chaar, J.S.; Figueiredo, P.M.S.; YANO, T.2008.Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes.*Acta Amazônica*. 38(1): 107-112.

Silva, S.L.; Chaar, J.S.; Damico, D.C.S.; Figueiredo, P.M.S.; YANO, T. 2008. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology*.46(5).347-351.

Sinha, R.N. 1995.*The stoced-jeain ecosystem*. In: Jayas, D.S.; White, N.D.G.; Muiz, W.E. (eds) Stoced-jeain ecosystems. New York: M. Dekker.1-33.

Souza V.C.; Lorenzi H. 2005. *Botânica Sistemática* - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum.

Soares, W.L. 2010. *Uso dos agrotóxico e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura.* Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 150pp.

Suleiman, M. 2014. Efficacy of some spices as sorghum grain protectants against *Sitophiluszeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae).*International Journal of Agriculture and Forestry*.9(9): 841-845.

Tavares, M.A.G.C. 2002.Bioatividade de Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodiumambrosiodes* L.(Chenopodoaceae), em relação *Sitophilus zeamais*Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 59pp.

Tavares, M.A.C.G.; Vendramim, J.D. 2005. Bioatividade de Erva de Santa-maria*Chenopodiumambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais*Mots. (Coleoptera: Curciolionidae). *NeotropicalEntomology*. 34: 319-323.

Temitope, O.O. 2014.Evaluation of the powder of three medicinal botanicals in the controlof maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky.*Nature and Science*. 12(11); 184-190.

Thadeo, M.; Meira, R.M.S.A.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 32(2).

Tininis, A.G.; Assonuma, M.M.; Telascrea, M.; Perez, C.C.; Silva, M R.S.R.M.; Favoreto, T.; Cavalheiro, A.J. 2006. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW.*Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu. 8(4): 132-136.

Vasquez, S. P. F. 2005. Fenologia, Biologia Floral e polinização de três espécies de Flacourtiaceae na região de Manaus- AM. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Vacari, A.M.; Albergaria, N.M.M.S.; Otuka, A.K.; Dória, H.O.S.; Loureiro, E.; De Bortoli, S.A. 2004. Seletividade de óleo de Nim (*Azadirachtaindica* A. Juss.) sobre *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71: 1-74.

Vendramim, J.D. 1997. *Uso de plantas inseticidas no controle de pragas*. Ed. Ciclo de Palestras sobre agricultura orgânica. Anais. São Paulo: Fundação Cargill. 64-69.

Vieira-Junior,G.M;Gonçalves,T.O.;Regasini, L.O.;Ferreira, P.M.P.;Pessoa C.;Costa-Lotufo,L.V.;Torres,R.B.;Boralle,N.;Bolzani,V.S.;Cavalheiro,A.J.; 2009. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*.*J. Nat. Prod.* 72: 1847–1850.

Vilarinho, K.M.C. 2012. Inseticidas químicos e extratos vegetais aquosos no controle de *Sitophilus zeamais* em grãos de milho sob condições de armazenamento. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso. 84pp.

Webber, G.I. 2009. Efeitos de extratos de barbatimão *Stryphnodendron coriaceum* (benth.) na biologia de *Spodoptera frugiperda* (Smith. 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí.

Wei, L.; Hua, R.; Li, M.; Huang, Y.; Li, S.; He, Y.; Shen, Z. 2014. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. *Journal insect Science*. 14:1-13.

ZMARZTY, S. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Flacourtiaceae. *Rodriguésia*. 58(3): 663-694. 2007.

ZUANAZZI, J.A.S. 2000. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2: 489-640.