

**Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
Mestrado em Biotecnologia**

***Prospecção de Extratos Etanólicos de Plantas
Medicinais na Busca por Nematicidas***

LIEGE SLOMP

**Ribeirão Preto - SP
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Liege Slomp

***Prospecção de Extratos Etanólicos de Plantas
Medicinais na Busca por Nematicidas***

**Dissertação apresentada
ao curso de Biotecnologia
da Universidade de
Ribeirão Preto para
obtenção do
Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. René de Oliveira Beleboni
Co-orientador (a): Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti
Colaborador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira**

**Ribeirão Preto - SP
Março de 2007**

*Ao grande homem da minha vida, meu pai
Nilo, pela confiança, perseverança e apoio,
à mulher mais incrível deste mundo, minha
mãe Gladis que sempre confiou, acreditou,
rezou, segurou minha mão e aconselhou
nos momentos mais difíceis e aos meus
irmãos Eduardo e Tiago pelo carinho e o
apoio.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela força para realização deste trabalho, principalmente nos momentos de provação.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. René de Oliveira Beleboni pelas orientações, pelos ensinamentos, “puxões de orelha”, pelo acompanhamento, apoio, confiança, carinho, amizade e paciência.

A minha querida Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti pelo carinho, ensinamentos, orientações, confiança, amizade, incentivo e oportunidades.

Ao meu querido colaborador Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira pelo acompanhamento, sugestões, disponibilidade, carinho e confiança.

À Profa. Dra. Suzelei de Castro França Coordenadora do Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto e ao Prof. Dr. Mozart Marins membro do CAPED – Comissão de Acompanhamento em Pesquisa e Estágio Docência em Biotecnologia que sempre me ouviram e ajudaram quando necessário.

A CAPES/PROSUP pelo suporte financeiro.

A Prof^a. Dr^a. Ana Helena Januário e Prof^a. Dr^a. Eloísa Mocheuti Kronka pelas sugestões e pareceres, fundamentais para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Milton Faria Jr. pela força indispensável na parte estatística e principalmente pela amizade e o apoio nos momentos complicados desta etapa.

A toda minha família, pai, mãe, irmãos, tios e tias, primas, primos e a minha sobrinha e afilhada “Duda” por ter entrado em nossas vidas e as tornado tão mais interessantes.

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos, Dr. Vilmar Gonzaga e Dr. Sergio Ademir Calzavara do departamento de Fitossanidade da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP/Jaboticabal, pelo apoio, suporte de material, ensinamentos, sugestões, pela paciência e principalmente pela amizade. Vocês tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao querido Prof. Dr. Maçao Sakamoto pela oportunidade, disponibilidade, compreensão e colaboração para a realização do estágio docência.

A Joana e Cecília da Secretaria de Pós-graduação pela educação, simpatia, pelo carinho, atenção, preocupação, prestatividade e constante bom humor.

A todos os técnicos em especial a Sarazeti pela ajuda na obtenção dos extratos e pela paciência, funcionários, em especial a Sônia 'mamys', que se tornou uma grande amiga e confidente, estagiários, alunos e amigos da unidade de Biotecnologia, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos, Michelli, Joice, Fausto e Roberta que sempre estiveram ao meu lado, torcendo muito, incentivando e apoiando nos momentos mais difíceis.

*Sábio é aquele que procura a sabedoria,
tolo é aquele que pensa tê-la encontrado.*

Georg Lichtenberg

*Não é digno de saborear o mel aquele
que se afasta da colméia por medo
das picadas das abelhas.*

Autor desconhecido

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. O manejo de pragas e vetores por meios convencionais e as novas alternativas	3
1.2. pragas agrícolas e vetores de doenças no Brasil	7
1.2.1. Doenças e vetores.....	7
1.2.2. pragas agrícolas e nematóides.....	11
1.2.3. <i>Pratylenchus ssp.</i>	15
1.3. Plantas com atividade bioinseticida/nematicida	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Obtenção dos extratos vegetais	23
3.2. Análises Fitoquímicas Preliminares: Cromatografia em Camada Delgada (CCD).	23
3.3. Multiplicação das sub-populações de <i>P. zaeae</i> e <i>P. jaehni</i>	24
3.4. Multiplicação inicial dos Nematóides <i>P. zaeae</i> e <i>P. jaehni</i>	25
3.5. Extração, axenização e inoculação dos nematóides.....	25
3.6. Bioensaios com extratos vegetais.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo de vida dos nematóides do gênero <i>Pratylenchus</i>	14
FIGURA 2: <i>Pratylenchus zeae</i> , em microscopia.....	15
FIGURA 3: Citrus apresentando sintomas causados pela infestação do <i>Pratylenchus jaehni</i>	18
FIGURA 4: Reboleira em cultura de soja, causada pelo nematóide <i>Heterodera glycines</i>	18
FIGURA 5: Preparação para multiplicação utilizando cenouras em Fluxo Laminar...	24
FIGURA 6: Coleta de nematóides em vidros tipo BPI com auxílio de lupa e vareta.....	27
FIGURA 7: Placa cromatográfica com fase móvel Clorofórmio/Metanol 8:2 revelada com NP/PEG.....	31
FIGURA 8: Placa cromatográfica com fase móvel Clorofórmio/Metanol 8:2 revelada com Vanelina sulfúrica.....	31
FIGURA 9: Placa cromatográfica com fase móvel BAW revelada com NP/PEG.....	31
FIGURA 10: Placa cromatográfica com fase móvel BAW revelada com Vanelina sulfúrica.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Análise fitoquímica preliminar dos extratos etanólicos das folhas de plantas selecionadas no estudo.....	32
TABELA 2: Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisia do <i>Pratylenchus zae</i> nos ensaios com Carbofuran. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$	33
TABELA 3: Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisia do <i>Pratylenchus zae</i> nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 12h de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	34
TABELA 4: Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisia do <i>Pratylenchus zae</i> nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 24h de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	35
TABELA 5: Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisia do <i>Pratylenchus jaehni</i> nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 12h de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	36
TABELA 6: Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisia do <i>Pratylenchus jaehni</i> nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 24h de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHC – Hexaclorobenzeno.

DDT – Diclorodifeniltricloroetano.

DL₅₀ – Dose Letal Média.

EMVC – Environmental Management of Vector Control.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FNS – Fundação Nacional de Saúde.

IPEPATRO – Instituto de Pesquisa de Patologias Tropicais de Rondônia.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde.

PPM – Parte Por Milhão.

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias.

RESUMO:

Os inseticidas e praguicidas sintéticos são de longa data utilizados no controle de vetores e pragas agrícolas, contudo e apesar do efeito relevante, estes compostos acabam por contaminar o solo, podendo ainda destruir insetos benéficos, onerar o plantio e prejudicar a saúde humana. Ainda neste contexto, freqüentemente é observada a resistência denotada de pragas e vetores ao controle por meio de tais produtos, tornando-os, pois, menos eficientes. Com efeito, uma alternativa atraente para os transtornos e problemas supramencionados é o uso de produtos naturais e o controle biológico, podendo garantir desta forma, maior eficiência e segurança no combate a insetos e pragas nocivas ao homem. O presente trabalho propõe a prospecção por novos nematicidas/bioinseticidas através da análise de extratos vegetais etanólicos obtidos de plantas medicinais comuns na região de Ribeirão Preto-SP e na coleção de plantas da Universidade de Ribeirão Preto: *Tithonia diversifolia*, *Eclipta alba* e *Mikania glomerata* (Asteraceae); *Tabernaemontana catharinensis* e *Mandevilla velutina* (Apocynaceae); *Casearia sylvestris* (Salicaceae); *Zeyheria montana* (Bignoniaceae), *Lippia alba* (Verbenaceae), *Croton antisiphiliticus* (Euphorbiaceae) e *Serjania erecta* (Sapindaceae), devidamente selecionadas por suas propriedades bioinseticidas/nematicidas em potencial e originalidade. Ressalta-se aqui, a padronização de um novo modelo experimental em nossa Unidade de pesquisa, para o estudo rápido e direto de novos nematicidas, e indireto de bioinseticidas, utilizando para tanto os helmintos nematóides *Pratylenchus zeae* e *Pratylenchus jaehni*, pragas de relevância agrícola no país, cuja, a criação e manutenção em nossos laboratórios foram definidas com sucesso neste trabalho. Nossos resultados apontam atividades nematicidas significativas para a maioria dos extratos analisados, destacando-se os

efeitos obtidos com aqueles preparados a partir de *Eclipta alba*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Casearia sylvestris*, *Zeyheria montana* e *Serjania erecta*, pertencentes a famílias de plantas tradicionalmente conhecidas como nematicidas. Salienta-se que o desenvolvimento de ações de pesquisa no sentido da prospecção e avaliação de plantas regionais com atividade nematicida/bioinseticida, de modo direto ou indireto, é de grande interesse econômico, epidemiológico e ambiental, consubstanciando, pois, a importância do presente trabalho.

Palavras-chaves: Bioinseticidas/Nematicidas; Extratos vegetais; *Pratylenchus jaehni*; *Pratylenchus zaeae*; Vetores e pragas agrícolas.

ABSTRACT:

Synthetic insecticides have been used in the combat and control of the agricultural plagues and vectors. Even although their efficacy, those compounds can contaminate the soil, kill valuable insects, burden cultures and harm human health. Also, it has been observed that the control of plagues and vectors have become less efficient due to a significant resistance to such products. An appropriate alternative to solve above mentioned difficulties is the biological control and the use of natural products to assure higher efficiency and safety in the combat of damaging insects and plagues. The aim of this work was the prospection for novel and effective nematocides/bioinsecticides using extracts of medicinal plants native to the region of Ribeirão Preto or cultured in the plant collection at the University of Ribeirão Preto. *Tithonia diversifolia*, *Eclipta alba* and *Mikania glomerata* (Asteraceae); *Tabernaemontana catharinensis* and *Mandevilla velutina* (Apocynaceae); *Casearia sylvestris* (Salicaceae); *Zeyheria montana* (Bignoniaceae), *Lippia alba* (Verbenaceae), *Croton antisiphiliticus* (Euphorbiaceae) and *Serjania erecta* (Sapindaceae), were selected for their potential bioinsecticide/nematocide properties. For the fast and direct study of new nematocides, and indirect study of bioinsecticides an innovative experimental model was standardized using the nematodes *Pratylenchus zeae* and *Pratylenchus jaehni*, helminthic parasites of Brazilian agriculture. The development and maintenance in laboratory was successfully defined in this work. Overall results showed significant nematocide activity of the majority of extracts analyzed though the nematocide potential of *Eclipta alba*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Casearia sylvestris*, *Zeyheria montana* and *Serjania erecta* was evidenced. Considering that the prospection and evaluation of regional

plants with nematocide/bioinsecticide activity, in a direct or indirect way, is of great economic, epidemiologic and environmental interest this work turn out to be of great relevance.

Key words: Bioinsecticides/Nematocides; Vegetal Extracts; *Pratylenchus jaehni*; *Pratylenchus zae*; Agricultural Vectors and Plagues

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O manejo de pragas e vetores por meios convencionais e as novas alternativas.

Inseticidas e praguicidas, como o diclorodifeniltricloreto e o nematicida Carbofuran, são substâncias químicas utilizadas com a finalidade de exterminar ou repelir insetos e pragas danosas à agricultura e a saúde humana. Notadamente, são vantagens requeridas de um dado inseticida/nematicida a sua eficácia em baixas concentrações, isenção de toxicidade para plantas, homem, animais domésticos ou de criação, baixo custo, seletividade, aplicação ou manipulação fáceis e seguras (MARICONI, 1981; SHAALAN *et al.*, 2005).

Os inseticidas e praguicidas derivados de produtos naturais, como o alcalóide nicotina, associado à nornicotina e anabasina, foram largamente utilizados até a década de 40. O surgimento dos compostos sintéticos – desenvolvidos a partir da II Grande Guerra Mundial – acabou substituindo por completo os agentes naturais, particularmente pela promessa de alta potência e amplo espectro de atividade (FERREIRA *et al.*, 2001). Tradicionalmente, os inseticidas e nematicidas mais utilizados têm sido os organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos. Quanto aos de ação nematicida, destacam-se o Carbofuran e o Aldicarb, caracteristicamente reconhecidos pela toxicidade ambiental e humana, amplo espectro de ação, ou ainda quanto aos altos custos e resistência de pragas e vetores alvo (DAS *et al.*, 2001; EPSTEIN & BASSEN, 2003).

Atualmente existem inúmeros produtos químicos utilizados no controle de pragas, contando com mais de 300 ativos distribuídos em mais de 2.000 formulações comerciais, empregados nas mais variadas culturas, finalidades e modos

de aplicação ou uso (LARA & BATISTA, 1992). No entanto, a aplicação desmedida de praguicidas tem originado repercussões desastrosas, como o desaparecimento de algumas espécies de insetos e, conseqüentemente, aparição de novas outras. Além disso, muitas espécies de insetos tornaram-se resistentes a certos controles, o que também motivou a busca de novos produtos, respondendo conjuntamente, pois, pela ampla diversificação de produtos no mercado, como anteriormente mencionado (FLORES *et al.*, 2004).

Estudos têm evidenciado que os praguicidas apresentam alta permanência no ambiente, gerando mudanças ecológicas e efeito ambiental indesejável (SOLOMONS, 1989; ANDRÉA, 2004). Os praguicidas atingem o solo pela incorporação direta na superfície ou através do tratamento de sementes com fungicidas, ou ainda pelo uso de herbicidas no controle de plantas daninhas. Esses compostos podem, ainda, atingir o solo de forma indireta, pela queda de frutos ou folhas que receberam aplicação de agrotóxicos (FLORES *et al.*, 2004). Uma vez no solo, podem ser transportados em quantidades apreciáveis para águas superficiais como rios e lagos, espalhando ainda mais os seus danos e atingindo ecossistemas diferentes. Os praguicidas podem também infiltrar no solo, atingindo as águas subterrâneas utilizadas para o abastecimento de residências ou para o dessedentar de animais de criação (RIGITANO & BARBOSA, 1994; MOREIRA & CRUZ, 1996).

Muitos compostos organoclorados apresentam, freqüentemente, alta resistência à degradação química e biológica, bem como, alta solubilidade em lipídios. A baixa solubilidade em água e a alta capacidade de adsorção nas gorduras corporais levam ao acúmulo desses compostos ao longo da cadeia alimentar atingindo diferentes espécies e o homem (TORRES, 1998). O hexaclorobenzeno é um exemplo de organoclorado

que, apesar de ser classificado como de persistência intermediária, é bastante estável quimicamente, sendo capaz de permanecer no solo por vários anos, fazendo, pois, persistirem os seus efeitos danosos (BERBERT & CRUZ, 1986).

Os níveis de organoclorados na água dos oceanos têm causado sérios transtornos como, por exemplo, a diminuição da produção de trutas-do-mar no Texas, e a população da águia-marinha, no Báltico, por conta da maior fragilidade das cascas de seus ovos durante a oviposição (FLORES *et al.*, 2004). Além disso, atualmente tem sido encontrados golfinhos contaminados com diclorodifeniltricloreto, desde o litoral de São Paulo até regiões longínquas na Antártida (FLORES, *et al.* 2004; CAMPANILLI, 2004).

Devido à ampla utilização e toxicidade, os organofosforados podem apresentar sérios riscos à saúde humana e animal, sobretudo, quando presentes em quantidades abusivas, seja na água, no ar, no solo, nos alimentos ou mesmo por manejo desprotegido ou acidental para quando dos muitos casos de intoxicação humana (LIMA *et al.*, 2001). Embora muitos dos quais estando proibidos ou restritos para o uso, como os organoclorados, a partir da década de 90, verificou-se um novo aumento no emprego de organofosforados na agricultura brasileira, em que pese o esforço e ação esclarecedora das entidades oficiais. Amplamente empregados em todo o país para proteção de diferentes culturas, já foram registrados casos de uso abusivo e indiscriminado em diversas partes do país (MOREIRA, 1995).

Os piretróides são derivados das piretrinas naturais, levando ao aumento da letalidade para os insetos, melhoras das propriedades físico-químicas, aumento da estabilidade à luz e calor, além de menor volatilidade, apesar de sua periculosidade persistente para o homem ainda ser relevante. Introduzidos no mercado em meados da

década de sessenta, sua principal desvantagem são os custos. Atualmente, os mesmos têm emprego mais alargado nas políticas de saúde pública e em alguns setores da agricultura. Isto resulta de suas eficiências, sendo necessárias menores quantidades de produto, o que contribui para uma menor contaminação nas aplicações, levando gradativamente a substituição dos organofosforados (SUCEN, 2002).

Os primeiros carbamatos foram distribuídos para comercialização por volta de 1950. Apresentam atividade inseticida, nematicida, fungicida e herbicida, sendo derivados orgânicos do ácido carbâmico. Os carbamatos usados como inseticidas e nematicidas são derivados do éster de ácido carbâmico. Em geral, são compostos instáveis, particularmente quando expostos à umidade, temperaturas elevadas e luz. São inibidores da enzima colinesterase, embora por mecanismo diferente dos organofosforados, o que não os tornam necessariamente seguros aos homens e ambiente (SUCEN, 2002).

Um dos grandes incentivos à busca por novos agentes naturais tem sido a percepção de autoridades científicas ou mesmo opinião pública de que os produtos naturais podem, na maioria das vezes, trazer grandes vantagens em relação aos inseticidas e nematicidas sintéticos. De modo geral, estes produtos afetam menos o meio ambiente e a saúde humana, por serem, muitas vezes, biodegradáveis (FERREIRA *et al.*, 2001; BOGORNÍ & VENDRAMIM, 2003; DHARMAGADDA *et al.*, 2005). Os agentes naturais são uma boa escolha para substituição de inseticidas e praguicidas sintéticos, podendo ser utilizados na produção de orgânicos ou ainda representar grandes alternativas na produção agrícola e controle de vetores à mais baixos custos (ISMAN, 2006). Aliam-se neste escopo a necessidade crescente pela busca de novos inseticidas/praguicidas, de diferentes naturezas químicas e fontes

biológicas, para correções de potência, resistência e economia, em relação ao arsenal químico ora empregado no controle de pragas e vetores (ISMAN, 2006; SHAALAN *et al.*, 2005).

Considerando as informações supracitadas, o presente trabalho avaliou o potencial nematicida direto, e bioinseticida indireto, de extratos vegetais de plantas medicinais comuns em nossa região, na coleção de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto, nos trabalhos já executados ou em andamento do laboratório de Química de Produtos Naturais (UNAERP/Biotecnologia), por meio de triagem biológica em modelo animal, desenvolvido e padronizado em nossa Unidade, garantindo de tal forma a prospecção por ativos naturais de interesse econômico e epidemiológico.

1.2. Pragas agrícolas e vetores de doenças no Brasil.

1.2.1. Doenças e Vetores.

O meio ambiente assume papel relevante na distribuição das doenças transmitidas por vetores. Água, temperatura e outros fatores como a umidade, densidade da vegetação nativa ou agrícola, condições de saneamento, habitação e cultura podem ser críticos para a sobrevivência de diferentes espécies de vetores transmissores de doenças, comuns em países mais pobres, que acabam por contribuir com o círculo vicioso de pobreza-doença (LOPES, 1997; NEVES, 1998).

O Gerenciamento Ambiental para o Controle de Vetores – (“*Environmental Management for Vector Control*” - EMVC) é uma das estratégias utilizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e de muitas outras agências na administração integrada e controle de insetos vetores, com o objetivo de reduzir a incidência das doenças causadas pelos mesmos. Entretanto, apesar do esforço, os insetos transmitem, no mundo, doenças para cerca de 700 milhões de pessoas/ano, vitimando

cerca de três milhões de doentes, a maioria composta por crianças. Destacam-se como doenças transmitidas por vetores a dengue, malária, febre amarela, leishmanioses, filariose e doença de Chagas, comuns no Brasil e no mundo (NEVES, 1998; ELSTON, 2004).

A situação do Brasil em relação à dengue e ao risco de reurbanização da febre amarela tem se agravado cada vez mais nos últimos anos. Essa situação constitui-se, igualmente, num dos mais expressivos problemas de saúde pública em vários outros países, exigindo avanços na busca de soluções e obtenção de resultados satisfatórios nos programas de controle dos vetores, principalmente (FRANCO, 1969; GLASSER *et al.*, 1999; TOMORI, 2004).

A Dengue foi relatada á alguns séculos, tendo ocorrido epidemias na Ásia, na América do Norte e na África, indicando que há mais de 200 anos, tanto o vetor como as populações de vírus apresentavam ampla distribuição pelos trópicos (PDAMED, 2006). Durante a década de 1980, ocorreram surtos epidêmicos na Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Belize, Honduras, El Salvador, Guatemala e México, levando a grandes mazelas humanitárias e prejuízos de suas respectivas economias. Houve, também, ocorrência de epidemias em países, até então, não atingidos, como: Bolívia (1987), Paraguai (1988), Equador (1988), Peru (1990) e Panamá e Costa Rica (1993). Em 1994, o sorotipo 3 do vírus foi reintroduzido no Panamá, Nicarágua e México, demonstrando, pois, as várias reincididas e expansões da doença ao longo dos tempos (PDAMED, 2006). Em relação ao dengue hemorrágico, pela primeira vez, ocorrida fora dos limites do Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, afetou Cuba (1981). Entre 1981 e 1996, foram notificados, em 25 países, 42.171 casos de dengue hemorrágicos. No Brasil, a primeira epidemia cientificamente documentada

ocorreu em 1982, em Roraima, com circulação dos sorotipos 1 e 4. A partir de 1986, foram registradas epidemias em diversos estados do país, com agravamento do quadro epidemiológico e a introdução e expansão, em várias regiões do país, do sorotipo 2, na década de 90 (PDAMED, 2006). Em 1997, 1998 e 1999 foram notificados, respectivamente, 254.987, 543.507 e 213.405 casos (Fundação Nacional de Saúde – FNS, 1999). Nos anos de 2001 e 2002, foi detectado um aumento no total de casos de febre hemorrágica da dengue, potencialmente refletindo a circulação simultânea de sorotipos de vírus. As maiores epidemias detectadas foram nos anos de 1998 e 2002, com cerca de 530 mil e 800 mil casos notificados, respectivamente, sendo a letalidade por febre hemorrágica mantida em torno de 5% no período de 2000-2003. (PDAMED, 2006).

Outra doença de relevância transmitida por vetores é a Malária, que tem como agentes etiológicos, no Brasil, o *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (PDAMED, 2006). Estima-se que mais de 40% da população mundial esteja exposta ao risco da malária, particularmente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. A malária é endêmica em 53 países na África, em 21 países nas Américas, 04 países na Europa e 14 na região leste do Mediterrâneo e no sudeste Asiático (PDAMED, 2006). A cada ano ocorrem 300 a 500 milhões de casos, com cerca de um milhão de óbitos no mundo. Dos 27,5 milhões de pessoas que viajam para áreas endêmicas, cerca de 20 mil contraem a doença. No Brasil, a área endêmica é conhecida como Amazônia Legal, atingindo, pois, 10 de nossos Estados (PDAMED, 2006). De acordo com dados da Sucen, no Brasil, em 1990, foram notificados cerca de 560.400 casos de malária, onde cerca de 1.800 destas ocorriam no estado de São Paulo. Em 2002, as notificações no Brasil caíram para cerca de 389.800, sendo 230 em

São Paulo. O Brasil no ano de 2003 registrou 407.652 casos de malária, sendo a espécie *P. vivax* responsável por 78,5% dos casos. A Região da Amazônia Legal concentra 99,5% dos casos, tendo sido identificados nesta região 71 municípios como sendo de alto risco para a malária, ratificando o famigerado ciclo de pobreza-doença (PDAMED, 2006).

A Febre Amarela é transmitida pelo vírus amarelo, arbovírus da família Flaviviridae via vetores. A região amazônica no Brasil, e a bacia hidrográfica do Rio Congo, na África, são as principais áreas endêmicas de febre amarela no planeta (FNS, 1999). Entre os anos de 1986 e 1988, ocorreram mais de 30.000 casos na Nigéria com cerca de 10.000 óbitos. Surtos menores também foram relatados em Camarões (1990), Gana (1993-1994), Libéria (1995), Gabão (1994), Senegal (1995) e Benin (1996). Segundo dados da OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde), no período de 1990 a 1998, foram registrados 373 casos de febre amarela silvestre no Peru e 1.050 na Bolívia, respectivamente. A doença tem sido detectada em todos os países do continente americano desde o México até a Argentina, com exceção de El Salvador, Uruguai e Chile. Embora casos esporádicos ocorram todos os anos, seu perfil epidemiológico se caracteriza por apresentar-se em surtos que se manifestam de forma cíclica, conseqüente a epizootias em macacos (FNS, 1999).

Dados os fatos alarmantes sobre a incidência, prejuízos sócio-econômicos de algumas das principais doenças transmitidas por vetores, fica evidenciado que estudos sobre hábitos, ecologia, comportamento, dinâmica de população, bloqueio da interação parasito-vetor, bem como informação, vigilância, colaboração da população, e ainda o desenvolvimento de bioinseticidas mais seguros e potentes são fundamentais para o sucesso do controle de vetores e então ao controle das doenças, aliado ao avanço da

terapêutica curativa, ainda bastante irregular (CAMPANHOLA *et al.* 1995; GIANESSI & CARPENTER, 1999; VINCENT *et al.*, 2003; ISMAN, 2006).

1.2.2 Pragas agrícolas e nematóides.

Grandes e pequenos agricultores têm um problema em comum: as pragas agrícolas que por vezes dizimam toda uma lavoura. Os danos econômicos causados por esse problema são quase sempre relevantes e expressivos (NAKANO *et al.*, 1981; ZUCCHI *et al.*, 1993; HUSSEY & GRUNDLER, 1998). A sustentabilidade ecológica de sistemas agrícolas, face às extensivas áreas de monocultivos, tem-se tornado uma preocupação crescente dos setores envolvidos, principalmente os de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, de assistência técnica, de organizações governamentais e mais recentemente da sociedade em geral.

Pesticidas de síntese química, comumente empregados para a resolução do problema das pragas agrícolas, amenizam parcial e momentaneamente alguns dos danos mais expressivos, contudo, de certa forma contribuíram também para o aparecimento de novas pragas e outros transtornos (CAMPANHOLA, 1990; ANDREI, 1999). Segundo a organização FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), em 1965, há apenas duas décadas do início do atual modelo intensivo de agricultura, encontravam-se registradas 182 pragas agrícolas no mundo, em 1977 o número ascendia a 364. Atualmente, o número de espécies de pragas resistentes aos praguicidas supera as 500. Ainda baseando-nos nos dados da FAO, em 1945 as perdas causadas pelas pragas alcançavam 7% das colheitas, já em 1989 afetavam 13%.

Os nematodos ou nematóides (filo Nematoda) são vermes filiformes que vivem no solo, água doce ou salgada e que parasitam plantas e animais. Os que atacam

plantas, bem menos numerosos que os de vida livre, quase sempre se encontram nas raízes, sendo facilmente encontrados parasitando cafeeiros, algodoeiros, tomateiros, alface, feijão, fumo, cana de açúcar, entre muitas outras lavouras importantes no Brasil e no mundo (MARICONI, 1981; HUSSEY & GRUNDLER, 1998). Quanto à biologia, os nematóides são cilíndricos, alongados, de tamanho variável, tubo digestivo completo, sexo em geral separados (dióicos), e gônadas, em geral, tubulares (NEVES, 1998). A reprodução geralmente é dióica, podendo ser ainda por partenogênese ou hermafroditismo. Os ovos, em seu aspecto mais típico, apresentam três envoltórios, e no seu interior pode-se encontrar ora uma célula-ovo, ora um embrião mais ou menos desenvolvido e ora uma larva completamente formada (REY, 2001). No desenvolvimento pós-embrionário, o nematóide passa por cinco estágios. O embrião que se forma dentro do ovo é a larva de primeiro estágio, e para completar o ciclo pode fazê-lo direta ou indiretamente. No ciclo direto, não há necessidade de hospedeiro intermediário. Geralmente completa-se o ciclo quando instalado em seu hospedeiro (NEVES, 1998).

Os nematóides que sejam pragas agrícolas globalmente distribuídas são representados por várias espécies como *Meloidogyne*, *Heterodera* (Cisto da soja/*Heterodera glycines*), *Globodera*, *Pratylenchus* (Em várias lavouras, incluindo a do café/*Pratylenchus spp*), *Radopholus* (Das lavouras de banana/*Radopholus similis*), *Rotylenchulus* (Das culturas algodão e maracujá/*Rotylenchulus reniformis*), *Nacobbus*, *Tylenchulus* (Dos Citros/*Tylenchulus semipenetrans*), que congregam espécies produtoras de toxinas e sempre caracterizadas pela destruição mecânica de raízes, levando a desnutrição da planta e diminuição da produção agrícola e aumento de

custos com insumos fertilizantes (HUSSEY & GRUNDLER, 1998; CAMPOS, 2002; DAVIS & MITCHUM, 2005).

Postula-se que cerca de 10% de toda a produção agrícola mundial seja inutilizada devido ao ataque de nematóides. Atualmente, existem cerca de 15 mil espécies descritas mundialmente (FAPEMIG, 2006). Calcula-se que estes possam causar prejuízos na ordem de 100 milhões de dólares, principalmente nas culturas de café além de outros cultivos tropicais economicamente importantes, como as de soja, feijão, hortaliças e as fruteiras (EMBRAPA, 2003). A infestação por nematóides, em especial das raízes, pode ocasionar o aparecimento de más formações, alterações de cor, necrose extensiva e infecção por organismos secundários. Os sintomas diretos causados nos sistemas radiculares levam com frequência à manifestação subsequente de sintomas indiretos nas partes aéreas das plantas, decorrentes principalmente de maiores dificuldades na tomada e no transporte de água e nutrientes disponíveis no solo. Além disso, muitas vezes os nematóides espoliam fotoassimilados, utilizando-os para o seu desenvolvimento e reprodução, o que contribui para reduzir, de modo apreciável, o crescimento da planta. Os ataques costumam ocorrer em áreas mais definidas dentro da cultura, chamadas de manchas ou reboleiras (Figura 1) nas quais se observam plantas pouco desenvolvidas, de tamanho irregular, muitas vezes amareladas, que pouco produzem. As perdas agrícolas devidas a nematóides podem variar muito, dependendo da espécie e da cultura hospedeira envolvidas na associação, das condições de solo e clima, do tipo de manejo e outras variantes (HUSSEY & GRUNDLER, 1998; CAMPOS, 2002; WILLIAMSON & GLEASON, 2003; DAVIS & MITCHUM, 2005). Sendo detectado pela primeira vez nas Ilhas Fiji (1891), o *Radopholus similis* se espalhou pelo mundo e é causador de enormes prejuízos nos

bananais do norte mineiro e em outras regiões tropicais ou subtropicais, onde se cultivam estas frutas. Além de espoliar e enfraquecer toda a planta, este verme migrador, facilita a contaminação por outras pragas, como o Mal do Panamá. Frequentemente, as plantas não suportam ação do vento ou o peso do próprio cacho, vindo a tombar. Uma vez introduzido em uma área agrícola, é praticamente impossível sua erradicação pelos meios convencionais de controle químico ou biológico. O nematóide *Tylenchulus semipenetrans* reduz ao redor de 12% a produção mundial de citros/ano (CAMPOS, 2002). No Brasil, as perdas variam, também segundo estimativas, de 5 a 35%, em média, para os diferentes tipos de culturas (anuais, semi-perenes e perenes), sendo impossível cultivar, de modo economicamente viável, certas plantas em áreas infestadas sem que rigorosas e sistemáticas medidas de controle venham a ser implementadas. Este é o caso da cenoura em área infestada por espécies de *Meloidogyne* e de algodão em glebas infestadas por *Rotylenchulus reniformis* e de tantos outros (CAMPOS, 2002).

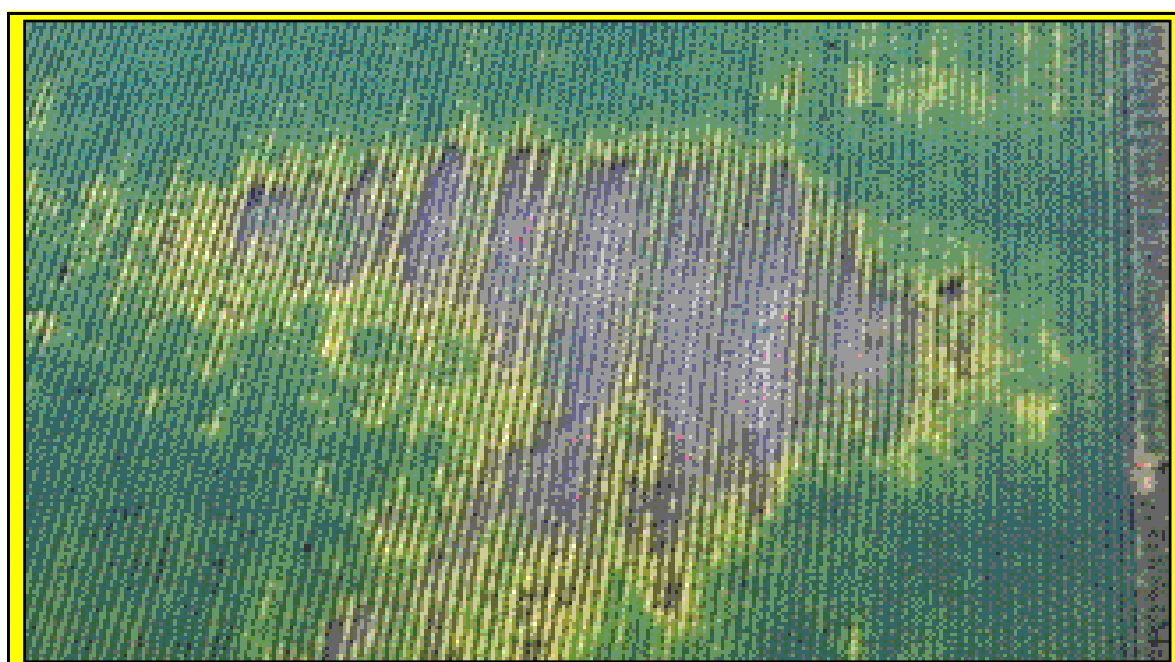


Figura 1: Reboleira em cultura de soja, causada pelo nematóide *Heterodera glycines*. www.nematode.unl.edu

1.2.3. *Pratylenchus* ssp.

As espécies de *Pratylenchus*, objetos fim de nossos estudos, são endoparasitos migradores responsáveis por lesões radiculares ocasionadas pela entrada e movimentação destes no interior das raízes, tendo como consequência lesões necróticas quase sempre provocadas pela ação direta da alimentação, liberação de compostos fenólicos, ou por fungos que penetram nas raízes devido aos ferimentos provocados por estes organismos (Figura 2). Plantas severamente infectadas têm o sistema radicular debilitado e são cloróticas (EMBRAPA, 2000). Por consequência, provocam enormes prejuízos a diferentes tipos de lavouras, como as de cana-de-açúcar, café e milho, bastante comuns na região de Ribeirão Preto-SP.

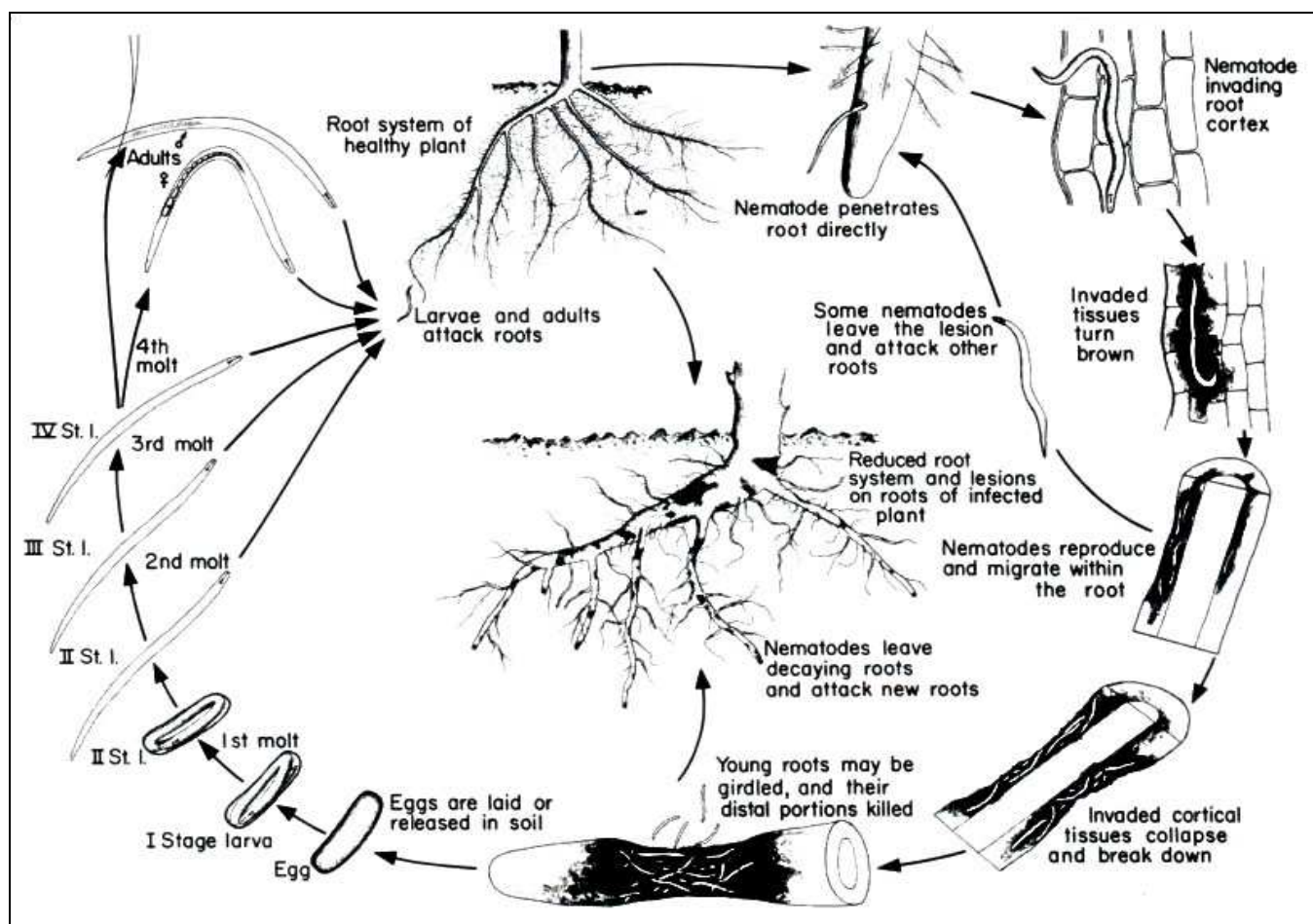


Figura 2: Ciclo de vida dos nematóides do gênero *Pratylenchus*.
Fonte: www.sardi.as.gov.au/pages/fieldcrops

Nas lavouras supracitadas, *Pratylenchus zeae* Graham representa enorme transtorno, devido à patogenicidade, à distribuição, a dificuldade de controle e à alta densidade populacional (CAMPOS, 2002; GARDIM, 2004; KUBO *et al.*, 2004). O *Pratylenchus zeae* (Figura 3) foi descrito por Graham em 1951. Possui corpo delgado, levemente marcado por anéis, campo lateral com quatro incisões que se estendem ao longo da cauda. Na região anterior encontra-se o estilete, estrutura responsável pelas lesões radiculares. Ovoduto indistinto, útero curto, espermateca redonda e pequena. A posição da vulva corresponde à cerca de 68-76% do comprimento do corpo, o intestino com extensão retal curta localiza-se dorsalmente. Os machos são mais raros, por não serem essenciais para reprodução, uma vez que esta pode ser também por partenogênese. Fatores como temperatura, umidade, solo e hospedeiro são determinantes em seu ciclo de vida, como exemplo, em temperaturas por volta de 30°C sua sobrevivência é de cerca de 3 semanas, já em temperaturas em torno de 15°C esse período se estende por até 12 semanas (UEM, 2007). Esta espécie se destaca por ser uma das mais disseminadas. Estima-se que os danos causados por ela em cana-de-açúcar superem os 20% da produção. Eles danificam o sistema radicular das plantas, comprometendo a absorção de água e nutrientes, tendo como consequência, menor desenvolvimento da planta. Além disso, os danos causados por esses fitonematóides podem inviabilizar a utilização dessas áreas para novos cultivos, tornando assim, impróprias para exploração de outras culturas nestas áreas contaminadas.

Resultados demonstram que o controle químico de nematóides na cultura do milho permitiu o aumento da produção de grãos em 39%, em área naturalmente infestada por *Pratylenchus zeae* e *Helicotylenchus dihystera* (CAMPOS, 2002). Há

trabalhos ainda demonstrando um aumento de produtividade de 699 kg/ha. de grãos de milho, em parcelas experimentais, devido ao controle ainda que químico de *Pratylenchus sp* e *Helicotylenchus sp*, justificando desta forma a busca por mecanismos ainda mais eficientes para seu imediato controle (CAMPOS, 2002; SASSER & FRECKMAN, 1987).

O *Pratylenchus jaehni* tem como alvo principal as radículas, responsáveis pela absorção de água e nutrientes, potencializando os danos causados à planta hospedeira. Ele penetra nestas radículas e se desloca dentro das raízes, liberando ovos, perfurando células e matando os tecidos (FUNDECITRUS, 2004). Devido a isso, leva a redução do vigor e pouca resistência à seca às plantas atingidas (Figura 4). As raízes, neste caso, se mostram engrossadas e com alto grau de sujidade. A sintomatologia nas partes aéreas surge em longo prazo e são diretamente relacionadas ao grau de infecção das raízes, devendo ser superior a 1500 fêmeas por grama de raízes frescas. Geralmente, as plantas infectadas apresentam redução no tamanho das folhas e raízes e diminuição de até 20% na produção. Outro agravante, é que além do difícil controle, o *P. jaehni* pode sobreviver no solo a temperaturas elevadas (45°C) por algumas horas (EMBRAPA, 2003).

Desde sua descrição no município de Itápolis-SP (1995) o *P. jaehni* avançou rapidamente para pelo menos outros 18 municípios paulistas até 2004 e atualmente foi registrado em 29 municípios paulistas, 02 mineiros e 03 paranaenses (CALZAVARA *et al.*, 2006). Essa espécie de nematóide é pouco conhecida, mas já é tratada como a mais danosa para a citricultura, o que de certa forma justifica sua escolha em nosso trabalho (FUNDECITRUS, 2004).

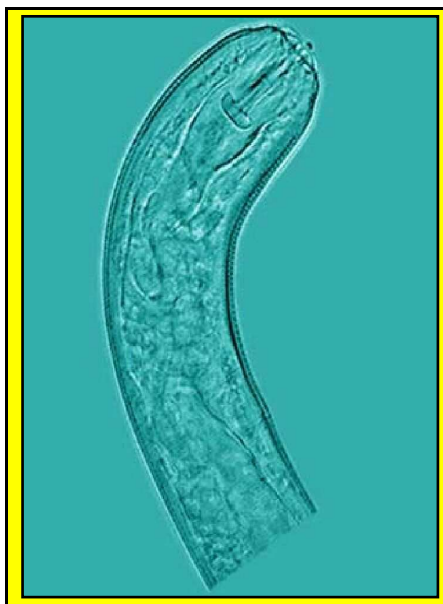


Figura 3: *Pratylenchus zeae*, em microscopia. www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=987



Figura 4: Citrus apresentando sintomas causados pela infestação do *Pratylenchus iahni*. www.fundecitrus.com.br

Embora nem sempre eficiente uma das possibilidades de controle dos nematóides é a rotação com culturas resistentes ou a utilização de coberturas verdes. Este tipo de alternativa demanda planejamento, tempo e investimento financeiro (REHAGRO, 2007). Uma estratégia cada vez mais atraente é o de controle biológico. No entanto, maiores estudos de duração prolongada são requeridos. Atualmente e em que pese seus inúmeros problemas, a alternativa mais comumente utilizada, é o controle químico, notadamente pelo uso de Carbofuran e Aldicarb, referidos como nematicidas, cuja problemática foi anteriormente mencionada (REHAGRO, 2007).

1.3. Plantas com atividade bioinseticida/nematicida.

Repelentes, estimulantes ou inibidores de eclosão e nematotóxicos são exemplos de compostos envolvidos nas interações planta-nematóide, que podem ser constituídos ou formados devido à presença de nematóides. Estas interações têm recebido maior atenção nas últimas décadas devido ao avançar da aleloquímica

(STIRLING, 1991).

Devido à capacidade do reino vegetal em produzir uma incrível variedade de compostos farmacologicamente ativos, muitas pesquisas também vêm sendo realizadas levando-se em conta as interações alelopáticas, buscando substâncias nematocidas em partes de plantas que não estão envolvidas nas interações planta-nematóide, como, por exemplo, folhas e flores (RUESS *et al.* 1998). A literatura científica é repleta de trabalhos demonstrando a atividade inseticida de compostos naturais, sejam extratos brutos obtidos com o uso de solventes polares ou apolares, suas frações, ou até mesmo óleos essenciais e compostos isolados (RONGSRIYAM, *et al.*, 2006; ROJAS, *et al.*, 2006).

Algumas das famílias de plantas selecionadas neste trabalho são largamente estudadas e descritas como tendo atividade inseticida. Neste contexto, na família Apocynaceae, o extrato etanólico de *Nerium indicum* foi avaliada contra larvas em terceiro estágio de *Anopheles stephensi*, apresentando valores de DL₅₀ iguais a 185.99 e 148.05 ppm após 12h e 24h de exposição, respectivamente (SHARMA *et al.*, 2005). O extrato etanólico das folhas de *Nerium oleander* apresentou atividade inseticida contra o segundo estágio larval da mosca *Muscina stabulans* (Diptera: Muscidae) (EL-SHAZY *et al.*, 1996), destacando-se brevemente o potencial biotecnológico desta família.

Para a família Bignoniaceae, a atividade inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* do extrato hexânico do caule de *Cybistrax antisiphilitica*, foi demonstrada por RODRIGUES *et al.*, 2005 que obteve valor de DL₅₀ igual a 26.3 ppm.

Na família Euphorbiaceae, o óleo essencial de *Croton zenhtheri* foi avaliado contra larvas de *Aedes aegypti* e mostrou importante atividade larvicida com DL₅₀ igual

a 28ppm (MORAIS *et al.*, 2006). O extrato etanólico das partes aéreas e da raiz de *Phyllanthus amarus* contra *Tribolium castaneum* foi apresentado por KHANNA *et al.*, 2003. Seis compostos fenólicos obtidos a partir do extrato etanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* mostraram atividade larvícida contra *Spodoptera frugiperda* (URREA-BULLA *et al.*, 2004).

Já na família Verbenaceae, o óleo essencial de folhas e flores *Lanata camara* mostraram atividade inseticida contra larvas em terceiro estágio de *Musca domestica* (ABDEL-HADY *et al.*, 2005). Para testes bioinseticidas contra larvas em terceiro e quarto estágio de *Aedes aegypti* foram testados óleos essenciais extraídos de folhas secas de *Lippia multiflora*, o que apresentou resultados satisfatórios (BASSOLE *et al.* 2003).

Para as Sapindaceae, frações isoladas de *Magonia pubescens* foram testadas contra larvas em terceiro estágio de *Aedes aegypti* mostrando atividade larvícida com valor de DL₅₀ igual a 3.1ppm (SILVA *et al.*, 2004). MACEDO, 2003 relata a atividade inseticida da lectina N-acetilglucosamina purificada de sementes da espécie *Koeleria paniculata* contra larvas em desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* e *Anagasta kuehniella*.

No caso da Asteraceae, TIAN *et al.*, 2006 descreve a atividade inseticida de xantopapinas provenientes da *Xanthopappus subcaulis* em larvas de quarto estágio do mosquito *Aedes albopictus*. O extrato bruto obtido através de extrações frias e de refluxo com aparelho de “soxhlet” das folhas de *Artemisia annua* Linn e *Azadirachta indica* apresentam atividade contra a larva em terceiro estágio de *Anopheles stephensi* (TONK *et al.*, 2006). O óleo essencial extraído de folhas de *Artemisia princeps* e das sementes de *Cinnamomum camphora* apresentaram ação inseticida contra *Sitophilus*

oryzae L. e *Bruchus rugimanus* Bohem em concentração de 1000 µg/g (LIU *et al.*, 2006). Finalmente, *Tagetes spp.* foi descrita, em 1938, como controladora de fitonematóides, principalmente para as espécies dos gêneros *Pratylenchus* e *Meloidogyne*. As espécies de *Tagetes* mais utilizadas para este fim são a *T. patula*, *T. erecta* e *T. minuta* (CHITWOOD, 2002).

Esta breve revisão da literatura serve para apresentar o grande potencial das famílias escolhidas neste trabalho para o desenvolvimento de novos bioinseticidas e nematicidas em potencial. A identificação de compostos fitoquímicos com atividade nematicida/bioinseticida pode gerar grandes benefícios biotecnológicos, seja pela utilização cuidadosa e direta de extratos propriamente ditos ou ainda de compostos isolados desenvolvidos diretamente para o uso ou que sirvam de modelo para o desenvolvimento de derivados sintéticos, com atividade nematicida/bioinseticida potencialmente realçada e menos prejudicial ao meio ambiente e saúde humana/animal (CHITWOOD, 2002).

2. OBJETIVO.

O objetivo geral do presente trabalho é o de realizar a prospecção por novos agentes bioinseticidas/nematicidas a partir de extratos vegetais, além de padronizar um novo tipo de bioensaio em nossa Unidade de Biotecnologia (UNAERP) para a atividade fim.

Dos objetivos específicos deste trabalho:

1. Padronizar a criação e manutenção das culturas de *P. zea* e *P. jaehni* na Unidade de Biotecnologia da universidade de Ribeirão Preto-SP (UNAERP);
2. Realizar o bioensaio “*in vitro*” para a avaliação direta de extratos vegetais com atividade nematicida em potencial *Tithonia diversifolia*, *Eclipta alba* e *Mikania glomerata* (Asteraceae); *Tabernaemontana catharinensis* e *Mandevilla velutina* (Apocynaceae); *Casearia sylvestris* (Salicaceae); *Zeyheria montana* (Bignoniaceae) e *Lippia alba* (Verbenaceae), *Serjania erecta* (Sapindaceae) e *Croton antisiphiliticus* (Euphorbiaceae) contra os nematóides supracitados, estabelecendo os valores de DL₅₀, doses efetivas mínimas e máximas em tempos de exposição definidos (12 e 24 horas);
3. Prover a análise fitoquímica preliminar dos extratos por meio de Cromatografia em Camada Delgada.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Obtenção dos Extratos Vegetais.

Para preparação dos extratos etanólicos vegetais foram utilizados 200 g de folhas secas e moídas de cada uma das 10 espécies das plantas estudadas. O material moído foi submetido à maceração em 1L de etanol absoluto, por 24h, e em mesa giratória, seguida de filtração. O filtrado foi rotaevaporado e novamente submetido a maceração em etanol absoluto por mais 24 horas. O procedimento foi repetido no total de três vezes, e por fim, cada material obtido foi liofilizado até utilização posterior.

3.2. Análises Fitoquímicas Preliminares: Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

A CCD foi realizada em placas de vidro medindo 10 cm X 10 cm, cobertas por uma fina camada de sílicagel (Sigma). Uma amostra de cerca de 0,5 mg de cada um dos extratos foi diluída em aproximadamente 1 mL de metanol absoluto, e aplicada paralelamente em quatro placas cromatográficas distintas. Duas das placas foram colocadas em uma cuba saturada contendo Clorofórmio/Metanol 8:2,v/v e as outras duas placas colocadas em cuba saturada com BAW (Butanol /ácido acético/água 6:1:2 v/v). No momento em que as fases móveis alcançaram o nono centímetro das placas, as mesmas foram retiradas das cubas e levadas para revelação. Duas das placas, uma da cuba com clorofórmio/metanol 8:2, v/v (Figura 7) e uma da cuba com BAW (Figura 9) foram reveladas com solução NP/PEG (Difenilborato de aminoetanol) e as outras duas placas (Figuras 8 e 10) reveladas com vanelina sulfúrica e depois aquecidas em chapa quente. Após a revelação, as placas foram expostas a raios UV ($\lambda=365\text{nm}$).

3.3. Multiplicação das sub-populações de *P. zae* e *P. jaehni*.

As sub-populações de *P. zae* e *P. jaehni* utilizadas no estudo foram multiplicadas “*in vitro*” utilizando-se de cilindros de cenoura. As cenouras selecionadas eram frescas, livres de agrotóxicos, manchas ou contaminação microbiológica visível, apresentando diâmetro aproximadamente constante de 3-5 cm. A quantidade de cenouras empregada variou de acordo com seu comprimento e da quantidade de inóculo que se pretendeu obter.

Inicialmente providenciou-se a desinfecção do material, lavando-se as cenouras com detergente e água corrente, mergulhando-as em seguida em solução de hipoclorito de sódio 0,05% (v/v) por 30 minutos. Após secagem, as extremidades foram descartadas. Na câmara de fluxo laminar, as cenouras foram cortadas em 03 grandes porções, sendo que cada fragmento foi mergulhado em álcool comercial e rapidamente flambado, depois colocado na posição vertical e perfurado com o auxílio de um furador de meio, retirando o cilindro de aproximadamente 4,0 x 2,0 cm e descartando as partes externas (Figura 5). Tais cilindros foram armazenados em recipientes de vidro fechados, previamente autoclavados, e acondicionados por 03 a 04 dias em incubadora B.O.D. a 25°C e umidade aproximada de 40% até a inoculação.



Figura 5: Preparação para multiplicação utilizando cenouras em Fluxo Laminar.
Fonte: Arquivo Pessoal.

3.4. Multiplicação inicial dos Nematóides *P. zeae* e *P. jaehni*.

A primeira cultura e a formação de nossa primeira colônia permanente das espécies *P. zeae* e *P. jaehni* foi realizada conforme a obtenção dos espécimes cedidos pelo Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos (Departamento de Fitossanidade da Unesp de Jaboticabal-SP), nos primeiros 03 meses, daí em diante, a cultura foi mantida em nossas dependências, garantindo o aporte irrestrito de nematóides.

3.5. Extração e axenização e inoculação dos nematóides.

Os nematóides extraídos dos cilindros de cenouras previamente inoculados e mantidos em BOD foram utilizados tanto para os bioensaios “*in vitro*”, descritos abaixo, quanto para o repique e inoculação de novos cilindros de cenoura para manutenção da cultura. Nestes casos, o tempo médio de inoculação era de 90-100 dias, o que corresponde ao quarto estágio de desenvolvimento de *P. zeae* e *P. jaheni*.

O cilindro de cenoura contendo os nematóides foi acrescido de água destilada e submetido à homogeneização em um liquidificador comum. O homogeneizado foi filtrado por um conjunto de tamises sobrepostos (60 e 500 *mesh*, aberturas de 0,250 e 0,025mm respectivamente). Os nematóides coletados em suspensão aquosa do tamis de malha menor foram centrifugados, acrescidos de Caulim a 0,1% (p/v), a 1750 rpm por 5 minutos. Homogeneizou-se então o precipitado em solução de sacarose 53,3% (p/v), seguido de nova centrifugação a 1750 rpm, agora por 1 minuto, e filtração em tamis (500 *mesh*) lavado com água destilada. A suspensão contendo os nematóides axenizados foi então transferida para recipientes adequados, e mediante o auxílio de lupa e estilete adequado foram coletados um a um, transferindo-os então para recipientes contendo água autoclavada (Figura 6).

Como salientado, os nematóides assim obtidos foram empregados nos bioensaios ou novamente inoculados em novas cenouras.

Para inoculação, os nematóides foram agrupados em recipientes especiais, tipo BPI, e acrescidos de Ampicilina (0,1%, p/v) por 10 minutos para desinfestação. Retirou-se então o excesso de antibiótico e adicionou-se novamente água autoclavada por novos 05 minutos, seguido da retirada da água e nova imersão em solução de ampicilina (0,1% p/v) por 10 minutos.

Na câmara de fluxo laminar, substituiu-se novamente o antibiótico pela água autoclavada, coletando os nematóides e aplicando-os na extremidade superior do cilindro de cenoura previamente preparado e já acondicionado em frasco de vidro pelos 03 a 04 dias supramencionados. Ao final do procedimento o material foi levado para incubação em B.O.D. a 25°C e umidade de 40% pelo período de 03 meses, onde nova safra de nematóides foi obtida.

3.6. Bioensaios com os extratos vegetais.

Os ensaios foram realizados colocando-se 20 nematóides por recipiente especial, tipo BPI, num total de sete recipientes por experimento, onde um foi utilizado como controle positivo, um como controle negativo e os restantes para as diferentes concentrações do extrato vegetal. Os experimentos foram repetidos por três vezes para cada extrato em esquema de duplo-cego. Como controle positivo fez-se uso de solução de Carbofuran (Furadan®) na concentração de 700ppm, e para controle negativo, água destilada autoclavada.

Os extratos vegetais liofilizados foram resuspendidos em água destilada autoclavada e utilizados nas concentrações finais de 1000ppm, 500ppm, 250ppm, 125ppm e 62,5ppm. A avaliação da ação dos extratos foi realizada 12h e 24h de

exposição. A ação nematocida foi avaliada pela ausência de mobilidade dos nematóides quando comparados aos controles positivo e negativo. Os valores de DL_{50} foram calculados no programa Microsoft Office Excel 2003 onde a média dos valores em triplicada, representados em porcentagem, para cada condição foi utilizada para cálculo. A análise estatística dos dados foi feita pelo teste *t* Student ($p < 0.05$ e $p < 0,01$).



Figura 6: Coleta de nematóides vidros tipo BPI com auxílio de lupa e vareta. Fonte: Arquivo pessoal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O método de cultivo de nematóides na Unidade de Biotecnologia foi estabelecido com bastante sucesso, pois a partir de uma pequena amostra de indivíduos preparada adequadamente, obteve-se grande oferta destes após três meses de incubação, o que indica que o procedimento é eficaz e obedece aos prazos previstos. Os índices de contaminação microbiológica foram baixos, o que garantiu a sobrevivência das culturas e provou mais uma vez sua eficácia. Atualmente, nossa cultura mostra-se bem estabelecida e capaz de fornecer boa oferta de nematóides e de uma maneira continuada. Durante o período correspondente a este trabalho, muito esforço fora também empenhado na manutenção das colônias afim de que ensaios futuros possam ser realizados.

A escolha das espécies de *P. zae* e *P. jaehni* para nossos bioensaios deveu-se ao interesse agrícola imediato, facilidade de obtenção ou manipulação e devido à rápida reprodução, servindo ainda como modelos importantes para a obtenção de drogas ativas contra outros tipos de nematóides, e muita ainda pela rapidez de execução dos experimentos “*in vitro*”, tornando o método perfeitamente adequado para o acompanhamento da purificação de frações até o ativo isolado. Salienta-se ainda, que as concentrações de ativos ou extratos usadas no protocolo experimental atingem no máximo a ordem do ppm, explicitando, pois, uma outra grande vantagem do modelo proposto, ou seja, a baixa quantidade de material para teste, além da referida rapidez de execução.

A escolha das plantas empregadas neste trabalho está de comum acordo com suas potenciais propriedades bionseticidas/nematicidas e originalidade. Neste caso, a seleção compreende a facilidade de obtenção e ampla distribuição no território

nacional, análise da caracterização fitoquímica, tendo como premissa a presença de classes de compostos conhecidamente ativos contra insetos e nematóides, análise do potencial inseticida/nematicida de outros membros da família e gênero de plantas, bem como quanto ao seu uso popular para a atividade fim. As faixas de concentrações escolhidas foram de tal modo as menores possíveis e abalizadas por testes preliminares ou de acordo com a literatura corrente (DATTA & SAXENA, 2001; ZIA, *et al.* 2001).

De acordo com HUANG, *et al.*, 2004, sesquiterpenos (como hirsutano, dicomitol e dicomitona), possuem atividade nematicida contra *Bursaphelenchus xylophilus*. Ainda, de acordo com KUO *et al.*, 1998, folhas da planta *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) são ricas em lactonas sesquiterpênicas, o que valida desta forma sua presença na triagem biológica. Outras espécies, pertencentes à mesma família da *Tithonia diversifolia*, também trabalhadas e disponíveis no laboratório de Química de Produtos Naturais e em nossa coleção de plantas, são a *Eclipta alba* e a *Mikania glomerata*, justificando assim suas inclusões. Ainda neste contexto, diversas outras plantas da família Asteraceae são fontes valorosas de inseticidas botânicos, corroborando a relevante potencialidade das plantas selecionadas (HITMI *et al.*, 2000).

Terpenóides apresentam amplas atividades inseticidas, destacando-se os limonóides (tetranortriterpenos) (FERREIRA *et al.*, 2001). Folhas de *Lippia Alba* (Mill) são ricas em tais compostos, justificando assim sua inclusão (DO VALE *et al.*, 2002). Outra vantagem é que o mesmo material será objeto de estudos neuroquímicos junto ao Laboratório de Bioquímica e Genômica Funcional de nossa Unidade. Da mesma forma outras plantas presentes em nossa coleção, como a *Zeyheria montana*, que apresenta terpenos e alcalóides, ou a *Casearia sylvestris* e exemplares da espécie

Croton antisiphiliticus, ricas em diterpenos, foram incluídas na triagem biológica (BLOCK, *et al.*, 2005; BAGHDIKIAN, *et al.*, 1999; MACHADO, *et al.*, 2006).

Algumas espécies do mesmo gênero das plantas estudadas foram descritas apresentando flavonóides em sua composição fitoquímica. Entre elas, pode-se citar a *Casearia ilicifolia*, *Casearia esculenta*, *Croton schiedeana*, *Croton cajucara*, *Croton hemiargyreus* entre outras (CHOUDHURY & BASU, 1967; WENIGER, *et al.*, 1982; CARBONELL, *et al.*, 2000; MACIEL, *et al.*, 2000; GUERRERO, *et al.*, 2002). Flavonóides também são mencionados como tendo atividade anti-helmíntica inibindo o crescimento de larvas de *Caenorhabditis elegans* (YOON *et al.* 2006).

A família Apocynaceae apresenta espécies com propriedades inseticidas (EL-SHAZLY, *et al.*, 1999; SARAVANAN, *et al.*, 2004). Pertencentes a esta família enquadram-se as plantas *Tabernaemontana catharinensis* e *Mandevilla velutina*.

A presença de classes de compostos fitoquímicos, como flavanóides, taninos e alcalóides, que de acordo com a literatura científica validam a potencialidade nematocida ou inseticida das folhas de plantas selecionadas neste trabalho são demonstradas nas figuras 7, 8, 9 e 10 e na tabela Y. A coloração amarela presente nas placas reveladas com NP/PEG (Figuras 7 e 9), demonstram a presença de flavonóides. As colorações marrom-avermelhadas conferem a presença de taninos nas placas reveladas com vanilina sulfúrica (Figuras 8 e 10), assim como a coloração azul se refere a alcalóides.

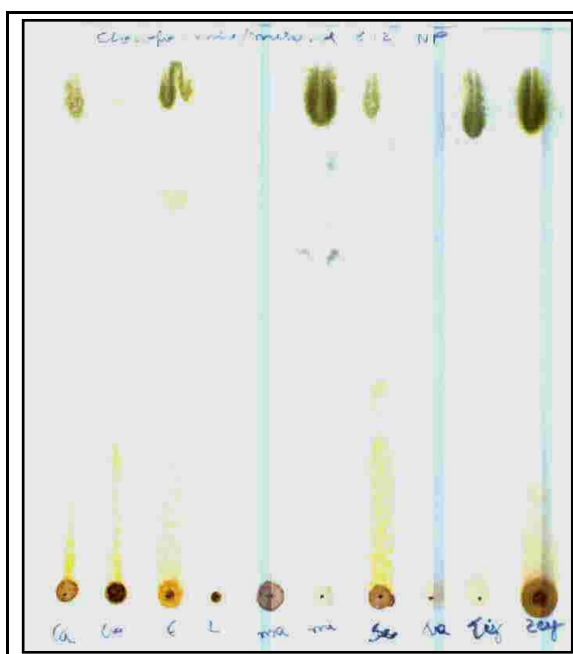


Figura 7: Placa cromatográfica com fase móvel Clorofórmio/Metanol 8:2 revelada com NP/PEG.

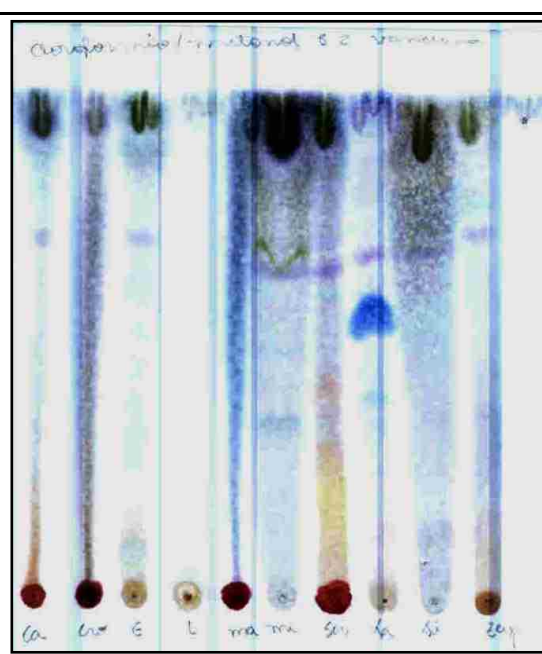


Figura 8: Placa cromatográfica com fase móvel Clorofórmio/Metanol 8:2 revelada com Vanelina sulfúrica.

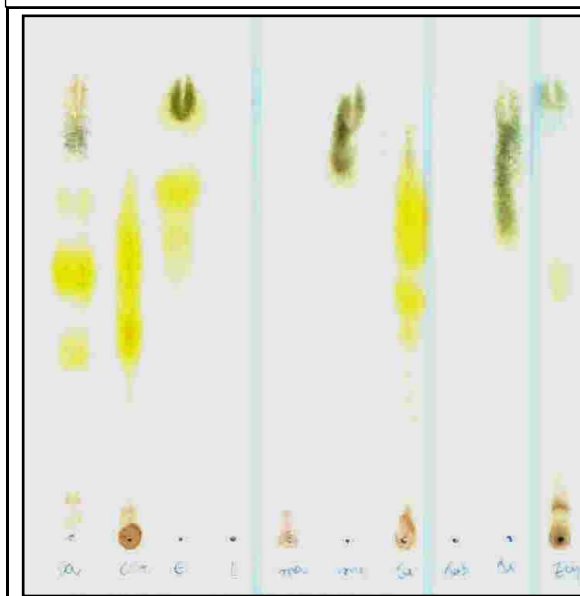


Figura 9: Placa cromatográfica com fase móvel BAW revelada com NP/PEG.

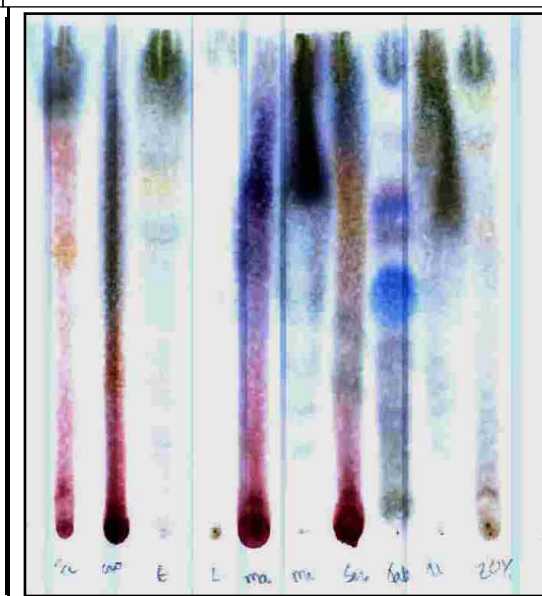


Figura 10: Placa cromatográfica com fase móvel BAW revelada com Vanelina sulfúrica.

Tabela 1: Análise fitoquímica preliminar dos extratos etanólicos das folhas de plantas selecionadas no estudo.

	Flavonóides	Taninos	Alcalóides	Cumarinas
<i>Casearia sylvestris</i>	+	+	-	-
<i>Croton antisiphiliticus</i>	+	+	-	-
<i>Eclipta alba</i>	+	-	-	-
<i>Lippia alba</i>	-	-	-	-
<i>Mandevilla velutina</i>	-	+	-	+
<i>Mikania glomerata</i>	-	-	-	-
<i>Serjania erecta</i>	+	+	-	-
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	-	-	+	-
<i>Tithonia diversifolia</i>	+	-	-	-
<i>Zeyheria montana</i>	+	-	-	-

A padronização inicial dos bioensaios foi realizada em triplicata utilizando-se 20 nematóides por BPI em solução de Carbofuran (nematicida comercial largamente empregado no combate a nematóides) em cinco concentrações diferentes (3ppm, 11ppm, 44ppm, 175ppm e 700ppm) e controle negativo (água destilada autoclavada), em tempos de exposição de 12h e 24h, estabelecendo-se assim uma curva de dose-resposta (Tabela 2). Os resultados desta padronização demonstram que o método é reproduzível e eficaz, além de confirmar a atividade já conhecida do Carbofuran, que será utilizado em experimentos subseqüentes como controle positivo, na concentração final de 700 ppm. A visualização dos nematóides por meio de lupas, não deixa dúvida quanto a paralisia/morte dos helmintos, que uma vez vivos apresentam grande mobilidade.

Tabela 2 – Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisa do *Pratylenchus zae* nos ensaios com Carbofuran. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

Carbofuran	Água destilada autoclavada	3ppm	11ppm	44ppm	175ppm	700ppm
12h	0,00 $\pm$ 0,00	20,00 $\pm$ 5,00*	31,67 $\pm$ 10,41*	31,67 $\pm$ 5,77*	46,67 $\pm$ 10,41*	70,00 $\pm$ 10,00*
24h	10,00 $\pm$ 0,00	50,00 $\pm$ 5,00**	55,00 $\pm$ 5,00**	63,33 $\pm$ 7,64**	95,00 $\pm$ 5,00**	100,00 $\pm$ 0,00**

Os resultados apresentados na tabela anterior ou nas subseqüentes são representados pela média da porcentagem ($\pm$ EPM) de mortalidade/paralisa dos ensaios realizados em triplicata, sendo o Carbofuran 700ppm o controle positivo e a água destilada autoclavada o controle negativo.

As tabelas abaixo representam, em separado, a realização de experimentos em triplicata dos diferentes extratos etanólicos contra *P. zae* ou *P. jaehni* com tempos de exposição de 12 ou 24 horas, sendo que cada grupo controle ou experimental era representado por uma coleção de 20 nematóides por poço BPI. A concentração do Carbofuran (controle positivo-700ppm) foi selecionada tendo por base os resultados obtidos na Tabela 2.

Tabela 3 - Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisa do *Pratylenchus zeae* nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 12 horas de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

12h	Carbofuran 700 ppm	Água destilada autoclavada	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	DL ₅₀ (ppm)
<i>Casearia sylvestris</i>	73,33 $\pm$ 10,4	8,33 $\pm$ 2,89	26,67 $\pm$ 10,41	36,67 $\pm$ 10,41*	53,33 $\pm$ 7,64**	73,33 $\pm$ 2,89**	86,67 $\pm$ 2,89**	198,05
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	81,67 $\pm$ 17,5	10,00 $\pm$ 5,00	31,67 $\pm$ 10,4*	35,00 $\pm$ 15,00*	48,33 $\pm$ 5,77**	66,67 $\pm$ 5,77**	83,33 $\pm$ 2,89**	215,26
<i>Eclipta alba</i>	76,67 $\pm$ 2,89	8,33 $\pm$ 2,89	23,33 $\pm$ 7,64*	31,67 $\pm$ 10,41*	38,33 $\pm$ 11,55*	53,33 $\pm$ 16,07*	81,67 $\pm$ 2,89**	304,08
<i>Serjania erecta</i>	76,67 $\pm$ 5,77	6,67 $\pm$ 2,89	20,00 $\pm$ 8,66	35,00 $\pm$ 5,00*	66,67 $\pm$ 7,64**	81,67 $\pm$ 2,89**	96,67 $\pm$ 2,89**	178,74
<i>Zeyheria montana</i>	76,67 $\pm$ 2,89	11,67 $\pm$ 2,89	30,00 $\pm$ 5,00**	41,67 $\pm$ 5,77**	56,67 $\pm$ 5,77**	78,33 $\pm$ 2,89**	90,00 $\pm$ 0,00**	166,43
<i>Lippia alba</i>	80,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 5,00	13,33 $\pm$ 7,64*	16,67 $\pm$ 5,77*	25,00 $\pm$ 5,00*	28,33 $\pm$ 5,77**	31,67 $\pm$ 7,64**	> 1000
<i>Mandevilla velutina</i>	78,33 $\pm$ 2,89	5,00 $\pm$ 5,00	30,00 $\pm$ 0,00*	35,00 $\pm$ 0,00**	43,33 $\pm$ 2,89**	51,67 $\pm$ 2,89**	61,67 $\pm$ 2,89**	406,01
<i>Tithonia diversifolia</i>	78,33 $\pm$ 2,89	5,00 $\pm$ 5,00	36,67 $\pm$ 2,89*	43,33 $\pm$ 2,89*	53,33 $\pm$ 7,64*	61,67 $\pm$ 2,89**	68,33 $\pm$ 2,89**	199,69
<i>Mikania glomerata</i>	76,67 $\pm$ 2,89	1,67 $\pm$ 2,89	0,00 $\pm$ 0,00	15,00 $\pm$ 5,00*	15,00 $\pm$ 5,00*	25,00 $\pm$ 10,00*	41,67 $\pm$ 2,89**	>1000
<i>Croton antisiphiliticus</i>	80,00 $\pm$ 0,00	3,33 $\pm$ 2,89	20,00 $\pm$ 5,00	23,33 $\pm$ 7,64	31,67 $\pm$ 2,89*	41,67 $\pm$ 2,89**	50,00 $\pm$ 10,00*	>1000

Tabela 4 - Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisa do *Pratylenchus zeae* nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 24 horas de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

24h	Carbofuran 700 ppm	Água destilada autoclavada	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	DL ₅₀ (ppm)
<i>Casearia sylvestris</i>	100,00 $\pm$ 0,00	18,33 $\pm$ 2,89	51,67 $\pm$ 10,41*	63,3 $\pm$ 16,07*	83,33 $\pm$ 2,89**	96,67 $\pm$ 2,89**	100,00 $\pm$ 0,00**	56,94
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	100,00 $\pm$ 0,00	16,67 $\pm$ 2,89	53,33 $\pm$ 16,07	60,00 $\pm$ 17,32	75,00 $\pm$ 0,00*	85,00 $\pm$ 5,00**	100,0 $\pm$ 0,00**	60,04
<i>Eclipta alba</i>	100,00 $\pm$ 0,00	11,67 $\pm$ 2,89	51,67 $\pm$ 5,77**	63,33 $\pm$ 7,64**	76,67 $\pm$ 5,77**	90,00 $\pm$ 0,00**	96,67 $\pm$ 2,89**	55,32
<i>Serjania erecta</i>	100,00 $\pm$ 0,00	11,67 $\pm$ 2,89	40,00 $\pm$ 10,00*	75,00 $\pm$ 0,00**	96,67 $\pm$ 2,89**	98,33 $\pm$ 2,89**	100,00 $\pm$ 0,00*	74,12
<i>Zeyheria montana</i>	100,00 $\pm$ 0,00	13,33 $\pm$ 2,89	55,00 $\pm$ 5,00**	75,00 $\pm$ 0,00**	83,33 $\pm$ 2,89**	98,33 $\pm$ 2,89**	100,00 $\pm$ 0,00**	34,08
<i>Lippia alba</i>	100,00 $\pm$ 0,00	6,67 $\pm$ 2,89	21,67 $\pm$ 10,41	30,00 $\pm$ 13,23	36,67 $\pm$ 10,41*	40,00 $\pm$ 13,2*	45,00 $\pm$ 13,23*	> 1000
<i>Mandevilla velutina</i>	100,00 $\pm$ 0,00	6,67 $\pm$ 2,89	40,00 $\pm$ 5,00*	50,00 $\pm$ 5,00*	56,67 $\pm$ 2,89**	61,67 $\pm$ 2,89**	81,67 $\pm$ 2,89**	145,02
<i>Tithonia diversifolia</i>	100,00 $\pm$ 0,00	6,67 $\pm$ 2,89	65,00 $\pm$ 0,00**	66,67 $\pm$ 2,89**	71,67 $\pm$ 2,89**	76,67 $\pm$ 2,89**	81,67 $\pm$ 2,89**	7,68
<i>Mikania glomerata</i>	100,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	10,00 $\pm$ 8,66	20,00 $\pm$ 5,00	23,33 $\pm$ 7,64	35,00 $\pm$ 8,66*	70,00 $\pm$ 10,00**	553,78
<i>Croton antisiphiliticus</i>	100,00 $\pm$ 0,00	6,67 $\pm$ 2,89	28,33 $\pm$ 2,89*	38,33 $\pm$ 2,89*	50,00 $\pm$ 10,00*	58,33 $\pm$ 12,5*	65,00 $\pm$ 10,00*	289,37

Tabela 5 - Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisa do *Pratylenchus jaehni* nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 12 horas de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

12h	Carbofuran 700 ppm	Água destilada autoclavada	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	DL ₅₀ (ppm)
<i>Casearia sylvestris</i>	81,67 $\pm$ 2,89	11,67 $\pm$ 2,89	20,00 $\pm$ 5,00	28,33 $\pm$ 2,89	40,00 $\pm$ 5,00*	43,33 $\pm$ 2,89**	55,00 $\pm$ 5,00*	747.98
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	66,67 $\pm$ 23,09	20,0 $\pm$ 10,00	18,33 $\pm$ 10,41	25,00 $\pm$ 13,23	30,00 $\pm$ 8,66*	30,00 $\pm$ 0,00**	56,67 $\pm$ 2,89*	825.44
<i>Eclipta alba</i>	83,33 $\pm$ 2,89	10,00 $\pm$ 0,00	16,67 $\pm$ 2,89	28,33 $\pm$ 5,77*	35,00 $\pm$ 5,00*	40,00 $\pm$ 5,00**	50,00 $\pm$ 5,00**	>1000
<i>Serjania erecta</i>	75,00 $\pm$ 5,00	10,00 $\pm$ 5,00	20,00 $\pm$ 5,00	20,00 $\pm$ 5,00*	35,00 $\pm$ 0,00*	38,33 $\pm$ 2,89**	56,67 $\pm$ 14.43*	689.24
<i>Zeyheria montana</i>	63,33 $\pm$ 16,07	6,67 $\pm$ 2,89	21,67 $\pm$ 7,64	21,67 $\pm$ 5,77*	20,00 $\pm$ 0,00*	36,67 $\pm$ 2,89**	45,00 $\pm$ 15,00*	>1000
<i>Lippia alba</i>	75 $\pm$ 5,00	13,33 $\pm$ 2,89	11,67 $\pm$ 2,89	21,67 $\pm$ 2,89	23,33 $\pm$ 2,89	26,67 $\pm$ 2,89*	33,33 $\pm$ 2,89*	>1000
<i>Mandevilla velutina</i>	73,33 $\pm$ 5,77	13,33 $\pm$ 2,89	26,67 $\pm$ 2,89*	30,00 $\pm$ 8,66*	35,00 $\pm$ 5,00**	45,00 $\pm$ 5,00*	50,00 $\pm$ 5,00**	995.15
<i>Tithonia diversifolia</i>	83,33 $\pm$ 2,89	11,67 $\pm$ 2,89	23,33 $\pm$ 2,89*	30,00 $\pm$ 0,00**	36,67 $\pm$ 2,89*	45,00 $\pm$ 5,00*	55,00 $\pm$ 5,00*	715.25
<i>Mikania glomerata</i>	85,00 $\pm$ 5,00	8,33 $\pm$ 2,89	15,00 $\pm$ 5,00	23,33 $\pm$ 2,89*	31,67 $\pm$ 2,89*	38,33 $\pm$ 2,89**	50,00 $\pm$ 5,00**	>1000
<i>Croton antisiphiliticus</i>	73,33 $\pm$ 5,77	13,33 $\pm$ 2,89	16,67 $\pm$ 2,89**	26,67 $\pm$ 2,89*	36,67 $\pm$ 2,89**	43,33 $\pm$ 2,89**	50,00 $\pm$ 5,00**	884.42

Tabela 6 - Média da porcentagem ($\pm$ EP) de mortalidade/paralisa do *Pratylenchus jaehni* nos ensaios com extratos etanólicos resuspendidos em água destilada autoclavada após 24 horas de exposição. Dados representativos de três experimentos independentes, contendo 20 nematóides por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

24h	Carbofuran 700 ppm	Água destilada autoclavada	62,5 ppm	125 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	DL ₅₀ (ppm)
<i>Casearia sylvestris</i>	100,00 $\pm$ 0,00	21.67 $\pm$ 2.89	33.33 $\pm$ 2.89	38.33 $\pm$ 2.89	50.00 $\pm$ 5.00	55.00 $\pm$ 5.00	73.33 $\pm$ 5.77*	322.98
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	100,00 $\pm$ 0,00	20.00 $\pm$ 10.0	31.67 $\pm$ 7.64	35.00 $\pm$ 13.23	38.33 $\pm$ 7.64	41.67 $\pm$ 11.55	70.00 $\pm$ 5.00*	376.60
<i>Eclipta alba</i>	100,00 $\pm$ 0,00	20.00 $\pm$ 5.00	28.33 $\pm$ 2.89*	45.00 $\pm$ 5.00*	51.67 $\pm$ 5.00*	61.67 $\pm$ 2.89**	76.67 $\pm$ 2.89**	212.82
<i>Serjania erecta</i>	100,00 $\pm$ 0,00	23.3 $\pm$ 12.58	30.00 $\pm$ 0.00	28.33 $\pm$ 7.64*	41.67 $\pm$ 2.89*	48.33 $\pm$ 7.64**	76.67 $\pm$ 2.89**	249.50
<i>Zeyheria montana</i>	100,00 $\pm$ 0,00	18.33 $\pm$ 2.89	25.00 $\pm$ 10.00	28.33 $\pm$ 8.16	26.67 $\pm$ 7.64*	56.67 $\pm$ 10.41*	63.33 $\pm$ 17.56*	427.34
<i>Lippia alba</i>	100,00 $\pm$ 0,00	18.33 $\pm$ 2.89	23.33 $\pm$ 2.89	28.33 $\pm$ 2.89	30.0 $\pm$ 0.00*	36.67 $\pm$ 2.89*	41.67 $\pm$ 2.89**	>1000
<i>Mandevilla velutina</i>	100,00 $\pm$ 0,00	21.67 $\pm$ 2.89	33.33 $\pm$ 2.89	36.67 $\pm$ 5.77	43.33 $\pm$ 2.89*	56.67 $\pm$ 2.89**	63.33 $\pm$ 2.89**	330.24
<i>Tithonia diversifolia</i>	100,00 $\pm$ 0,00	17.50 $\pm$ 5.00	30.00 $\pm$ 2.89	42.50 $\pm$ 2.89*	47.50 $\pm$ 5.00*	62.50 $\pm$ 2.89**	75.00 $\pm$ 5.77**	228.27
<i>Mikania glomerata</i>	100,00 $\pm$ 0,00	18.33 $\pm$ 5.77	21.67 $\pm$ 5.77	33.33 $\pm$ 2.89*	41.67 $\pm$ 2.89*	48.33 $\pm$ 2.89**	61.67 $\pm$ 2.89**	467.05
<i>Croton antisiphiliticus</i>	100,00 $\pm$ 0,00	16.67 $\pm$ 2.89	26.67 $\pm$ 2.89	36.67 $\pm$ 2.89*	45.00 $\pm$ 0.00**	51.67 $\pm$ 2.89**	61.67 $\pm$ 2.89**	396.01

Os resultados apresentados acima demonstram excelente eficácia nematicida dos extratos etanólicos quando comparado ao controle positivo e negativo, ou mesmo em alguns casos quando comparados a outros extratos e compostos purificados destacados na literatura científica corrente (ARA *et al.*, 2005; DATTA & SAXENA 2001; ZIA *et al.*, 2001). Na maioria dos casos o efeito nematicida é dose e tempo dependente. Em 12h de exposição, a porcentagem de mortalidade/paralisa apresentada pelos extratos na dose de 1000 ppm foi algumas vezes maior que o próprio controle positivo. Nota-se também a baixa mortalidade/paralisa do controle negativo em todos os ensaios, o que garante a confiabilidade dos resultados apresentados. Muito embora todos os extratos analisados tenham apresentado atividade nematicida, destacam-se os extratos: *Eclipta alba*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Casearia sylvestris*, *Zeyheria montana* e *Serjania erecta*, pertencentes a famílias tradicionalmente conhecidas como nematicidas. Em relação aos valores de DL₅₀, a *Zeyheria montana* e a *Serjania erecta* apresentaram os melhores resultados após 12h de exposição, 166,43ppm e 178,74ppm respectivamente. A *Tithonia diversifolia* apresentou menor valor após 24h de exposição, 7,68ppm. As espécies *Eclipta alba*, *Casearia sylvestris*, *Tabernaemontana catharinensis* e *Serjania erecta* também apresentaram excelentes resultados em relação à DL₅₀ após a exposição de 24h, com valores iguais a 55,32ppm, 56,93ppm, 60,04ppm e 74,12ppm respectivamente. As espécies *Mikania glomerata*, *Croton antisiphiliticus* e *Lippia alba* apresentaram valores de DL₅₀ maiores que 1000ppm após 12h de exposição, mas somente a *Lippia alba* apresentou esse valor relativamente alto após 24h. Denota-se também a grande potência dos extratos, tendo em vista o uso na faixa do ppm. A título de comparação, os valores de DONG, *et al.* 2005 demonstra que a gliocadina C, composto fracionado do extrato alifático da fermentação do

fungo *Gliocadium roseum*, apresentou DL₅₀ maior que 400 ppm, após 24h de exposição, contra a espécie *Bursaphelenchus xylophilus*, nematóide fitopatígeno do pinho. Embora o resultado apresentado por DONG *et al.*, 2005, não seja de fração proveniente de fonte vegetal, e sim microbiológica, é válido pelo fato de provir de uma fonte igualmente natural, útil na comparação de potências. DATTA & SAXENA 2001 apresentaram a ação nematicida para *Meloidogyne incognita* da fração anhidropartinina, lactona sesquiterpênica, presente na *Parthenium hysterophorus*, com DL₅₀ igual a 585ppm. Após 48h de exposição dos nematóides à fração também demonstram que os valores de DL₅₀ apresentados após 24h de exposição de todas as 12 frações provenientes da *P. hysterophorus* analisados, incluindo a partenina, foram maiores que 1000 ppm. A porcentagem de mortalidade descrita por ZIA *et al.* 2001 relacionada ao extrato clorofórmico da *Trigonella foegun-graceum*, na concentração de 1000ppm após 24h de exposição, foi de 38% para *Meloidogyne javanica*. BEGUM, *et al.*, 2000 descreveu atividade nematicida da fração lantanosida, proveniente da espécie vegetal *Lantana camara*, após 24h de exposição contra o nematóide *Meloidogyne incognita*. A concentração utilizada foi de 10.000ppm e a mortalidade apresentada foi de 90%. WILLIAMS *et al.*, 2003 demonstraram que o extrato hexânico bruto de *Cleome viscosa* possui atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita* de 72,69% na concentração de 500ppm após 48h de exposição. ARA, *et al.*, 2005 demonstraram a mortalidade da espécie *Meloidogyne javanica* em fração oleosa (SA-V) do extrato etanólico de *Spatoglossum asperum* na concentração de 1000ppm após 24h de exposição igual a 58%.

Como considerações finais e como supraconsiderado, nematóides e insetos são em alguns casos problemas agrícolas e médico-epidemiológicos relevantes, cujo controle depende essencialmente de progressos biotecnológicos que garantam o

melhor manejo por meio de compostos naturais, controle biológico ou mesmo saneamento básico e educação (OLIVEIRA, *et al.*, 2005; CARVALHO, 2004). A modernização da agricultura acrescentou ao processo de produção de alimentos a utilização de máquinas e equipamentos agrícolas, além de fertilizantes e pesticidas químicos, tornando o sistema altamente dependente de recursos (insumos agrícolas) externos às propriedades rurais. A aplicação dessa tecnologia acarreta o aumento dos custos de produção com conseqüente aumento dos preços dos alimentos, inviabilizando freqüentemente as produções agrícolas (ALMEIDA *et al.*, 2004). Com esse sistema vieram também muitos casos de intoxicações de operadores, aumento da mortalidade de animais domésticos e silvestres, contaminação dos solos, das águas e dos alimentos, aparecimento de pragas resistentes, um conjunto de ocorrências que afeta direta ou indiretamente, a saúde das comunidades envolvidas na produção e consumo de alimentos (JUNIOR *et al.*, 2002). Os enormes custos sociais, ambientais, epidemiológicos e econômicos envolvendo o uso de inseticidas e nematicidas sintéticos têm movido a pesquisa multidisciplinar por novas alternativas no controle de vetores e pragas agrícolas, como a prospecção por novos bioinseticidas e controle biológico, devido as suas vantagens em potencial como supramencionado no delongo da secção introdutória (FERRAZ & FREITAS, 2007).

Dentro deste contexto, é nossa proposta avaliar a eficácia de extratos vegetais não somente contra nematóides, pragas agrícolas relevantes, de um modo direto através do modelo proposto, mas também contra vetores (ovos, larvas, pupas e adultos de Anofelinos e *Aedes aegypti*) por meio da colaboração de nosso laboratório com o Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia (IPEPATRO), sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva. Assim, extratos, e ativos que sejam produzidos ou isolados em ambas Instituições

poderão ser permutados para testes, de tal modo a cumprir a aproximação de grupos de pesquisa, diminuição de custos, permuta de espécies de biomas distintos, e melhoria da estratégia de projeto, de modo a atrelar a preocupação financeiro-agrícola (nematóides) ao viés médico-epidemiológico (vetores). Justifica-se neste caso, que muito embora os nematóides não sejam classificados como insetos, muitos de seus sistemas biológicos, preferencialmente enzimáticos, podem ser vezes similares àqueles encontrados em diferentes classes de insetos, de modo que a permuta de extratos se reflita como lógica e vantajosa (NEVES, 1998; REY, 2001). Neste caso, um método rápido e que necessite de pouca quantidade de ativo, como é o proposto neste projeto, é de grande valia na seleção inicial de extratos com grande potencial aplicável. Neste ínterim, fica claramente explicitada a preocupação de nosso grupo, no delongo deste texto, em não distinguir a discussão de nematicidas e inseticidas, dado ao interesse mais alongado e colaborativo de nossa proposta. Salienta-se ainda, que é de nosso intuito a seleção, dentre os extratos propostos, daquele que se mostre mais vantajoso no quesito potência/toxidade, nos diferentes sistemas de testes, para iniciar a caracterização fitoquímica mais acentuada, purificação de ativos e elucidação estrutural, afim de que talvez possam ser conhecidas/reconhecidas e desenvolvidas mais classes de ativos contra nematóides e insetos, e então novos compostos de interesse epidemiológico e econômico.

Denota-se, finalmente, que o desenvolvimento de ações de pesquisa no sentido da prospecção e avaliação de plantas regionais com atividade bioinseticida/nematicida, em variadas espécies de importância agrícola ou epidemiológica, é de grande importância econômica, assim como para a conservação ambiental dos ecossistemas e saúde animal ou humana.

5. CONCLUSÕES.

A padronização e manutenção da criação de nematóides (*P. zae* e *P. jaehni*) em nossos laboratórios foi bastante satisfatória, bem como a padronização de um novo bioensaio útil na prospecção direta ou indireta de novos nematicidas ou bioinseticidas. Destacam-se como vantagens: a grande oferta de nematóides para os testes em batelada, bem como sua rápida execução, dependência de baixas quantidades de material em teste (ppm), além de sua alta reprodutibilidade e confiança;

Todos os extratos testados apresentaram significativas atividades nematicidas, na maioria dos casos de maneira dose e tempo dependentes, destacando-se os extratos de *Eclipta alba*, *Tabernaemontana catharinensis*, *Casearia sylvestris*, *Zeyheria montana*, *Serjania erecta* e *Tithonia diversifolia*, que apresentou os menores valores de DL₅₀, consubstanciando, pois, o potencial biotecnológico das famílias estudadas no desenvolvimento de novos bioinseticidas/nematicidas. Destaca-se que os valores obtidos são comparáveis aqueles de literatura e demonstram o grande potencial destes extratos na confecção de novos fitocompostos de interesse biotecnológico (nematicida/bioinseticida);

Salienta-se, finalmente e novamente, que a prospecção e avaliação de novos compostos ou extratos com atividade bioinseticida/nematicida é de relevância econômica ou epidemiológica, de modo a amenizar os custos de produção ou ainda com vistas à conservação ambiental dos ecossistemas e cuidados com a saúde humana e animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HADY N. M.; ABDEI-HALIM A. S.; AL-GHADBAN A. M. Chemical composition and insecticidal activity of the volatile oils of leaves and flowers of *Lantana camara* L. cultivated in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 35: 687-698, 2005.
- ALMEIDA, S. A.; ALMEIDA, R. A. C.; SANTOS, N. R.; ARAÚJO, M. E. R.; RODRIGUES, J. P. Activity Insecticide of Vegetable Extracts on *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Rev. Bras. Agrociência*, v. 10, n. 1, p. 67-70, 2004.
- ANDRÉA, M. M. *Contaminação do solo por pesticidas*. Centro de Proteção Ambiental do Instituto Biológico, 2004. Disponível em: <http://www.geocities.com/~esabio/agua/contaminacao_pesticidas.htm>. Acessada em 28/01/2007.
- ANDREI, E. *Compêndio de Defensivos Agrícolas*. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda, 1999.
- ARA, J.; SULTANA, V.; QASIM, R.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; AHMAD, V. U. Biological Activity of *Spatoglossum asperum*: A Brown Alga. *Phytother. Res.* 19: 618-623, 2005.
- BAGHDIKIAN, B.; OLLIVIER, E.; FAURE, R.; DEBRAUWER, L.; RATHELOT, P.; BALANSARD, G. Two new pyridine monoterpene alkaloids by chemical conversion of a commercial extract of *Harpagophytum procumbens*. *J. Nat. Prod.* 62: 211-213, 1999.
- BASSOLE, I. H.; GULBEOGO, W. M.; NEBIE, R.; COSTANTINI, C.; SAGNON, N.; KARBOLE, Z. I.; TRAORE, S. A. Ovicidal and larvicidal activity against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes of essential oils extracted

- from three spontaneous plants of Burkina Faso. *Parasitologia*. 45: 23-26, 2003.
- BEGUM, S.; WAHAB, A.; SIDDIQUI, B. S.; QAMAR, F. Nematicidal Constituents of the Aerial Parts of *Lantana camara*. *J. Nat. Prod.* 63: 765-767, 2000.
- BERBERT, P. R. F. & CRUZ, P.F.N. Níveis residuais de BHC (HCH) nos principais rios e lagos da região cacauzeira sul da Bahia, Brasil. *Theobroma*. 16: 89-96, 1986.
- BLOCK, S.; BRCIK, D.; HUMBERT, P.; QUETIN-LECLERCQ, J. A validated method for the quantification of pimarane and trachylobane diterpenes in the leaves of *Croton zambesicus* by capillary gas chromatography. *Planta Med.* 11: 1036-1039, 2005.
- BOGORNÍ, P. C. & VENDRAMIM, J. D. Bioactivity of aqueous extracts of *Trichilia* spp. on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) development on maize. *Neotropical Entomology*. 32: 23-53, 2003.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Natural bradykinin antagonists. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 86: 195-202, 1991.
- CALZAVARA, S. A.; SANTOS, J. M.; BORELLI, E. R.; FAVORETO, L.; BECARO, C. K. Hospedabilidade de milho, amendoim, sorgo e crotalaria a *Pratylenchus jaehni*. Resumo em Congresso. 2006.
- CAMPANHOLA, C. Resistência de insetos a inseticidas: importância, características e manejo. *Documentos, CNPDA/EMBRAPA* 11: 45, 1990.
- CAMPANHOLA, C.; MORAES, G. J.; SÁ, L. A. N. MENGECH, A. N.; SAXENA, K. N.; GOPALAN, H. N. B. Review of IPM in South America. In: Integrated Pest Management in the Tropics: Current Status and Future Prospects. *John Wiley & Sons*, p.121-152, 1995.

CAMPANILLI, M. *Estudo permite identificar POPs em mamíferos marinhos*. 2004.

Disponível em: <<http://www.estadão.com.br/ext/ciencia/oceanos/sinais/sinais5.htm>>. Acessada em 28/01/2007.

CAMPOS, A. S. *Distribuição dos nematóides-chave do citros no estado de São Paulo e estudo morfométrico comparativo de cinco populações anfimíticas de Pratylenchus sp. de citros e uma de cafeeiro com duas de P. coffeae*. Jaboticabal, 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia). FCAV – UNESP.

CARBONELL, S. A.; DE AQUINO NETO, F. R.; CARDOSO, J. N.; DOS SANTOS PEREIRA, A.; AMARAL, A. C.; BARNES, R. A. Rapid screening of natural products by high-resolution high-temperature gas chromatography. *J Chromatogr Sci*. 38: 234-240, 2000.

CARVALHO, R.S.; Biocontrole das Moscas-das-frutas: Histórico, Conceitos e Estratégias. *Bahia Agríc*. 7(3), 2006.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu, Rev. Phytopathol*. 40: 221-249, 2002.

CHOUDHURY, K. D.; BASU, N. K. Phytochemical and hypoglycemic investigation of *Casearia esculenta*. *J. Pharm. Sci*. 56: 1405-1409, 1967.

DAS, R.; STEEGE, A.; BARON, S.; BECKMAN, J.; HARRISON, R. Pesticide-related illness among migrant farm workers in the United States. *Int. J. Occup. Environ. Health*. 7: 303-312, 2001.

DAVIS, E. L.; MITCHUM, M. G. Nematodes. Sophisticated Parasites of Legumes. *Plant Physiology*. 137: 1182-1188, 2005.

DATTA, S. & SAXENA, D.B. Pesticidal properties of parthenin (from *Parthenium hysterophorus*) and related compounds. *Pest. Manag. Sci*, 57: 95-101, 2001.

- DHARMAGADDA, V. S. S.; NAIK, S. N.; MITTAL, P. K.; VASUDEVAN, P. Larvicidal Activity of *Tagetes patula* Essential Oil against Three Mosquito Species. *Biores. Technol.* 96: 1235-1240, 2005.
- DO VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS, J. G. Jr.; VIANA, G. S. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. *Phytomedicine* 9: 709-714, 2002.
- DONG, J-Y; HE, H-P; SHEN, Y-M; ZHANG, K-Q. Nematicidal Epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocadium roseum*. *J. Nat. Prod.* 68: 1510-1513, 2005.
- EL-SHAZLY, M. M.; NASSAR, M. I.; EL-SHERIEF, H. A. Toxic effect of ethanolic extract of *Nerium oleander* (Apocynaceae) leaves against different developmental stages of *Muscina stabulans* (Diptera-Muscidae). *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 26: 461-473, 1996.
- ELSTON, D. M. Prevention of arthropod-related disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51: 947-954, 2004.
- EMBRAPA. *Doenças provocadas por Nematóides*. 2000. Disponível em <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo/dnematode.htm>>. Acessada em 24/02/2007.
- EMBRAPA. *Pesquisa desenvolve controle biológico para combater nematóides*. 2003. Disponível em <http://www.embrapa.gov.br/noticias/banco_de_noticias/2003/junho/bn.2004-11-25.1370103159/mostra_noticia> . Acessada em 27/01/2007.
- EPSTEIN, L.; BASSEIN, S. Patterns of pesticide use in California and the implications for strategies for reduction of pesticides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 351-375 2003.
- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. *Inimigos*

- Naturais. Bactérias ajudam no controle de parasitas responsáveis por prejuízos na lavoura.* 2006. Disponível em <<http://revista.fapemig.br/materia.php?id=268>>. Acessada em 26/01/2007.
- FERRAZ, S; FREITAS, L. G. O Controle de Fitonematóides por Plantas Antagonistas e Produtos Naturais. Disponível em <www.ufv.br>. Acessada em 03/04/2007.
- FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. *Produtos Naturais no Controle de Insetos - cap. 2.* Editora da UFScar, 1 ed. São Carlos:campus, 2001.
- FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: Um Problema de Saúde Pública. *Ambient. Soc.* 7: 2, 2004.
- FRANCO, O. *História da febre amarela no Brasil.* Rio de Janeiro, 1969. Documento. Ministério da Saúde.
- FNS - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Febre Amarela: Guia de Vigilância Epidemiológica.* Brasília, 1999. Disponível em <www.fns.gov.br>. Acessada em 26/01/2007.
- FUNDECITRUS – Fundo de defesa da Citricultura. *Pesquisadores Estudam a Espécie Mais Danosa de Nematóide.* 2004. Disponível em <http://fundecitrus.com.br/revista/fundec_ed119_pag6a7.pdf>. Acessada em 27/01/2007.
- GARDIM R. *Nematóides atingem os pomares paulistas.* Tribuna Imprensa. Araraquara. Folha Economia regional. p. 13, (17/03/2004).
- GIANESSI, L. P.; CARPENTER, J. E. Agricultural Biotechnology: Insect Control Benefits. In: National Center for Food and Agricultural Policy. *Document.* 1999.
- GLASSER, C. M. *et al.* Dengue no Estado de São Paulo: exemplo da complexidade neste final de século. *Revista CIP.* 2: 11-19, 1999.
- GOPALAN, H. N. B. Review of IPM in South America. In: Integrated Pest

- Management in the Tropics: Current Status and Future Prospects. *John Wiley & Sons*, p.121-152 1995.
- GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRON, R. MARTIN, M. L.; SAN ROMAN, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J Pharm Pharmacol.* 54: 1373-1378, 2002.
- HITMI, A.; COUDRET, A.; BARTHOMEUF, C. The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes species*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35: 317-337, 2000.
- HUANG, Z.; DAN, Y.; HUANG, Y.; LIN, L.; LI, T.; YE, W.; WEI, X. Sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Dichomitus squalens*. *J. Nat. Products.* 67: 2121 - 2123, 2004.
- HUSSEY, R. S.; GRUNDLER, F. M. W. Nematode parasitism of plants. Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes - CAB International Press, p. 213–243 (1998).
- ISMAN, M. B. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66, 2006.
- JUNIOR, C. R.; NOLDIN, J. A.; SANTOS, A. L.; SATO, G.; EBERHARDT, D. S. Toxicidade Aguda de Herbicidas e Inseticidas Utilizados na Cultura do Arroz Irrigado Sobre Juvenis de Carpa (*Cyprinus carpio*). *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente.* 12: 59-68, 2002.
- KETOH, G. K.; KOUMAGLO, H. K.; GLITHO, I. A.; HUIGNARD, J. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia.* 77: 506-510, 2006.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, C. N.; SRIVASTARA, M. M.; SRIVASTAVA, S.

- Insecticidal activity of the plant *Phyllanthus amarus* against *Tribolium castaneum*. *J. Environ. Biol.* 24: 391-394, 2003.
- KUBO, R. K.; OLIVEIRA, C. M. G.; ANTDOMÊNICO, S. R. MONTEIRO, A. R.; FERRAZ, L. C. C. B.; INOMOTO, M. M. Ocorrência de Nematóides do Gênero *Pratylenchus* em Cafezais do Estado de São Paulo - *Nematologia Brasileira* 28: 159-165, 2004.
- KUO Y. H.; CHEN, C. H.; HUANG, S. L. New diterpenes from the heartwood of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. *J. Nat. Prod.* 26: 829-831, 1998.
- LARA, W. H. & BATISTA, G. C., Pesticidas. *Química Nova* 15: 161-166, 1992.
- LIMA, F. J. C.; MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. N.; TANAKA, S. M. C. N. Inseticida Organofosforado Metaminofós: Aspectos Toxicológicos e Analíticos. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente.* 11: 17-34, 2001.
- LIU, C. H.; MISHRA, A. K.; TAN, R. X.; TANG C.; YANG, H.; SHEN, Y. F. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresour. Technol.* 97: 1969-1973, 2006.
- LOPES, J. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. V. Coleta de larvas em recipientes artificiais instalados em mata ciliar. *Rev. Saúde Pública.* 31: 370-377, 1997.
- MACEDO, M. L.; DAMICO, D. C.; FREIRE, M. G.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval

- development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Agric. Food Chem.* 51: 2980-2986, 2003.
- MACHADO, S. R.; GREGORIO, E. P.; GUIMARÃES, E. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Ann. Bot. (Lond.)* 97: 357-369, 2006.
- MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNDERG, N. F.; COLUS, I. M.; FARIAS, R. A.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J. Ethnopharmacol.* 70: 41-55, 2000.
- MARICONI, F. A. M.: *Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas*. Vol. I, Defensivos. 5. ed. São Paulo: Editora Nobel, 1981.
- MORAIS, S. M; CAVALCANTI, E. S.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L.; RODRIGUES, J. R.; CARDOSO, J. H. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 161-164, 2006.
- MOREIRA, L. F. *Diagnóstico dos problemas ecotoxicológicos causados pelo uso de inseticida (metamidofós) na região agrícola de Viçosa - MG*. Viçosa, 1995. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa.
- MOREIRA, L. F. & CRUZ, J. C. S., *Uso correto e seguro de fitossanitários*. EMATER; DETEC; Departamento Técnico, 1996.
- NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. *Entomologia econômica*. Piracicaba: Livrocere, 1981.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 10. ed. Belo Horizonte: Editora Atheneu, 1998.

- OLIVEIRA, R. S.; ROCHA, M. R.; REIS, A. J. S.; MACHADO, V. O. F.; SOARES, R. A. B. Efeitos de Produtos Químicos e Naturais Sobre a População de Nematóide *Pratylenchus brachyurus* na Cultura de Cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 35: 171-178, 2005.
- PDAMED - *Guia Digital de Doenças Infecciosas e Parasitárias 2006*. Disponível em <http://www.pdamed.com.br/doeinfpar/pdamed_0001.php>. Acessada em 26/01/2007.
- RAJASEKARAN, T.; RAVISHANAKAR, G. A.; REDDY, B. O. Production of thiophenes from callus cultures of *Tagetes patula* L. and its mosquito larvicidal activity. *Indian. J. Exp. Biol.* 41: 63-68, 2003.
- REHAGRO – Recursos Humanos no Agronegócio. *A rotação de culturas como ferramenta ao controle de pragas agrícolas*. Disponível em <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1389>>. Acessada em 30/01/2007
- REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. São Paulo:Editora Guanabara Koogan, 2001.
- RIGITANO, R. L. O. & BARBOSA, T. M. L., Influência da classe e profundidade do solo na degradação do inseticida-nematicida aldicarb. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29: 955-960, 1994.
- RODRIGUES, A. M.; de PAULA, J. E.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia*. 76: 755-757, 2005.
- ROJAS, R.; BUSTAMANTE, B.; VENTOSILLA, P.; FERNANDES, I.; CAVIEDES, L.; GILMAN, R. H.; LOCK, O.; HAMMOND, G. B. Larvicidal, antimycobacterial and antifungal compounds from the bark of the Peruvian plant *Swartzia polyphylla* DC.

- Chem. Pharm. Bull.* 54: 278-279, 2006.
- RONGSRIVAM, Y.; TRONGTOKIT, Y.; KOMALAMISRA, N.; SINCHAIPANICH, N.; APIWATHNASORN, C.; MITREJET, A. Formulation of tablets from the crude extract of *Rhinacanthus nasutus* (Thai local plant) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae: a preliminary study. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 37: 265-271, 2006.
- RUESS, L.; MICHELSEN, A.; SCHMIDT, I. K.; JONASSON, D. DIGHTON, J. Soil nematode fauna from a subarctic heath: potential nematicidal action of plant leaf extracts. *Appl. Soil. Ecol.* 7: 111-124, 1998.
- SARAVANAN, K.; SENTHILKUMAR, S.; ELAYARAJA, M.; SURESH, B. Toxicity of *Nerium indicum* Miller seed extract on bandicoot rat, *Bandicota bengalensis* Gray. *Indian. J. Exp. Biol.* 42: 1003-1006, 2004.
- SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A. World perspective on nematology: the role of the society. *Nematology Hyattsville: Society of Nematologists*. 5: 7-14, 1987.
- SHAALAN, E. A.; CANYON, D.; YOUNES M. W.; ABDEL-WAHAB, H.; MANSOUR, A. H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ. Int.* 31:1149-1166, 2005.
- SHARMA, P.; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C. N. Larvicidal potential of *Nerium indicum* and *Thuja orierteilis* extracts against malaria and Japanese encephalitis vector. *J. Environ. Biol.* 4: 657-660, 2005.
- SILVA, H. H.; SILVA, I. G.; dos SANTOS, R, M.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C. N. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37: 396-399, 2004.
- SOLOMONS, T. W. G. *Química orgânica 2*. Livros Técnicos e Científicos, 1989.

- STIRLING, G. R. Conservation and enhancement of naturally occurring antagonists and the role of organic matter. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes*. p.166-185, 1991.
- SUCEN. *Praguicidas*. 2002. Disponível em <http://www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap12cla.pdf>. Acessada em 25/01/2007.
- TIAN, Y.; WEI, X. XU, H. Photoactivated insecticidal thiophene derivatives from *Xanthopappus subacaulis*. *J. Nat. Prod.* 8: 1241-1244, 2006.
- TOMORI, O. Yellow fever: the recurring plague. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 41: 391-427 2004.
- TONK, S.; BARTARYA, R.; MAHARAJ KUMARI, K.; BHATNAGAR, V. P.; SRIVASTAVA, S. S. Effective method for extraction of larvicidal component from leaves of *Azadirachta indica* and *Artemisia annua* Linn. *J. Environ. Biol.* 27: 103-105, 2006.
- TORRES, J. P. M. *Ocorrência de micropoluentes orgânicos (organoclorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em sedimentos fluviais e solos tropicais*. Rio de Janeiro, 1998. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- UEM – Universidade Estadual de Maringá. *Roteiro de Aulas em Nematologia*. Disponível em <www.dag.uem.br/umuarama/prof/cdiasarieira/material/posgrad/roteiros_aulas_nemat.pdf>. Acessada em 22/02/2007.
- URREA-BULLA, A.; SUAREZ, M. M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. *Fitoterapia*. 75: 392-394, 2004.
- VINCENT, C.; HALLMAN, G.; PANNETON, B.; FLEURAT-LESSARD, F. Management of agricultural insects with physical control methods. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 261-281, 2003.

- WENIGER, B.; HAAG-BERRUER, M.; ANTON, R. Plants of Haiti used as antifertility agents. *J. Ethnopharmacol.* 6: 67-84, 1982.
- WILLIAMS, L. A. D.; VASQUES, E.; REID, W.; PORTER, R. Biological activities on an extract from *Cleome viscosa* L. (Caparaceae). *Naturwissenschaften.* 90: 468-472, 2003.
- WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interactions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6: 327-333, 2003.
- YOON, Y. A.; KIM, H.; LIM, Y.; SHIM, Y. H. Relationships between the larval growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by apigenin derivatives and their structures. *Arch. Pharm. Res.* 29: 582-586, 2006.
- ZIA, T.; SIDDIQUI, I. A.; NAZRUL-HASNAIN. Nematicidal activity of *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytother. Res.* 15: 538-540, 2001.
- ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA-NETO, S.; NAKANO, O. *Guia de identificação de pragas agrícolas*. Piracicaba:FEALQ, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)