

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL

ELEONORA OSANA FARINA SARTORI

DESENVOLVIMENTO DE BIOINSETICIDA DE EXTRATO DE FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM (Azadirachta indica A. Juss) E LÍQUIDO DA CASCA DE COCOS VERDES (Cocos nucifera L.)

FORTALEZA – CEARÁ 2017

ELEONORA OSANA FARINA SARTORI

DESENVOLVIMENTO DE BIOINSETICIDA DE EXTRATO DE FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss) E LÍQUIDO DA CASCA DE COCOS VERDES (*Cocos nucifera* L.)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlúcio Roberto Alves.

Coorientador: Prof. Dr. Luis de França Camboim Neto.

FORTALEZA – CEARÁ 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Sartori, Eleonora Osana Farina.

Desenvolvimento de bioinseticida de extrato de folhas desidratadas de nim ("Azadirachta indica" A. Juss.) e líquido da casca de cocos verdes ("Cocos nucifera" L.) [recurso eletrônico] / Eleonora Osana Farina Sartori. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 % pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 99 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, , Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Biotecnologia. Orientação: Prof. Dr. Carlúcio Roberto Alves. Coorientação: Prof. Dr. Luis de França Camboim Neto.

1. Bioinseticida. 2. Pragas. 3. Nim. 4. LCCV, I. Título.

ELEONORA OSANA FARINA SARTORI

DESENVOLVIMENTO DE BIOINSETICIDA DE EXTRATO DE FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss) E LÍQUIDO DA CASCA DE COCOS VERDES (*Cocos nucifera* L.)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 08 de abril de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís de França Camboim Meto (UFC - Presidente)

Profa. Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro
(Unichristus - Examinador)

Prof. Dr. José Ferreira Nunes (UECE - Examinador)

MSc. Antônio Eufrásio Vieira Neto (UNIFOR/RENORBIO - Examinador)

Aos meus pais Violino Gentil José Farina (in memoriam) e Nayr Helena Breitenbach Farina, pela minha vida, minha educação e princípios éticos. Aos meus irmãos Cássio, Ruth, Adalgisa, pelo apoio espiritual e moral. A minha família, querido esposo Enio Sartori e as razões do meu viver, meus amados filhos Vinícius e Arthur, pelo grande amor, carinho, compreensão, paciência e incentivo constantes.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser a luz da minha vida e ter me dado à força tão necessária para chegar ao fim.

Agradeço, antes de todos, aos meus pais Violino e Nayr Helena, por terem me dado a vida, por terem me ensinado a trilhar meus próprios caminhos, com muito amor e respeito ao próximo, nunca me esquecendo de Deus, minha origem e minha dignidade.

Ao meu marido Ênio pelo seu amor, compreensão e muita ajuda.

Aos meus amados filhos Arthur e Vinícius, razão do meu existir, que me motivam, me ajudam a crescer sempre mais e a buscar novos horizontes.

Às minhas irmãs, Ruth e Adalgisa, pelo carinho e preocupação comigo, e também, ao meu irmão Cássio que, apesar da distância, sempre torcem por minha felicidade. Vocês são irmãos maravilhosos!

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial àqueles que serão mencionados.

Ao Prof. Dr. Carlúcio Roberto Alves, pela orientação sempre pertinente e precisa, por acreditar na minha capacidade e por ter me dado à chance de ser sua orientada.

Ao Prof. Dr. José Ferreira Nunes e seus grandes ensinamentos ao longo desta jornada, pela forma cordial e atenciosa através da qual foi possível a concretização deste mestrado, e pelo exemplo profissional a ser seguido.

À Profa. Dra. Cristiane Clemente Mello Salgueiro, pelo apoio, ajuda, amizade e pela constante luta na consolidação do programa.

Ao Prof. Dr. Luís de França Camboim Neto, pela oportunidade, apoio na execução do projeto, dedicação, ensinamentos, paciência e exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. MSc. Antônio Eufrásio Vieira Neto, pelo apoio recebido na execução do projeto, incentivo, ensinamentos e desenvolvimento deste projeto.

Ao amigo Dr. Eduardo de Almeida e Neves pelo grande incentivo em realizar meus estudos, por sua dedicação, suas dicas de grande ajuda.

À Profa. Dra. Ivelise Regina Canito Brasil, atual coordenadora do MPBiotec, pelo apoio recebido no decorrer do curso.

Aos Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira e Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, pelo apoio e oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa na UNIFOR.

Aos amigos Antônio Juvêncio Valverde Orçano Moreira, Francisco Rogênio da Silva Mendes, pela paciência nas análises realizadas nesse trabalho e pelo apoio da Hyldecia Lellis.

Aos amigos companheiros do MPBiotce, que conviveram comigo nesse período de crescimento, Marília, Ticiana, Najla, Geraldo, Ivon, Marcos, Marcello, Juliano, Raimundo, Paulo, Rômulo, Ivna, Mesquita, Heraldo, Everaldo, Ana Virginia, Janyketchuly, Flávio e Nara, que ao longo do tempo, tornaram-se amigos muito queridos.

A todos que direta ou indiretamente tenham participado da realização deste trabalho.

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles".

(Augusto Cury)

RESUMO

O estudo visou desenvolver um bioinseticida à base do extrato aquoso das folhas desidratadas do Nim (Azadirachta indica) e, como substância coadjuvante, o líquido da casca de cocos verdes (LCCV). Foi avaliado o efeito inseticida sobre as espécies de insetos sugadores pulgão (Aphis gossypii) e cochonilha (Dactylopius coccus) em cultivos de limoeiro e berinjela, bem como o grau de sensibilidade das folhas. Bioinseticidas nas concentrações de 10, 20, 50, 80, e 90% de Nim para 90, 80, 50, 20 e 10% de LCCV foram aspergidos em plantas infestadas com pulgão e cochonilha. Após sete dias de aplicação, foram avaliados o aspecto das folhas, o efeito danoso ao plantio e a eficiência quanto à mortandade das pragas. A ação do bioinseticida causa problemas no trato gastrointestinal, afetando a evolução, reduzindo o crescimento, a fertilidade, a fecundidade, e provocando a morte. A concentração de 10% LCCV e 90% Nim do bioinseticida foi mais eficiente. Os resultados da caracterização química, evidenciaram que o extrato de Azadirachta indica tem maior quantidade de proteínas que sua associação com o LCCV, apresentando uma redução devido à influência dos taninos, fenóis e metabólitos. Houve também redução dos carboidratos solúveis no bioinseticida, mas uma quantidade significativa é mantida, o que indica um potencial positivo. O infravermelho comprovou a composição química dos extratos e sugere que um novo composto foi complexado. Conclui-se que a associação do extrato de Nim com o LCCV apresenta atividade inseticida satisfatória e que o bioproduto elaborado se apresenta como uma importante ferramenta biotecnológica no controle e combate de pragas agrícolas.

Palavras-chave: Bioinseticida. Pragas. Nim. LCCV.

ABSTRACT

The study aimed to develop a bioinseticide based on the aqueous extract of dehydrated leaves of Nim (Azadirachta indica) and, as a coadjuvant substance, the green coconut shell liquid (GCSL). The insecticidal effect on insect sucking insect species (Aphis gossypii) and leafhopper (Dactylopius coccus) on lemon and eggplant crops was evaluated, as well as the degree of leaf sensitivity. Bioinseticides at concentrations of 10, 20, 50, 80, and 90% Nim to 90, 80, 50, 20 and 10% GCSL were sprayed on plants infested with aphid and mattress. After seven days of application, leaf appearance, damaging effect to planting and efficiency of pest mortality were evaluated. The action of the bioinsecticide causes problems in the gastrointestinal tract, affecting the evolution, reducing the growth, the fertility, the fecundity, and causing the death. The concentration of 10% GCSL and 90% Nim of the bioinsecticide was more efficient. The results of the chemical characterization showed that Azadirachta indica extract has a higher amount of protein than its association with GCSL, showing a reduction due to the influence of tannins, phenols and metabolites. There was also a reduction of the soluble carbohydrates in the bioinsecticide, but a significant amount is maintained, which indicates a positive potential. Infrared proved the chemical composition of the extracts and suggests that a new compound was complexed. It is concluded that the association of the Nim extract with the GCSL presents satisfactory insecticidal activity and that the bioproduct elaborated presents itself as an important biotechnological tool in the control and combat of agricultural pests.

Keywords: Bioinseticide. Pests. Nim. GCSL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Variação temporal da concentração de azadiractina nas	
	folhas de Nim	30
Figura 2 -	Partes da planta de Nim: folhas, flores, frutos, tronco e	
	sementes	35
Figura 3 -	Partes constituintes do coco	41
Figura 4 -	Representação de ligação depsídica formada entre o grupo	
	fenólico superior e o grupo inferior de uma unidade de	
	ácido gálico na estrutura de taninos hidrolisáveis	45
Figura 5 -	Estrutura de taninos condensados	46
Figura 6 -	Foto do tanque de armazenamento do líquido da casca de	
	cocos verdes (1) e fibras das cascas de cocos verdes (2)	51
Figura 7 -	Fluxograma do procedimento para obtenção do extrato da	
	planta de Nim	52
Figura 8 -	Foto de folhas de Nim após seis dias de desidratação (1) e	
	folhas após trituração (2)	53
Figura 9 -	Preparo da solução: frasco verde com extrato de Nim e	
	frasco marrom com LCCV (1); bioinseticida (2)	54
Figura 10 -	Fluxograma do procedimento de preparação do inseticida	55
Figura 11 -	Casa de vegetação, Euzébio, Ceará	56
Figura 12 -	Foto do sítio localizado no Garrote Village II, Caucaia,	
	Ceará	57
Figura 13 -	Foto da obtenção do extrato das folhas de Nim	61
Figura 14 -	Análise do efeito do bioinseticida pela observação através	
	de microscopia óptica	68
Figura 15 -	Solução Ideal - SI (90% nim + 10% LCCV), fita Iaranja	70
Figura 16 -	SX (10% LCCV + 90% Água), fita azul	71
Figura 17 -	SY (90% Nim + 10% Água), fita rosa	71
Figura 18 -	Fotos ilustrativas de folhas naturais (1) e folhas	
	desidratadas (2) de Nim utilizadas na preparação dos	
	extratos	72
Figura 19 -	Imagem das folhas de limoeiro no 1º dia da aspersão.	

	Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim + 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água (fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)	73
Figura 20 -	Imagem das folhas de limoeiro no 3º dia da aspersão.	
	Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim	
	+ 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas	
	verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3	
	= 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água	
	(fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas	
	desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)	73
Figura 21 -	Imagem das folhas de limoeiro no 5º dia da aspersão.	
	Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim	
	+ 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas	
	verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3	
	= 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água	
	(fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas	
	desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)	74
Figura 22 -	Imagem das folhas de limoeiro no 7º dia da aspersão.	
	Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim	
	+ 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas	
	verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3	
	= 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água	
	(fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas	
	desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)	74
Figura 23 -	Quadro de fotos ilustrativas dos escores atribuídos na	
	avaliação dos danos do bioinseticida nas folhas do	
	limoeiro (Citrus x limon)	76
Figura 24 -	Quadro de fotos ilustrativas dos escores atribuídos na	
	avaliação dos danos do bioinseticida nas folhas berinjela	
	(Solanum melongena)	77

Figura 25 -	llustração da realização da espectrofotometria	no	
	equipamento Nanodrop		79
Figura 26 -	Amostras precipitadas por ácido tricloroacético		80
Figura 27 -	Fotos ilustrativas dos tubos com as amostras (1)	e da	
	leitura em espectrofotômetro Ultrapec (2)		85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Espectro infravermelho do extrato de Nim	81
Gráfico 2 -	Espectro infravermelho do bioinseticida	81
Gráfico 3 -	Curva padrão da glicose	86

LISTA DE QUADROS

Quadro1 -	Representação dos compostos ativos da planta Nim de	
	maior relevância	39
Quadro 2 -	Caracterização do liquido da casca de cocos verdes	44
Quadro 3 -	Esquema da formulação do bioinseticida	54
Quadro 4 -	Soluções isoladas dos extratos	56
Quadro 5 -	Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o	
	uso da solução bioinseticida S1 (10% de Nim + 90% de	
	LCCV)	62
Quadro 6 -	Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o	
	uso da solução bioinseticida S2 (20% de Nim + 80% de	
	LCCV)	63
Quadro 7 -	Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o	
	uso da solução bioinseticida S3 (50% de Nim + 50% de	
	LCCV)	64
Quadro 8 -	Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o	
	uso da solução bioinseticida S4 (80% de Nim + 20% de	
	LCCV)	65
Quadro 9 -	Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o	
	uso da solução bioinseticida S5 (90% de Nim + 10% de	
	LCCV)	66
Quadro 10 -	Resultado da avaliação das folhas de limoeiro através de	
	microscopia óptica	69
Quadro 11 -	Resultado da segunda aplicação do bioinseticida e	
	inseticidas testemunho	70
Quadro 12 -	Concentração proteica no LCCV (mg/ml)	79
Quadro 13 -	Concentração proteica no extrato aquoso das folhas de	
	Nim (mg/ml)	79
Quadro 14 -	Preparo das amostras da curva padrão	83
Quadro 15 -	Leitura da curva padrão	84
Quadro 16 -	Leituras do extrato de Azadirachta indica	85
Quadro 17 -	Leituras do bioinseticida (Nim + LCCV)	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies vegetais utilizadas nos testes	57
Tabela 2 -	Avaliação das folhas após sete dias de aplicação do	
	bioinseticida	67
Tabela 3 -	Escala de nota (0 a 5) para avaliação de danos pelo	
	bioinseticida nas folhas de limoeiro (Citrus x limon)	76
Tabela 4 -	Escala de nota (0 a 5) para avaliação de danos pelo	
	bioinseticida nas folhas de berinjela (<i>Solanum</i>	
	melongena)	77
Tabela 5 -	Mortandade das pragas pulgões e cochonilhas tratadas	
	com diferentes concentrações do bioinseticida	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C Graus Celsius

μg Microgramas

μl Microlitros

2D-PAGE Eletroforese bidimensional

BSA Albumina sérica bovina

DSV Departamento de Sanidade Vegetal

EMAPE Nutrisa Nutrimentos Agropastoril

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FATENE Faculdade de Tecnologia no Nordeste

FTIR-ATR Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Feurier

IAPAR Instituto Agrônomo do Pará

LCCV Líquido da casca de cocos verdes

M Molar

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mcg/ml Micrograma por mililitro mg/ml Miligramas por mililitro

min. Minutos

ml Microlitros mM Milimolar

pH Potencial hidrogeniônico

TCA Ácido Tricloroacético

UNIFOR Universidade de Fortaleza

UV-VIS Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	PRAGAS E ELENCO DE AMEAÇAS À LAVOURA	23
2.2	COCHONILHA E PULGÕES	24
2.2.1	Cochonilha (<i>Dactylopius coccus</i>)	24
2.2.1.1	Medidas de controle	25
2.2.2	Pulgões (Aphidoidea)	26
2.2.2.1	Medidas de controle	27
2.3	NIM (Azadirachta indica A. Juss)	27
2.3.1	Cenário histórico da planta de Nim no Brasil	29
2.3.2	Variação da sazonalidade	29
2.3.3	As propriedades da planta de Nim	30
2.3.3.1	Flores	31
2.3.3.2	Pólen	31
2.3.3.3	Frutos e sementes	31
2.3.3.4	Folhas	32
2.3.3.5	Casca e resina	33
2.3.3.6	Madeira	33
2.3.3.7	Torta	33
2.3.4	Os variados usos da planta de Nim	34
2.3.5	Compostos ativos extraídos da planta de Nim	35
2.3.6	Mecanismos de ação da planta de Nim	37
2.3.7	Procedimentos para coleta de folhas e preparação do	
	extrato aquoso de Nim	39
2.4	LÍQUIDO DA CASCA DE COCOS VERDES (Cocos nucifera L.)	40
2.4.1	O cultivo do coco no Brasil	40
2.4.2	A utilização da casca de cocos verdes como adsorvente	42
2.4.3	O processo de produção do líquido da casca de cocos	
	verdes	43
2.4.4	Caracterização química do LCCV	44
245	Os taninos e suas atividades hiológicas	44

2.4.6	A importância do LCCV na elaboração do bioinseticida	46
2.5	INSETICIDAS E FIXADORES NATURAIS E ARTIFICIAIS	47
2.5.1	O uso de adjuvantes para fixação do inseticida na aplicação	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	REAGENTES	50
4.2	EQUIPAMENTOS	50
4.3	EXTRATO DE LCCV	50
4.4	EXTRATO DE FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM	51
4.5	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS BIOINSETICIDA	53
4.6	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS EXTRATOS ISOLADOS.	55
4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BIOINSETICIDA SOBRE AS	
	PRAGAS	56
4.7.1	Primeira aplicação do bioinseticida nas várias composições	56
4.7.2	Segunda aplicação do bioinseticida e inseticidas	
	testemunho	57
4.8	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DO BIOINSETICIDA	58
4.8.1	Determinação do teor de proteínas totais- ensaio de	
	Bradford	58
4.8.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de	
	Fourier (FTIR-ATR)	58
4.8.3	Determinação de carboidratos solúveis e substâncias	
	relacionadas pelo método colorimétrico de Dubois	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	EXTRATO DAS FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM	61
5.2	ANÁLISES DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DO BIOINSETICIDA	
	NAS VÁRIAS COMPOSIÇÕES	62
5.3	MICROSCOPIA ÓPTICA DAS FOLHAS	67
5.4		
	ANÁLISES DA SEGUNDA APLICAÇÃO DO BIOINSETICIDA E	
	ANÁLISES DA SEGUNDA APLICAÇÃO DO BIOINSETICIDA E INSETICIDAS TESTEMUNHO	69
5.5		69 72

5.6	AVALIAÇÃO DAS FOLHAS TRATADAS	75
5.7	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DO BIOINSETICIDA	78
5.7.1	Determinação do teor de proteínas totais pelo método	
	Bradford	78
5.7.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de	
	Fourier (FTIR-ATR)	80
5.7.3	Determinação de carboidratos solúveis e substâncias	
	relacionadas pelo método colorimétrico de Dubois	83
6	CONCLUSÃO	87
7	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergente necessidade de fazer novas pesquisas de alternativas de combate às pragas, buscando novos inseticidas e recursos aos agricultores, minimizando prejuízos, resistência das pragas e baixo impacto ambiental.

As pragas analisadas neste estudo foram a Cochonilha e o Pulgão. As cochonilhas são muito resistentes e atacam as plantações e os jardins, alojando-se na parte inferior das folhas, frutos e troncos, formando uma camada branca, parecida com algodão, favorecendo o crescimento de fungos (a fumagina). Os pulgões são insetos muito pequenos que sugam a seiva da folha, provocando amarelecimento, deformação e enrugamento, levando à morte pelo enfraquecimento generalizado.

A flutuação da população de pulgões e cochonilhas pode variar também de uma cultura para outra, assim como entre cultivares de uma mesma espécie hospedeira.

A Azadiractina indica é uma planta multifuncional, a qual se desenvolve no Nordeste, devido às condições climáticas, tendo uma produção abundante. É uma planta medicinal usada há séculos na Índia, sua utilização se dá em vários segmentos devido às suas propriedades bactericidas, fungicidas, nematicidas, medicinais, anti-inflamatória, hipoglicemiante, entre outras. As folhas têm gosto amargo, sendo eficaz contra insetos e traças. Possuem propriedades antifúngicas e antibacterianas. Apresentam proteínas, cálcio, minerais, fósforo, tirosina entre outros.

É possível extrair das partes da planta de Nim aproximadamente 24 compostos com atividades biológicas, como esteroides, cetonas, carotenoides e triterpenoides, contudo apenas quatro desses (azadiractina, salanina, melantriole, nimbina) têm elevada ação pesticida.

A *A. indica* apresenta maiores efeitos pesticida, mas seu maior percentual está na semente, que age na metamorfose do ciclo vital do inseto. Para facilitar a obtenção e a manipulação do extrato, foram utilizadas as folhas, que apresentam a salanina, o melantriol e a nimbina em maior quantidade. Elas agem inibindo a alimentação, provocando a perda de apetite, gerando o enfraquecimento e morte.

O mecanismo de ação inseticida tem variação conforme a espécie, afetando a evolução, reduzindo o crescimento, a fertilidade e a fecundidade e provocando deformações celulares.

O extrato aquoso da folha desidratada do Nim é eficiente em diversos tipos de praga, e mais eficaz se adicionado a uma substância coadjuvante na pulverização, como um espalhante adesivo, no caso escolhido, o líquido da casca de cocos verdes.

O Cocos nucifera fornece uma diversidade de usos e aplicações, como a casca para artesanato, o óleo de extrato do coco no segmento medicinal e cosméticos, a água como auxiliar na desidratação, antioxidante, previne problemas cardiovasculares e inflamatórios. A casca do coco verde tem gerado problemas ambientais, armazenados de forma incorreta, acumulando nos aterros sanitários. A extração do líquido da casca de cocos verdes é resultado da trituração e prensagem dos mesmos. Em análises laboratoriais, foram identificados carboidratos e compostos como cálcio, potássio, sódio, magnésio (cátions) e bicarbonato, cloreto e sulfato. Apresentam grandes quantidades de taninos, que são compostos fenólicos, muitos reativos, sob as formas de ésteres e heterosídeos. Apresenta ação fungicida.

De acordo com registros na área de administração agrícola, o uso dos defensivos tem considerável expressão no segmento como fator de elevação da taxa do Produto Interno Bruto. Os investimentos e as respostas do mercado internacional incentivaram os produtores a investirem em novos recursos e na busca de melhores alternativas no combate de pragas e nas doenças que causam nas culturas. Este fato pode ser medido pelo expressivo crescimento de vendas de produtos inseticidas e fungicidas que, no ano de 2011, representaram de 35% a 27% do montante consumido. Já no ano de 2016, com relação ao mesmo período de 2015, a indústria de defensivos teve as maiores cotações.

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um bioinseticida à base do extrato de folhas desidratadas de Nim associado ao líquido da casca de cocos verdes (LCCV), avaliando sua obtenção, manipulação e aplicabilidade no combate das pragas pulgão e cochonilha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRAGAS E ELENCO DE AMEAÇAS À LAVOURA

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – elaborou um relatório, disponibilizado em agosto de 2015 no portal www.brasil.gov.br e publicado no Diário Oficial da União, contendo as pragas de maior poder de destruição que ameaçam a lavoura brasileira. Para o Departamento de Sanidade Vegetal (DSV) há uma emergente necessidade de encontrar novas formas de combate a essas pragas e disponibilizar novos recursos aos agricultores, evitando maiores prejuízos (PORTAL BRASIL, 2015).

Dentre os elencados no relatório estão o Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), praga que se adapta às diversas condições ambientais e que causa considerável redução de rendimento de algumas culturas como o feijão e a soja (NAPOLEÃO *et al.*, 2001); a ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizie*), fungo que danifica o desenvolvimento causando a desfolha precoce, interrompendo a formação completa dos grãos e queda na produtividade; a Broca do Café (*Hypothene mushampei*), um pequeno besouro que, em fase adulta e fecundada, cria uma galeria na polpa para alcançar as sementes e depositar ali seus ovos que, ao eclodirem, se alimentam, destruindo parcialmente os grãos até causar perda total e a Mosca branca (*Bemisia tabaci*), uma espécie de praga que atinge diversas culturas (polífaga), causando alterações no sistema de reprodução da planta, impedindo seu desenvolvimento e comprometendo a qualidade de seus frutos, sendo considerada uma das grandes ameaças à lavoura dos últimos anos (SODEPAZ, 2006).

A Spodoptera frugiperda ou lagarta-cartucho, é uma das várias outras ameaças as lavouras, atacando as plantações de milho em suas fases vegetativas, de desenvolvimento e reprodutivas, classificando-se em uma das mais importantes para os agricultores dado o prejuízo que causa, atingindo aproximadamente 38% de perda na produção (CRUZ, 1996). O combate a esse tipo de praga é realizado com uso de inseticidas sintéticos, embora se tenha buscado alternativas de menores custos e menor índice de prejuízo ao meio ambiente. Uma dessas alternativas é a formulação de derivados com extratos de plantas, sendo o Nim uma delas, por

apresentarem resultados satisfatórios (VIANA; PRATES, 2003, 2005; VIANA *et. al.*, 2007).

2.2 COCHONILHA E PULGÕES

O desenvolvimento de programas e ferramentas para o combate e controle das pragas será potencializado com eficácia a partir do conhecimento das características específicas dos insetos sugadores. A literatura atual aponta que a dinâmica de ocorrência quantitativa populacional apresenta variações consideráveis, de acordo com o local, com a cultura e o período do ano. Esse fato é justificado por uma série de fatores ambientais que incidem diretamente no ciclo de vida dos insetos (FURTADO; ROSELAYNE, 2007).

Insetos como a cochonilha e o pulgão são caracterizados como sugadores por apresentarem aparelho bucal alongado, chamado de rostro, similar ao bico, com presença de estiletes perfurantes, projetados especificamente para a extração da seiva vegetal (FURTADO; ROSELAYNE, 2007).

2.2.1 Cochonilha (*Dactylopius coccus*)

Das inúmeras pragas que atacam as plantações e os jardins, as que demonstram maior resistência e dificuldade de erradicação são as cochonilhas (Hemiptera: Diaspididae). Da ordem homóptera e da família Coccoidea, sua alimentação está concentrada nas seivas da planta, favorecendo o surgimento de fungos por secretar uma substancia adocicada, o que acaba atraindo grandes quantidades de formigas (FARINHA, 2014).

As fêmeas pertencentes à família não se locomovem, nem possuem asas, parecendo mosquitos, não apresentam peças bucais e possuem um abdômen prolongado. Os machos da espécie possuem um par de asas ou, em raras exceções, podem não apresentar também. Seu desenvolvimento se dá pela deposição de ovos, eclodindo as ninfas, que, em seu primeiro estágio, têm pernas que facilitam a locomoção; no estágio seguinte, pernas e antenas ficam atrofiadas e o inseto se fixa num determinado local e permanecendo lá. A ninfa cria uma espécie de capa de cera, como uma escama, chamada de carapaça. Dentre outras famílias

de cochonilhas, podemos citar a Margarodidae, Lacciféridae, Kermidae, Eriococcidae, Ortheziidae e Coccidae, apresentando formas e cores variadas (FARINHA, 2014).

As cochonilhas podem estar alojadas principalmente na parte inferior das folhas, ou nos frutos, ramos, troncos e ainda detectadas nas raízes. Algumas espécies têm corpo mole e revestido por uma camada branca, parecida com algodão, outras têm carapaça arredondada e resistente. Uma característica predominante da espécie é o fato de seu excremento ser composto por uma substância de conteúdo adocicado, resultado da mistura de carboidrato, aminoácido e água chamada *honey-dew*, oriundo do acúmulo de seiva que suga da planta, o que gera uma debilitação da planta, já que acaba atraindo outras espécies de insetos, como as formigas, potencializando os danos à planta. O local onde os excrementos são depositados favorece o surgimento e o crescimento de um fungo chamado fumagina, que prejudica o desenvolvimento da planta atingida (FARINHA, 2014).

2.2.1.1 Medidas de controle

Sobre o controle da cochonilha, a literatura apresenta variações quanto ao método químico e sua aplicação (EMBRAPA, 2008). Concorda-se que as ninfas em estágios iniciais são mais propensas ao controle químico do que as de fase mais desenvolvidas, que contam com a proteção da carapaça. O uso de inseticidas como fosalone, medidation e fenitrotion não tem resultados muito expressivos no controle dessas pragas. Outras medidas, como a remoção de ramos infectados e a escovação das partes atingidas da planta podem ser tomadas para que a incidência seja reduzida. Já os pulverizadores de baixa pressão, que molham áreas mais difíceis, apresentam melhores resultados, uma vez que atingem mais eficazmente as partes das plantas(EMBRAPA, 2005).

O controle biológico, por meio de parasitas e predadores, inimigos naturais da cochonilha (os principais combatentes da praga são as joaninhas, as vespas e as formigas), pode ser considerado o método de maior eficácia, em que a tática é retirar as partes atingidas e colocá-las no chão, entre as filas, permitindo que os predadores ataquem e assim alcancem as remanescentes (EMBRAPA, 2005).

2.2.2 Pulgões (Aphidoidea)

Os pulgões são insetos pequenos, com aproximadamente 2 mm de comprimento, pertencentes à Ordem *Homoptera*, da família *Aphididae*, que sugam a seiva da folha, através do aparelho bucal tipo sugador, o que prejudica, não só a cultura, mas propicia a inoculação de toxinas e a transmissão de diversas viroses. Algumas espécies como a *Aphis nerii* tem a capacidade de atacar inclusive plantas de alto teor tóxico, como é o exemplo da *Asclepsias curassavica* (EMBRAPA, 2008). Nesses casos, o organismo do inseto absorve as substâncias e as utiliza como defensor natural contra predadores. O do tipo *Brevicoryne brassica* desativa a toxina presente no couve, nabo, repolho e rabanete, algumas das suas fontes de alimentação. Outras espécies formam galhas construídas com o enrolamento das folhas da planta, ou de tumores provocados pelo hormônio de crescimento produzido por elas, como o caso das filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) que voam para as folhas de videira e depositam seus ovos, que, depois de eclodirem ,chegam à raiz onde forma nova galha (IMENES; SILVIA, 2002).

Os pulgões comumente vivem em colônias, preferencialmente em zonas de crescimento da planta, nas brotações e nas novas folhas, onde agem sugando a seiva e, como consequência, provocando alterações na cor (tom amarelado) e no formato (enrugamento e a deformação), o que pode progredir de modo generalizado terminando com a morte da planta. Durante esse processo, os pulgões excretam o excesso de seiva através de gotículas adocicadas, sendo depositado na superfície das folhas, o que favorece o surgimento da fumagina, uma doença provocada por fungos que cria uma película de cor escura, reduzindo a área da fotossíntese com implicações sobre a respiração da planta, além de atrair formigas que acabam se associando a eles impedindo o ataque dos predadores naturais (os principais são as joaninhas, sirfídeos — moscas das flores, vespas e besouros) (IMENES; SILVIA, 2002).

A reprodução dos pulgões tem duas variações, sendo uma delas do tipo partenogenético, em que as fêmeas não dependem dos machos para que haja fecundação - em meses de maiores temperaturas, quando o clima está mais quente, a reprodução se processa pelo método vivíparo, caracterizado pelo desenvolvimento no útero materno, sendo envolvido por placenta – e em meses mais frios pelo acasalamento, se processando de forma ovípara, cujo embrião se desenvolve dentro

de um ovo em um ambiente externo. Sua coloração pode variar de espécie, predominando as cores marrom, vermelha, verde, cinza, preta ou amarela. Seus principais predadores são as moscas flores, vespas e joaninhas (FARINHA, 2006).

2.2.2.1 Medidas de controle

De modo geral, agricultores, que padecem com o ataque da praga em suas plantações, recorrem ao uso de inseticidas com base química, contudo essa ação pode resultar no aumento dos afídeos, uma vez que, lateralmente, destrói seus predadores naturais. Assim, novas estratégias são pensadas como meios alternativos de combate, incluindo a modificação genética de algumas espécies de plantas com o objetivo de oferecerem maior resistência às pragas. No entanto tais ações precisam ser analisadas quanto aos aspectos de impactos ecológicos reduzindo as agressões e mantendo uma base sustentável (CUTLER; ELANOVICH, 1988).

Existem produtos alternativos para controlar o pulgão, como a calda do fumo, formado de sulfato de nicotina, de baixo custo e não causa impactos nos inimigos naturais, pois atua no sistema nervoso dos insetos. Ao misturar este inseticida, adiciona-se água, álcool e sabão, pulverizando ou regando as plantas (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

As ações de combate aos pulgões incluem os fatores bióticos, cuja característica está na predação pelos agentes naturais (joaninhas, vespas e larva de moscas) que os devoram, e pelos fatores abióticos, que levam em conta às condições ambientais como chuvas torrenciais, ventos fortes, variações de temperaturas e outros efeitos. Além destas ações, a combinação do extrato de Nim com o LCCV, objeto deste estudo, favorece o fortalecimento da planta atingida pela praga, sendo assim uma alternativa adequada ao tratamento (PINHEIRO *et al.*, 1999).

2.3 NIM (Azadirachta indica A. Juss)

O Nim ou Amargosa (*Azadirachta indica* A. Juss), oriundo do Sudeste da Ásia e da Índia, onde o clima é tropical, pertence à família Meliaceae, a mesma a qual pertencem o cedro-rosa e santa Bárbara - planta nativa do Brasil que pode

chegar até 15 metros de altura, com ramos estendidos e folhas separadas em folíolos imparipenados - podendo atingir até 20 metros de altura, com duração de vida estimada em até 200 anos. Possui folhas compostas, alternadas e frequentemente aglomeradas nas extremidades dos ramos, de flores branco-lilás e apresenta pequenos frutos de cor verde-clara, no estado inicial, em formato de baga ovalada, contendo uma ou duas sementes, de casca dura, e em tom amarelado, com polpa macia e amarga, em seu estado maduro (EMBRAPA, 2006).

A planta está presente em basicamente todas as regiões dos países asiáticos, destacando-se por sua propriedade inseticida exercendo forte controle de pragas, possuindo como principal componente um óleo extraído de sua semente (NEVES, 2004).

Para Vendramim (2000), o Nim é constituído por uma série de compostos limonóides, sendo o que ocorre com maior concentração é a Azadaractina, encontrada em vários órgãos da planta, principalmente nas sementes, apresentando atividade tóxica contra insetos. Sua madeira é resistente a cupins e tem sido utilizada na fabricação de móveis, mourões, estacas, esteios, ripas, caibros e utensílios domésticos (SODEPAZ, 2006).

Como agente natural a planta apresenta ainda importante função no controle de desgaste de solos e erosão, na prevenção contra efeitos de inundações e no processo de salinização, possui a capacidade em suportar temperaturas excessivas, sendo resistente às águas contaminadas, influencia no processo de fertilização dos solos e contribui para a regeneração das terras pós degradação (IAGRO, 2016).

Seu desenvolvimento se dá em praticamente em todos os tipos de solos (com pH até 8.5), mas, ao contrário das demais espécies arbóreas de multiuso, tem melhor resultado quando em solo seco, raso e pedregoso, poucos profundos, sendo prejudicado em temperaturas mais baixas, não resistindo a geadas (NEVES *et al.*, 2003).

A planta inicia seu estágio de reprodução a partir de três anos, sem, no entanto, atingir o máximo de produtividade antes dos 10, idade com qual apresenta média de produção em torno de 20,5 kg anual chegando ao máximo de 50 kg (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992 *apud* HOWATT, 1994).

Em estudos realizados, constatou-se que a planta pode ser utilizada em diversas áreas, já que suas propriedades possuem múltiplas funções, o que atraiu a

atenção de outros segmentos, como agricultura e medicina, sendo também utilizada na fabricação de produtos cosméticos (MARTINEZ, 2002).

2.3.1 Cenário histórico da planta de Nim no Brasil

No início do século passado, a partir de iniciativas de governos como a Nicarágua, Venezuela, República Dominicana e Cuba para o desenvolvimento de projetos, a América Latina recebeu as primeiras mudas da planta. Em virtude de sua capacidade de adaptação aos solos secos e aos tipos de temperaturas quentes das regiões da América Central, a planta fez grande progresso, o que não ocorreu na América do Norte e nem na Europa por possuírem temperaturas muito baixas e de frio intenso, fatores esses que se repetiram nos Estados do Sul brasileiro (INFORAGRO, 2010; LINDEMANN, 2011).

No Brasil não há registros que determinam a chegada da planta, mas se estima que deva ter mais de 50 anos. As primeiras pesquisas da propriedade inseticida da planta foram realizadas no ano de 1986 pelo IAPAR com sementes provenientes das Filipinas, três anos depois, obtidas da Índia para cultivo, quando foram plantadas nas cidades de Londrina, Paranavaí (PR), Jabotical (SP) e Brasília (DF) para uma maior avaliação de suas propriedades e ações exercidas *in loco* (MARTINEZ, 2002).

A partir daí a planta de Nim foi se desenvolvendo e, no final dos anos 90, suas propriedades passaram a ser conhecidas no restante do país, elevando sua adesão à escala de plantio comercial em áreas como de São Paulo, Mato Grosso, Tocantins e Pará, dentre outros. Esses Estados se mostraram mais adequados ao seu cultivo por apresentarem um clima mais próximo aos dos países de origem, o que fornecia melhor expectativa de produção. Hoje a planta de Nim está presente em grande parte do país, com mais de 600 mil árvores plantadas (INFORAGRO, 2010; LINDEMANN, 2011).

2.3.2 Variação da sazonalidade

A floração e a produção de frutos obedecem a um padrão de época, com uma variação entre as regiões. Em condições climáticas como as do Caribe, por exemplo, as flores são vistas a partir do final do mês de fevereiro e o começo de

março, permanecendo até a metade do mês de maio. A produção frutífera se dá entre os meses de julho e setembro, com menor índice de produção entre os meses de novembro e janeiro. Já no Brasil, em virtude das diversas condições do clima, não há padrão de produção, ocorrendo em variadas épocas do ano, também de acordo com as regiões, por exemplo, a Sudeste apresenta maior índice entre os meses de fevereiro e abril (GUMIERO, 2008).

Estudos realizados na EMBRAPA sobre a planta de Nim indicam que a azadiractina presente nas folhas apresenta variação de acordo com a época (PRATES, 2005), conforme pode ser observado na Figura 1 abaixo.

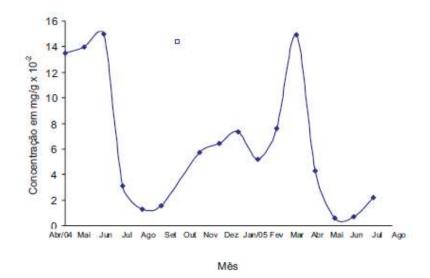


Figura 1 - Variação temporal da concentração de azadiractina nas folhas de Nim

Fonte: Prates (20050.

2.3.3 As propriedades da planta de Nim

A planta apresenta diferentes ações na produção de agentes e derivados sendo suas propriedades de teor medicinais e terapêuticas, incluindo as antissépticas, antibióticas, antiparasitária, fungicida e tônica, sobretudo em seus componentes principais como casca, folha e semente, agindo como antifúngico e anti-inflamatório, além de ser um natural repelente. Sua casca é de gosto amargo, adstringente (que provoca constrição) e picante, com registros de eficácia no tratamento de algumas doenças na pele, como a herpes labial. De acordo com a ciência Ayurveda, as folhas do Nim, em razão de seu sabor amargo e os princípios ativos, têm a capacidade de agir como um agente antidiabético. Os frutos da planta

são amargos, com propriedades purgativas, agindo como anti-hemorroidas. A Azadaractina, extraída da semente da planta, revelou-se como inibidora da capacidade de desenvolvimento de mudas nos seus variados estados (larval, pupal e adulto), assim como da reprodução das larvas aquáticas (mosquitos). O óleo extraído da semente é amargo e possui vasto percentual de ação sobre várias espécies sensíveis, sendo ainda considerado de alto nível medicinal-natural (SODEPAZ, 2006).

A seguir, veremos as propriedades detalhadas das partes da planta, que asseguram o seu valor quando da utilização como inseticida natural ou auxiliar nas mais diversas situações que envolvem suas ações (SODEPAZ, 2006).

2.3.3.1 Flores

São pequenas e possuem coloração branca ou cor creme, sendo arranjadas em inflorescência de cerca de 25 cm de comprimento, nas extremidades dos ramos. Tem aroma próximo ao do mel, no entanto de gosto amargo, produzindo material ácido graxo e ceroso (como o araquídio, esteárico, linoleico, beênico e oleico) por conter flavonoides e nimbosterol (metabólitos polifenóis que possuem baixo nível de peso molecular) (SODEPAZ, 2006).

2.3.3.2 Pólen

O pólen da planta de Nim é tóxico para insetos adultos e larvas, contendo diversos aminoácidos, como tirosina, fenilalanina, ácido amino-capróico, isoleucina, arginina e ácido glutâmico (SODEPAZ, 2006).

2.3.3.3 Frutos e sementes

Os frutos apresentam formato elipsóides, com 1,5 cm e 2,0 de comprimento. A frutificação se dá uma vez por ano, mas pode ser realizada mais de uma colheita, dependendo das condições climáticas, sobretudo da temperatura, em torno de 30°. Quando da época de colheita, os frutos podem ser colhidos direto dos ramos ou através de lonas colocadas na parte inferior da planta, devendo ser armazenados em recipientes com água, por curto período de tempo, para posterior

despolpamento por via manual ou mecânica. A produção pode variar entre 25 a 50 kg por árvore, dependendo do clima e do tipo de solo em que a planta foi cultivada. 50 Kg de frutos maduros de Nim rendem cerca de 30 kg de sementes, 1 kg se semente contém cerca de 3000 unidades de grãos, dos quais se obtém em média 6 kg de óleo e 21 kg de torta (CORRADEIO, 1988).

A polpa é macia, amarga e doce, com propriedades purgativas, de cor amarelado quando maduro, envolvendo a semente, que possui coloração marrom e de gosto amargo. A polpa revelou-se também ser uma promissora base para a geração de gás metano, servindo ainda como fonte de carboidratos para diversas fermentações. Do conjunto total da fruta apenas uma pequena porção (10%), concentra os compostos ativados biologicamente, servindo para a alimentação no estado embrionário inicial da semente, que após extração se obtém cerca de 10 g/kg do peso total do endosperma. Em fatores e números a planta produz cerca de 20g de pesticidas em cada safra (SCHMUTTERER, 1990 *apud* HOWATTS, 1994).

O óleo e a gordura encontrados nas sementes oleaginosas são importantes por serem fonte de energia, uma vez que mais de 95% dessas substâncias são formadas de triglicerídeos. Além delas outros grupos também são encontrados, como mono e diglicerídios, que funcionam como emulsificadores, tocoferóis e ácidos graxos livres (FARIA *et al.*, 2002).

Os ácidos graxos encontrados nos óleos vegetais podem sofrer variação conforme o tipo de sementes de onde são extraídos. Mancini Filho (1996) relatou ainda que, dentro da mesma espécie, podem ser registradas diferenças e que estas são provocadas pelas condições de clima e solo onde são desenvolvidas.

2.3.3.4 Folhas

Apresentam odor agradável, com texturas macias, mas de gosto amargo, podendo ser muito eficazes contra traças, insetos e auxiliarem no combate à mosca do chifre, nos campos de criação de bovinos. As novas folhas incluem ações curativas indicadas no tratamento de sarna e feridas, fato este potencializado por conter propriedades antifúngicas e antibacteriana (SODEPAZ, 2006).

As folhas apresentam folíolos de coloração verde clara intensa, são do tipo imparipinadas e alternadas. Contêm 12,4-18,3% de proteínas, 11,4-23,1% de fibras, 43,3-66,6% de extrato, 2,3-6,3% de extrato etéreo, 7,7-18,4% de cinzas

totais,0,9-4% de cálcio, e 0,1-0,3% de fósforo. A árvore só perde suas folhas em condições extremas (HEDGE, 1993 *apud* MARTINEZ, 2002).

Martinez (2002) relata que a azadiractina se concentra principalmente nos frutos, porém quantidades menores também podem ser encontradas nas demais partes da planta. Nas folhas, Sundaram (1996) registrou 0,9 x 10⁻³% de azadiractina, logo outros limonóides apresentam bioatividade sobre os insetos.

A ação dos liminóides altera o sistema de fecundidade das moscas, podendo ainda causar uma desordem de hormônios nos insetos. Sua composição inclui proteínas, cálcio, minerais, fósforo, caroteno, aminoácidos (tirosina, ácido aspártico, dentre outros). Após o processo de extração, as folhas funcionam como repelente, podendo auxiliar no combate aos mosquitos da dengue e malária (RIAR et al., 1990; SINHA et al., 1984).

2.3.3.5 Casca e resina

A casca apresenta um gosto amargo, com 14% de tanino (um fenol presente nos frutos verdes, sementes e caules, servindo de proteção às plantas), produzindo uma grossa e forte fibra que, quando entrelaçada, pode ser usada como corda. Sua resina é fonte de várias proteínas, o que a torna possível de ser utilizada como aditivo na alimentação (BISWAS; CHATTOPADHYAY; BANERJEE, 2002).

2.3.3.6 Madeira

Suas propriedades são semelhantes às do mogno (madeira tropical, de cor castanho-avermelhada, de elevada densidade), apresentando considerável peso e cheiro forte quando serrada, não oferecendo dificuldade para cortar e polir, sendo muito útil em construções e fabricação de móveis com notada resistência ao ataque de cupins (HEDGE, 1993 apud MARTINEZ, 2002). Além do tanino e sais inorgânicos, como o cálcio e o ferro, a madeira é dura, de grande resistência, o que define sua durabilidade e a utilização em vários segmentos (NUNES et al., 2012), com grande potencial na produção de carvão (ARAUJO et al., 2000), na fabricação de móveis, na construção civil (KOUL et al., 1990), além da confecção de vigas, postes e estacas (SAXENA, 2001).

2.3.3.7 Torta

A torta é o material residual que resta após o processo de extração do óleo das sementes, rico em nutrientes como fósforo, nitrogênio e potássio, podendo ser usado como adubo. No país de origem - na Índia — experiências têm comprovado que os solos, quando adubados com a torta de Nim, resultam na produção de plantas mais saudáveis, mais resistentes e de maior tamanho, reduzindo a incidência de pragas como os nematoides. Estudos comprovaram que o adubo da Torta de Nim possui maiores índices de nutrientes vegetais do que encontramos no esterco, gera um aumento no crescimento da população de minhoca, auxiliando na permanência do nitrogênio nos solos disponíveis para as plantas e oferecendo maior proteção contra os insetos. Esse conjunto de ações cria uma favorável condição de crescimento e desenvolvimento sem a aplicação de produtos químicos industriais (EMBRAPA, 2005).

2.3.4 Os variados usos da planta de Nim

A Azadirachta, ou Nim, é muito utilizada no Oriente, numa cultura milenar, como planta medicinal, auxiliando no tratamento das infecções, febres, hipertensão, em quadros inflamatórios, além de fonte de fornecimento de sombra, como repelente, material para diversos tipos de construção e no combate de pragas. Essa postura tem como fundamento a busca de meios alternativos que reduzam os riscos de contaminação pelo uso de produtos sintéticos agressivos (MOSSINI; KEMMELMEIE, 2004).

De modo geral, consideramos as variadas formas de benefícios ou uso que a planta oferece, seja como árvore, quando plantada com fins de arborização de campos, praças e ruas, fornecendo sombra, além da propriedade de resistência à cupins apresentada por sua madeira; Como inseticida natural (como primeira ação a planta se assemelha com o hormônio da ecdise, responsável pelo crescimento do inseto, alterando seu desenvolvimento, reduz a fome e, dadas as proporções, pode levá-lo à morte); Como auxiliar em tratamentos médicos e na área de cosméticos, mesmo considerando a escassez de estudos nessas áreas, tem-se registro de que o Nim tem sido utilizado com bons resultados em ações antimicrobiana e em casos dermatológicos (CPT, 2006; OSI, 2006); e como em uso no campo da veterinária,

quando se obtém resultados positivos de combate aos carrapatos, sarna e mosca do chifre (CPT, 2006).



Figura 2 – Partes da planta de Nim: folhas, flores, frutos, tronco e sementes

Fonte: Própria autora.

2.3.5 Compostos ativos extraídos da planta de Nim

Com a utilização de variados processos, podemos extrair das partes da planta de Nim cerca de vinte e quatro compostos com atividades biológicas, como esteroides, cetonas, carotenoides e triterpenoides, contudo apenas quatro desses (azadiractina, salanina, melantriole, nimbina) tem elevada ação pesticida (SANTOS; ANDRADE, 2002).

Dentre esses componentes, a azadiractina tem destacada atenção por parte dos pesquisadores já que, de modo isolado, apresenta maiores efeitos pesticidas contra os insetos do que todos os compostos reunidos, inibindo sua alimentação e agindo como regulador do seu crescimento, interferindo ainda em sua concentração de hormônios (HOWATT, 1994). A azadiractina está presente em diversos órgãos da árvore, com percentual acentuado na semente (NEVES *et al.*, 2003).

As vantagens mais relevantes do Nim sobre outras plantas com propriedades pesticidas, está na sua atividade (sistêmica), na eficiência quando em concentrações baixas, no baixo nível de toxicidade a animais mamíferos e na taxa reduzida de probabilidade de resistência, dado aos princípios ativos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

A ação exterminadora do extrato é múltipla e não instantânea - ocorre com efeitos variados e ao longo do tempo, embora se observe em que estes se dão a curtos prazos - ela se dá quando o inseto tem contato com a planta ou a ingere, o que provoca a redução do nível de consumo alimentar e retarda seu crescimento, impedindo que os insetos adultos possam depositar seus ovos. Não se descarta a possibilidade de variação de ação sobre os insetos dos diversos tipos de elementos da planta, dado sua composição química, pode ser que o Nim aja de formas diferentes às espécies (MARTINEZ, 2002).

A Azadaractina tem estrutura semelhante ao do hormônio ecdisona, ou hormônio da muda, responsável pelo controle da metamorfose, cuja ação favorece a diferença das estruturas nas fases de vida dos insetos. Para que a metamorfose seja bem sucedida, toda a cadeia de transformação e alterações fisiológicas precisa de uma perfeita sincronia, a Azadaractina age sobre o corpus cardiuacus dos insetos, cuja função é regular os hormônios, bloqueando o ecdisona, consequentemente a muda não acontece, o que interfere no ciclo vital dos insetos (JUNIOR, 2003; MORDUEBLACHWELL, 1993).

Outro composto com propriedades inibidoras do processo alimentar é o melantriol. Sua ação é registrada quando ocorrem baixos níveis de concentração, provocando a perda de apetite dos insetos. Testes realizados com gafanhotos comprovaram a eficácia desse componente (CONRICK, 1994; MULLA; TIANYUN SU, 1999).

O terceiro composto ativo extraído da planta de Nim foi a Salanina. Sua ação, ao contrário da Azadaractina, não altera o processo da metamorfose, contudo tem extrema influência no processo de alimentação dos insetos agindo como inibidor da fome. Em testes de campo e de laboratório realizados com algumas espécies como o besouro listrado e as moscas domésticas, registrou-se considerável influência desse composto sobre seu processo alimentar (MARTINEZ, 2002).

Compostos ativos como a Nimbina e a Nimbidina demonstraram grande eficácia antiviral e apresentam propriedades farmacológicas, como analgésico e

antisséptico. Suas ações foram registradas por afetarem o vírus da vaccínia (vírus oriundo do gênero Orthopoxvirus da família Poxviridae que provoca doenças não letais e pustular em seres humanos), vírus *fowlpox* e o vírus X da batata (vírus que não apresentam sintomas visíveis — latentes). Por sua composição, há probabilidades de serem úteis no controle de viroses em animais e lavouras. (CONRICK, 1994; MULLA; TIANYUN SU, 1999).

Alguns outros limonoides foram isolados e demonstraram eficácia como inibidores de fome, paralisando o mecanismo alimentar dos insetos. Testes com a lagarta do broto da folha de tabaco demostraram resultados consistentes do composto deacetylazadarachtinol, encontrado na composição da planta de Nim. (MORDUE; NISBET, 2000).

2.3.6 Mecanismos de ação da planta de Nim

A partir da extração dos compostos ativos da planta de Nim, testes realizados demonstraram eficácia contra os insetos, justificando o rótulo de inseticida natural. A comunidade científica registrou a diversidade de funcionalidade do extrato, com resultados positivos nas seguintes condições: funciona como repelente e interfere nas fases larvais e adultas, age como inibidor de desenvolvimento dos ovos em fases iniciais de crescimento exercendo ação bloqueadora do processo de metamorfose, causa interferência no sistema de reprodução – impede o acasalamento - e na deposição de ovos das fêmeas, provoca a esterilização em insetos na fase adulta, envenena as larvas, influencia como inibidor do processo alimentar - eliminando a fome - a Azadaractina inibe as atividades dos receptores sensíveis à degustação, localizados na cavidade oral, diminuindo a ingestão dos alimentos e, por consequência, provocando o enfraquecimento. Quando do contato do inseto com a planta, o composto penetra pela cutícula inibindo a síntese de quitina, que tem como fator determinante a desidratação e provoca deficiência do mecanismo de motilidade intestinal dos insetos, o que os leva a morte. (BRUNHEROTTO, 2000; HOWATT, 1994).

O mecanismo de ação inseticida dos compostos extraídos da planta de Nim sobre os insetos tem variações em conformidade com as espécies, afetando a evolução das larvas, reduzindo seu crescimento, fertilidade e fecundidade dos insetos adultos, alterando a fisiologia e provocando deformações celulares (IAPAR, 2006b).

A ação repelente e pesticida da planta de Nim e de seus diversos derivados afetam a mais de 300 espécies, de várias ordens como o percevejo (*Heteroptera*), gafanhotos e grilos (*Orthoptera*), joaninha e besouros (*Coleoptera*), mariposas e borboletas (*Lepidoptera*), mosquitos, pernilongos e moscas (*Deptera*), abelhas, formigas e vespas (*Hymenoptera*), cigarras (*Homoptera*), dentre outras (MARTINEZ, 2002).

A propriedade inseticida da planta de Nim age diretamente no comportamento digestivo do inseto, alterando sua postura alimentar, ocorrendo quando os compostos ativos são ingeridos. Ao se alimentar da planta os compostos provocam contrações no esôfago e no intestino do inseto, resultando na expulsão ativa do alimento (literalmente o inseto vomita o que comeu), sendo seu efeito imediato o transtorno alimentar e o afastamento da planta (EMBRAPA, 2005). O quadro 1 a seguir apresenta uma representação dos compostos ativos da planta de Nim de maior relevância.

Quadro1-Representação dos compostos ativos da planta Nim de maior relevância

Composto Ativo	Estrutura	Ação
Azadiractina	COOMe OH OH OH OH OH OH OH MeOOC	Exerce ação fungicida natural.
Melantriol	He He He He	Em concentrações muito baixas, paralisa o mecanismo alimentar dos insetos.
Salanina	CH,-CH=C-C-O CH, CH,-CH=C-C-O CH, CH,-CH,-CH,-CH,-CH,-CH,-CH,-CH,-CH,-CH,-	Tem extrema influência no processo de alimentação dos insetos, agindo como inibidor da fome.
Nimbina	COOMe COOMe MeOOC OAc	Possui propriedades fármaco- lógicas, agindo como analgésico, antisséptico e anti-inflamatório.

Fonte: Azadiractina (MARTINEZ, 2002); (http://www.vmsrf.org/trial_neem/moldblst.php?db=1&idx=1&offset=150); (http://insetimax.com.br/insetipedia/azadiractina); Nimbina 10.com/pravo/17821/index.html).

Melantriol Salanina (http://m.exam-

2.3.7 Procedimentos para coleta de folhas e preparação do extrato aquoso de Nim

Os produtos derivados da planta de Nim são preparados com a trituração das suas sementes, para a obtenção do óleo, e pela moagem das folhas que resulta no extrato aquoso (MARTINEZ, 2002). Em determinadas regiões, esse processo tem se mostrado mais vantajoso do que a extração do óleo das sementes, que requer equipamentos e mecanismos de maior precisão e, ainda assim, rende pequenas

quantidades, já que as folhas são mais abundantes, com a facilidade de preparo e extração, tornando a utilização mais prática e viável, sobretudo para propriedades rurais de menor porte (EMBRAPA, 2006).

O processo de preparação para obtenção do extrato aquoso se inicia com a coleta das folhas e talos, em seguida devem ser levadas a locais com sombra e dispostas em camadas para facilitar a secagem, podendo ocorrer por períodos variados, de acordo com a temperatura ambiental, em geral as folhas ficam quebradiças pela desidratação, ficando, assim, prontas para serem levadas a um moinho, trituradas e transformadas em pó (EMBRAPA, 2006).

Após a trituração, o pó obtido deve ser colocado em água, mexendo até formar uma mistura homogênea, observando que o recipiente não esteja completamente cheio, já que o volume tende a aumentar após o repouso, devendo permanecer por um período de doze horas, em seguida filtrado – indica-se tecido de algodão – eliminando os resíduos remanescentes que prejudiquem o equipamento que será usado na pulverização, e diluído na proporção desejada, de acordo com o tipo de praga que se pretende combater. Recomenda-se utilizar a quantidade de folhas indicada para cada situação, caso haja excesso na preparação, do extrato pode ocorrer danos à planta pulverizada, como a queima das folhas (EMBRAPA, CT, 88).

2.4 LÍQUIDO DA CASCA DE COCOS VERDES (Cocos nucifera L.)

2.4.1 O cultivo do coco no Brasil

Cocos nucifera L. conhecido como coqueiro – foi introduzido pelos portugueses no Brasil no ano de 1553 (GOMES, 1984; MEDINA, 1980; SIQUEIRA et al., 1998), destacando o Nordeste como maior produtor (aproximadamente 80% da produção nacional), cultivado em mais de 80 países preferencialmente de climas quente e úmido, sendo favorecida por temperatura de 22 °C, média anual. É uma espécie tropical perene da família (Arecaceae), e uma das mais importantes árvores frutíferas permanentes cultivadas no Brasil. O tamanho pode alcançar até 30m, serve de base para uma diversidade de produtos, registrando-se mais de 300 modalidades de aproveitamento, incluindo a propriedade como alimento, que começa com a extração e consumo da água até o beneficiamento do fruto por

empresas de vários níveis, além de servir para produção artesanal. O coco é composto por uma camada fibrosa e extensa – casca - que reveste o fruto, preenchida pelo endosperma líquido – água – sob proteção do endosperma sólido – polpa (LEITMAN *et al.*, 2012). A figura 3 abaixo ilustra as partes constituintes do coco.

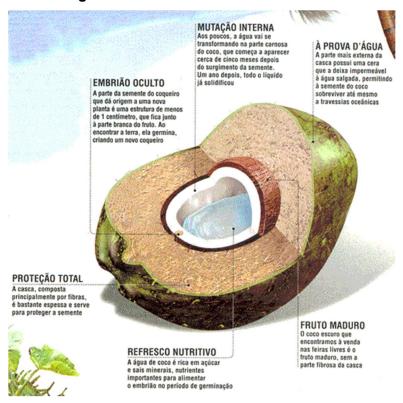


Figura 3 – Partes constituintes do coco

Fonte: http://www.barcelona.educ.ufrn.br/pomar.htm.

O endosperma líquido é uma solução ácida, estéril, nutritiva e natural, composta de sais, proteínas, aminoácidos, açucares, vitaminas, gorduras neutras, eletrólitos diversos e hormônios do crescimento, essenciais para a indução da divisão e desenvolvimento das células, órgãos e tecidos. Apresenta densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo (MARTINS, 2004; TULECKE *et al.*,1961). Sua água tem sido vista como uma alternativa para tratamento de diversas lesões, atuando no processo inflamatório e principalmente cicatricial (NUNES; SALGUEIRO, 2007).

No Brasil, são encontramos a cultura do coqueiro em três modalidades: O Coqueiro gigante – chamado assim por atingir a altura de 35 m, começa a produzir

frutos aproximadamente seis anos após o plantio, muito importante para as indústrias dado seu maior fornecimento de polpa; O Coqueiro anão – de baixo porte, tem altura aproximada de 12m, procurado principalmente pelo consumo da água in natura, produz frutos a partir de dois anos; e o Coqueiro híbrido – atinge 20m, em média, servindo tanto para a indústria como para o comércio de consumo da água, com produção aproximada em quatro anos depois de plantado (EMBRAPA, 2002).

O coqueiro fornece uma diversidade de usos e aplicações, como a casca que, dentre outros derivados, pode ser aproveitada para a produção de cordas e chapéus; o óleo extraído do coco é amplamente usado na produção de cosméticos, sabão, detergentes, velas e margarina; a água é indicada como auxiliar de combate à desidratação como soro fisiológico em casos específicos, como a diarreia, quando consumida *in natura*, além de possuir propriedade antioxidante com efeitos que agem como proteção ao tecido hepático e previne problemas cardiovasculares, de acordo com estudos realizados; as folhas largas e compridas são utilizadas para coberturas, na fabricação de vassouras e pinceis, dentre outras produções; a madeira é utilizada na fabricação de assoalhos, móveis, divisórias e na criação de peças artesanais (ANNUNCIADO, 2005; CARRIJO *et al.*, 2002; SENHORAS, 2003).

Os taninos vegetais são polifenóis que têm, dentre outras, a propriedade de proteger as plantas contra o ataque de herbívoros, diminuindo seu gosto agradável –palabilidade – sendo classificados em hidrolisáveis e condensados. Sua extração se dá pelo uso de vários solventes como acetona, etanol e água ou ainda por soluções de carbonato de sódio, dentre outros (BATTESTIN, 2004).

O alto índice de produção da casca do coco verde tem sido potencializado pelo crescente aumento no consumo da água *in natura* e pelos processamentos industriais, geradores de diversos produtos derivados do fruto. Se, por um lado, essa produção incrementa o comércio e a indústria, por outro gera problemas ambientais, já que se acumula nos aterros sanitários ou são depositados de forma incorreta nos grandes centros das cidades, onde são mais consumidos (EMBRAPA, 2011).

2.4.2 A utilização da casca de cocos verdes como adsorvente

O Brasil se destaca na produção de coco verde e no consumo de seus derivados, com alto índice no consumo da água, em virtude disso, gera uma grande quantidade de resíduo sólido, o que por sua vez, provoca um grave problema ambiental. Por esta razão, têm-se buscado novas formas de conter ou reduzir tal acúmulo, dando à casca do coco verde novas aplicações, com destaque ao seu uso como adsorvente no tratamento de redes de esgotos, redes fluviais e resíduos produzidos pelas indústrias, descartados no meio ambiente. A remoção de metais tóxicos com a utilização da casca do coco é uma alternativa viável e mais barata (EMBRAPA, 2003).

A utilização da casca de cocos verdes como adsorvente passa por processos que envolvem diversas etapas, resultando na obtenção de pó e fibra que serão aplicados posteriormente nas vias a serem tratadas. Nesse processo, estão inclusas as ações de trituração, prensagem e peneira dos detritos, sendo postos para secagem na fase posterior (CARRIJOETAL, 2003; ROSA *et al.*, 2004).

Chamamos de adsorção o fenômeno de ordem físico-química ocorrido quando um componente em fase líquida ou gasosa é transferido para uma superfície sólida. Esses componentes quando em contato e unidos à superfície, recebem o nome de adsorvatos, a parte sólida que os retém são chamados de adsorventes e ação de remoção das moléculas pela propriedade dos adsorventes se chama dessorção (MASEL, 1996), podendo ser classificada em dois processos distintos, o físico – fisiossorção – e o químico – quimiossorção (RUTHVEN, 1997).

2.4.3 O processo de produção do líquido da casca de cocos verdes

A obtenção de líquido aquoso é resultado da ação de trituração e prensagem das fibras do coco verde. O processo de trituração utiliza equipamento com facas em disco, quando é fatiado e, na fase seguinte, ocorre o esmagamento das fibras. Na fase posterior, o resultado da trituração é levado para uma prensa de rolos que tem por função extrair o excesso de liquido. Na fase final do processo, as cascas estão desintegradas, com a redução da umidade e agora como efluente. Em análises preliminares foram identificados açúcar fermentescível, compostos de cálcio, potássio, sódio e magnésio (cátions) e bicarbonato, cloreto e sulfato (ânions),

além de outros valores, indicando a necessidade de tratamento da água residuária, proveniente do processo (CARRIJO *et al.*, 2002; ROSA, *et al.*, 2004).

Estudos realizados demonstraram índices satisfatórios com o aproveitamento do líquido aplicados à irrigação de coqueiros, pela concentração de potássio (ARAÚJO, 2004), à fabricação de tintas, couros e adesivos pelo potencial de taninos condensados, como alternativa no processo de fermentação do álcool, dado a concentração de açúcar (TEIXEIRA, 2007).

2.4.4 Caracterização química do LCCV

Em estudos experimentais realizados na EMBRAPA, registram-se resultados após análise do Líquido da Casca de Cocos Verdes (LCCV) evidenciando alto índice de condutividade elétrica, indicando restrições quanto ao uso em culturas com baixa tolerância à salinidade, no entanto em menor grau em solos com maior permeabilidade. Por possuir nível de pH com pequeno teor ácido não impede a viabilidade de uso, uma vez que seriam necessárias pequenas proporções de substancias alcalinas para sua regulação (ARAÚJO; ROSA, 2002). O quadro 2 abaixo apresenta algumas características do LCCV.

Quadro 2 - Caracterização do líquido da casca de cocos verdes

Variável	Resultado	Unidade	
Condutividade Elétrica	7,88	dS/m	
Cálcio (Ca)	5,22	mmol/L	
Magnésio (Mg)	6,15	mmol/L	
Potássio (K)	47,69	mmol/L	
Sódio (Na)	15,65	mmol/L	
Cloreto em água	83,00	mmol/L	
Carbonato em água	<0,01	mmol/L	
Sulfato em água	0,08	mmol/L	
Bicarbonato (HCO ₃)	0,80	mmol/L	
pH	5,02	mmol/L	
Soma ânions	83,88	mmol/L	
Soma Cátions	74,72	mmol/L	
Fósforo (P)	3,08	mmol/L	
Nitrogênio Amoniacal	11,2	mg/L	
Nitrato	0,1	mg/L	
Razão de adsorção de sódio (RAS)	6,56	(200) (40)	
Laboratório de Solos e Água – Embrapa Agroindústria Tropical			

Fonte: Laboratório de Solos e Água, EMBRAPA Agroindústria Tropical.

2.4.5 Os taninos e suas atividades biológicas

Bate e Smith (1962) definiram os taninos como compostos fenólicos que possui alta massa molecular (de 500 a 3000 Da), são quimicamente muito reativos, solúveis em água, álcool e acetona, proveniente do metabolismo das plantas e que tem a propriedade de lançar gelatina e outras proteínas. A maioria dos fenólicos são encontrados sob forma de heterosídeos e ésteres.

Os taninos se classificam em hidrolisáveis – consistindo em ésteres de ácidos glácidos e elágicos glicosilados que são formados com base no chiquimato, em que o açúcar do grupo hidrolixa é esterificado, possuindo um grupo de poliol, glicose em sua maioria – e condensados ou proantocianidinas – apresentando rica e diversificada estrutura como resultado de substituições entre as unidades flavânicas e demais compostos (MELLO; SANTOS, 2001).

Os taninos hidrolisáveis podem ser classificados em velagitaninos e galotaninos, estes compostos de unidades de ácidos gálicos como ligações depsídicas entre si. O ácido tânico é uma mistura de diversos taninos gálicos (CLIFFORD *et al.*, 2000).

Quanto aos taninos condensados- ou proantocianidinas – são polímeros de falavan-3-ol ou falavan-3,4-diol, conforme figura abaixo, sendo comumente encontrados em plantas lenhosas e nas mais variadas famílias do reino vegetal, recebendo esse nome por sua coloração avermelhada. Suas moléculas possuem variação estrutural que resulta de substituições das unidades falvânicas (MELLO; SANTOS, 2001).

Figura 4 - Representação de ligação depsídica formada entre o grupo fenólico superior e o grupo inferior de uma unidade de ácido gálico na estrutura de taninos hidrolisáveis

Fonte: Harvey (2001) apud Nakamura et al. (2003).

Em estudos realizados sobre as ações dos taninos foram registradas importantes propriedades bactericida, sobre protozoários e na regulação proteica, dentre outras funções encontradas. Tal efeito tem uma dependência ligada a dosagem, o período e o tipo de ingestão. As ações fungicidas dos taninos apresentam três características comuns, a atividade antioxidante, a complexação com íons metálicos e a propriedade de complexar com variados tipos de moléculas (MELLO; SANTOS, 2001). A eficácia das ações dos taninos para os casos de feridas, inflamações ou queimaduras é possível pela capacidade de criar uma camada de proteção sobre as áreas epiteliais afetadas, favorecendo a reparação natural sob essa camada (MELLO; SANTOS, 2001).

Figura 5 – Estrutura de taninos condensados

Fonte: Lekha e Lonsane (1997).

2.4.6 A importância do LCCV na elaboração do bioinseticida

Os produtos derivados da planta de Nim, por sua propriedade inseticida natural, oferecem diversos efeitos sobre espécies de insetos nocivos ao cultivo de plantações, embora sua influência sobre os insetos "não alvo" ainda não seja totalmente compreendido. Em estudos realizados há registro de que haja uma pequena e sensível diferença que separa a dose a ser aplicada sobre determinada espécie de praga e os efeitos que serão gerados sobre seus predadores (PERERA et al., 2000; RAGURAMAN; SINGH, 2000; SIMMONDS et al., 2000).

Os compostos extraídos do Nim não causam mutações, sendo seletivos, biodegradáveis, com nível tóxico baixo para as espécies não alvo e que são benéficos ao meio ambiente e tem poucas implicações ou distúrbios sobre o ecossistema (FORIM, 2006; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

O produto final derivado da combinação do extrato aquoso de cocos verdes (LCCV) com o extrato das folhas de Nim, após processo de trituração, prensagem e coagem, tem mostrado eficácia satisfatória sobre algumas espécies de praga (pulgões e cochonilhas), o que determina a essencial importância dessa mistura para o combate nas plantações.

2.5 INSETICIDAS E FIXADORES NATURAIS E ARTIFICIAIS

2.5.1 O uso de adjuvantes para fixação do inseticida na aplicação

As combinações do extrato aquoso das folhas de Nim tem mostrado grande eficiência por sua propriedade inseticida natural, com ação sobre diversos tipos de pragas, sendo uma delas a *Spodoptera frugiperda* ou lagarta-do-cartucho, considerada uma das mais presentes no Brasil, cujo ataque se dá em todos os estágios de desenvolvimento do milho, causando graves danos e provocando redução considerável na lavoura. Resultados de experimentos nas instalações da EMBRAPA sobre o cultivo do milho e o combate às pragas, tem revelado redução em seu desenvolvimento (dos insetos) e registra mortalidade das lagartas (PRATES; VIANA, 2005).

A aplicação do extrato sobre as folhas de milho apresentará melhor e mais eficaz resultado se adicionado a uma substancia adjuvante na pulverização,

como o óleo de soja ou espalhante adesivo (calda), conforme estudos e resultados obtidos na Embrapa. De modo geral o manuseio e a utilização do extrato de Nim não oferecem maiores riscos e apresenta uma margem considerável de segurança para os usuários (MORDUE; NISBET, 2000).

O controle de pragas em países em desenvolvimento é feito através do uso de agrotóxicos, cuja aplicação acaba provocando efeitos colaterais, como a contaminação de ambientes, atingindo plantas e animais assim como o homem, pelo envenenamento acidental (RODRÍGUEZ; VENDRAMIM, 1996).

Produtos classificados na categoria dos agrotóxicos costumam apresentar alto custo de aquisição e não são ecologicamente corretos, por isso a busca de alternativas naturais que possam combater as pragas a menores custos, de modo menos agressivo e com teor reduzido de nocividade para o homem. Uma alternativa em estudo é a planta de Nim, seus derivados e combinações por apresentarem propriedade pesticida natural. Várias espécies são afetadas pela planta, dentre outras principais, estão a Caelifera, Dermaptera, Coleoptera, Thysanoptera, Diptera e Isoptera, além de diversas espécies de ácaros e fungos (IMENES; IDE, 2002)

Os produtos com propriedades inseticidas obtidos a partir da planta de Nim são biodegradáveis, não deixam resíduos tóxicos e por isso mesmo não atingem o meio ambiente, com permanência de três a seis dias no solo (SUDARAM et al., 1995). A planta de Nim é repelente, com propriedade anti-alimentar, funcionando como reguladora de crescimento e inseticida natural. Seus extratos para uso em cultivos orgânicos são aprovados mundialmente (MARTINEZ, 2002). A diferença da planta de Nim com relação a outras plantas está na atividade sistêmica, baixa toxicidade a mamíferos e sua eficiência em concentrações menores (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

A azadiractina é o composto principal da planta de Nim, sendo responsável pelas ações inseticidas, interferindo no ciclo alimentar dos insetos e nos hormônios reguladores de crescimento, e por consequência na reprodução e metamorfose. O composto promove uma série de efeitos nos insetos, não causa sua morte por efeito direto, contudo altera seu desenvolvimento, modificando o consumo alimentar, funcionando como repelente dos insetos adultos, reduzindo a fecundidade (MARTINEZ, 2002). Tais efeitos ocorrem pela atuação da substancia nas glândulas anexas ao cérebro chamadas protorácicas, corpora allata e cardíaca, quando da

produção do hormônio protoracicotrópico (PTTH), responsável pela biossíntese e hormônios da ecdise (MORDUE; NISBET, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um bioinseticida natural à base de extrato aquoso das folhas desidratadas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) e do liquido das cascas de cocos verdes (*Cocos nucifera* L.) com ação defensiva para as pragas agrícolas pulgão e cochonilha.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Prospectar um bioinseticida com porcentagens diferentes de mistura para testes em campo, após ter desidratado e preparado o extrato do Nim (Azadirachta indica A. Juss) e coletado o extrato do líquido da casca de cocos verdes (Cocos nucifera L.);
- Avaliar os efeitos do bioinseticida sobre as espécies pulgão (Homoptera) e cochonilha (Hemiptera, Diaspididae) e o grau de sensibilidade das folhas de limoeiro e berinjela, e determinar a concentração de extrato com capacidade de ser mais eficiente e menos danosa ao plantio;
- Analisar física e quimicamente as soluções inseticidas, identificando dentre os parâmetros avaliados as que oferecem maior grau de eficiência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram realizados entre fevereiro de 2016 a março de 2017. Foram estudadas as populações de Pulgão (Homoptera) e Cochonilha (Hemiptera, Diaspididae) no cultivo de limoeiro e berinjelas.

4.1 REAGENTES

Os produtos químicos de grau analíticos usado nas análises químicas foram: ácido sulfúrico P.A., fenol 5%, ácido tricloroacético com10% de acetona, cedidos pela Universidade de Fortaleza - UNIFOR.

4.2 EQUIPAMENTOS

Para as análises químicas dos extratos e do bioinseticida foram utilizados: espectrofotômetro UV-VIS de espectro completo (220-750nm) o NanoDrop ND-1000; espectrofotômetro com um comprimento de onda específico (λ= 280nm), o Nanovue Plus; espectroscópio FTIR (*Attenuated Total Reflectante* - ATR); e espectofotômetro Ultraspec – Amersham Biosciences.

4.3 EXTRATO DE LCCV

O extrato utilizado foi obtido após o beneficiamento da casca de cocos verdes na usina da empresa Nutrisa Nutrimento Agropastoril - EMAPE instalada em Maracanaú, localizada a 3°53'48,8" de latitude sul e 38°39'13,1 de longitude oeste.

As cascas de cocos verdes foram processadas com um triturador de (marteletes) martelos, onde o material foi desintegrado e em seguida prensado em prensa de cinco rolos horizontais e separando em duas frações: as fibras e líquido.

O líquido da casca de cocos verdes (LCCV) é da cor marrom escuro, obtido numa proporção de 30% do peso inicial de cascas processadas, cuja composição possui compostos fenólicos, açúcares fermentescíveis, cátions e ânions, além de elevados valores de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO

(Demanda Bioquímica de Oxigênio). Após coletado, foi armazenado em refrigeração a aproximadamente 5 °C.

A caracterização química foi realizada nos Laboratórios de Desenvolvimento de Fármacos da Universidade de Fortaleza - UNIFOR, o que compreendeu as seguintes análises: pH e espectrofotometria de absorção UV-VIS, que quantifica as proteínas com precisão.

Figura 6 – Foto do tanque de armazenamento do líquido da casca de cocos verdes (1) e fibras das cascas de cocos verdes (2)



Fonte: Própria autora.

4.4 EXTRATO DE FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM

O material vegetal da planta de *Azadirachta indica* foi coletado no período da noite, no mês de março de 2016, numa área plantada da região metropolitana de Fortaleza-CE, localizada a 03°43'06" de latitude sul e 38°32'34" de longitude oeste.

Os galhos foram cortados com tesoura de poda, e o material foi colocado para secagem à sombra, em local ventilado, pelo período de seis dias, sob a incidência do calor e do vento. As folhas ficaram desidratadas (quebradiças) e foi removida dos talos, sob a pressão do manuseio, após foi triturado até a obtenção um pó fino.

Para o preparo do extrato, foram pesados 150 g do pó das folhas de Nim e adicionado a um litro de água corrente, no qual foi mensurado o pH (8,2) e a temperatura (20,6 °C), sendo deixado imerso na água e sob agitação pelo período de 24 horas, segundo metodologia adaptada de Viana (2006).

O extrato foi peneirado e filtrado, separado o material solúvel, evitando resíduos que pudessem entupir o pulverizador, sendo logo após refrigerado. A figura 7 abaixo resumo a metodologia utilizada nas etapas de obtenção do extrato das folhas desidratadas de Nim e na figura 8 observa-se o aspecto das folhas desidratadas e após trituração.

Coleta de folhas e talos Secagem à sombra Moagem lmersão na água e sob agitação Peneirado e filtrado Extrato aquoso Refrigeração

Figura7 - Fluxograma do procedimento para obtenção do extrato da planta de Nim

Fonte: Própria autora.

Figura 8–Foto de folhas de Nim após seis dias de desidratação (1) e folhas após trituração (2)

4.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS BIOINSETICIDA

As soluções de inseticida foram preparadas com cinco concentrações do extrato aquoso (**\$**1, **\$**2, **\$**3, **\$**4, **\$**5), em concentrações de extrato de Nim de 10, 20, 50, 80 e 90%, e de LCCV de 90, 80, 50, 20 e 10%. Cada frasco recebeu inicialmente e extrato de Nim e em seguida o LCCV, sendo então rotulados. O quadro 3 esquematiza a preparação das soluções. Para cada uma das soluções foi designada fita de cores diferentes para uso na próxima fase do estudo, na casa de vegetação.

Quadro 3 – Esquema da formulação do bioinseticida

SOLUÇÕES	PROPORÇÕES	QUANTIDADES		
S 1 - Fita Laranja	10% de Nim	5 ml de Nim	45 ml de LCCV	
	90% de LCCV	3 mil de Milli		
S 2 - Fita Lilás	20% de Nim	10 ml de Nim	40 ml de LCCV	
32 - Fila Liias	80% de LCCV	TO MI de NIM		
S 3 – Fita Vermelha	50%de Nim	25 ml de Nim	25 ml de LCCV	
	50% de LCCV	23 IIII de IVIIII		
S 4 - Fita Verde	80%de Nim	40 ml de Nim	10 ml de LCCV	
34 - I ila velde	20% de LCCV	40 mi de Min		
S 5 - Fita Azul	90%de Nim	45 ml de Nim	5 ml de LCCV	
3 5 - 1 Ra 74201	10% de LCCV	40 IIII de IVIIII	o mi do Loov	

Figura 9- Preparo da solução: frasco verde com extrato de Nim e frasco marrom com LCCV (1); bioinseticida (2)



Fonte: Própria autora.

A metodologia utilizada nas etapas de formulação do bioinseticida encontra-se resumida no fluxograma a seguir.

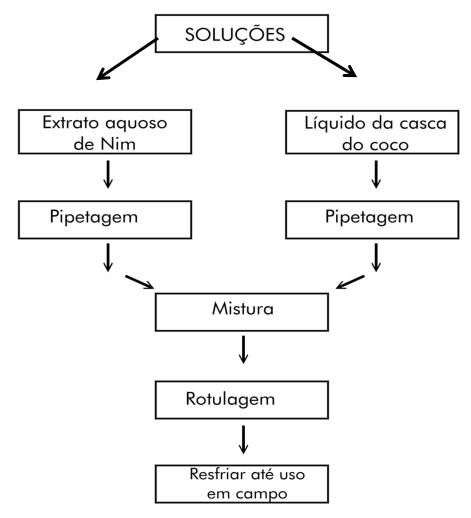


Figura 10 – Fluxograma do procedimento de preparação do inseticida

4.6 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS EXTRATOS ISOLADOS

Após a escolha da solução ideal do bioinseticida (**\$**1) nas concentrações estabelecidas em ensaios preliminares (90% da solução das folhas desidratadas de Nim com a adição de 10% de LCCV), passou-se a preparar soluções testemunhas diluídas com água, para comparativos de eficiência.

Foi preparada a soluções: **SX** (10% de LCCV + 90% de água) e **SY** (90% de Extrato de Nim + 10% de água), ambas utilizadas para a comparação com a solução ideal (**S**1: 90% da solução das folhas desidratadas de Nim com a adição de 10% de LCCV), analisadas *in vivo*. O quadro 4 a seguir detalha as soluções e as identificações respectivas.

Quadro 4 – Soluções isoladas dos extratos

Fitas	Soluções
S1→ Fita Laranja	10%LCCV + 90% Nim
SX → Fita Azul	10%LCCV + 90% Água
SY → Fita Rosa	90% Nim + 10% Água

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BIOINSETICIDA SOBRE AS PRAGAS

4.7.1 Primeira aplicação do bioinseticida nas várias composições

O experimento foi realizado no Horto CLT Mercurius, Empresa de Engenharia, no município de Euzébio-CE, a 28m de altitude, na casa de vegetação (Fig. 11), em plantas de limoeiro e de berinjela que possuíam folhas de texturas diferentes. Apresentava um clima aproximado de 30°C no dia 7 de junho de 2016, às 15h, período do ano com precipitações escassas.

Figura 11 - Casa de vegetação, Euzébio, Ceará

Fonte: Própria autora.

Foi realizada uma avaliação prévia da população de pragas em duas espécies: limão (*Citrus x limon*) e berinjela (*Solanum melongena*) conforme tabela 1 da página seguinte, aplicando os produtos nas suas várias composições.

Os tratamentos foram realizados com um pulverizador portátil de um litro, em aplicação com três repetições, com a pulverização de uns quatro acionamentos do êmbolo, aplicando-se aproximadamente 30 ml por ramo, dirigindo-se o jato para face inferior das folhas.

Tabela 1 - Espécies vegetais utilizadas nos testes

Espécie	Família Botânica	Nome popular	Estrutura utilizada	Local da coleta	Dados da coleta
Solanum melongena	Solanaceae arbustiva	Berinjela	Folha	Horta da Mercurius	7/06/2016
Citrus x limon	Rutáceas	Limão	Folha	Horta da Mercurius	7/06/2016

A avaliação foi realizada sete dias após aplicação das soluções, nas folhas pulverizadas. As folhas foram levadas ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade Terra Nordeste - FATENE, Caucaia-CE, onde foi avaliado o aspecto das folhas, se estavam ressecadas ou não, e também comparados os comportamentos e a mortalidade das pragas na lupa eletrônica.

4.7.2 Segunda aplicação do bioinseticida e inseticidas testemunho

A segunda etapa de teste *in vivo* foi realizada em frutas cítricas, limoeiros e laranjeiras, em virtude da semelhança entre as texturas das folhas, em um Sítio localizado em Caucaia-CE, na Rua Francisco de Sá no Garrote Village II. A área apresentava temperatura aproximada de 32°C no dia27 de agosto de 2016, às 10h, com leves precipitações.

Figura 12 – Foto do sítio localizado no Garrote Village II, Caucaia, Ceará



Fonte: Própria autora.

Foram analisadas as populações de pragas, aplicando o bioinseticida na concentração ideal (**\$**1) versus os inseticidas testemunho nas suas diferentes formulações. Através de uma aplicação de três repetições, utilizando-se um

pulverizador portátil de um litro, aplicou-se aproximadamente 30 ml por ramo, dirigindo o jato para face inferior das folhas. Após 12 dias da aplicação, retornou-se à propriedade para análises dos resultados.

4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DO BIOINSETICIDA

4.8.1 Determinação do teor de proteínas totais- ensaio de Bradford

Para determinar o teor de proteínas no extrato de Nim e do bioinseticida foi realizado o Ensaio de Bradford, conforme protocolo encontrado na literatura.

O método Bradford é um dos métodos mais comuns utilizado para quantificar e medir concentrações de proteínas em soluções, ou em biofármacos. A maioria destes testes apresentam proteínas, glicoproteínas ou bioconjugados. Para determinar a atividade biológica de um fitoterápico, faz-se necessário quantificar a concentração de proteínas, pois sua ação biológica depende desta quantificação (CHENG, 2016; QIAN, 2014).

Inicialmente, foi medido o pH no inseticida, em seguida, foi plotada uma curva padrão no *software* do espectrofotômetro NanoDrop (GE Healthcare), com uma mistura de BSA (Albumina Sérica Bovina) com o reagente de Bradford.

Para a precipitação com TCA (Ácido Tricloroacético), foi utilizada uma solução com 10% de acetona, seguida da filtração, agitação da amostra e centrifugação. A mistura foi incubada a -20 °C por 24 horas e, no dia seguinte, o precipitado indicou uma quantidade relevante de proteínas presentes na amostra. Após a precipitação com ácido tricloroacético, o sobrenadante proteico foi analisado pelo Método Bradford (CHENG, 2016; QIAN, 2014).

4.8.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de análise para interpretar o espectro infravermelho, a partir do qual, pode-se ter em mãos uma espécie de impressão digital de um composto químico, uma vez que cada composto difere de outro em função da composição química, isto é, dos vários átomos que o formam, e da geometria molecular que eles apresentam.

Assim, esta análise do espectro permite observar a predominância de grupos funcionais que sugerem a presença de determinados compostos químico (OLIVEIRA, 2001).

Cada uma das bandas que aparecem no espectro refere-se a uma associação de uma onda vibracional. É a absorção da radiação eletromagnética, informando assim que vários deles não aparecem porque não modificam o momento de dipolo intrínseco da molécula, e assim não são ativos no infravermelho (OLIVEIRA, 2001).

As amostras analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier são atravessadas por um feixe de luz infravermelha, que formaram os gráficos, registrados no espectro da figura do Extrato do Nim e na figura do bioinseticida formado de Nim + LCCV, com diferentes variações, que compreendeu as bandas espectral entre 600 a 3400 ondas/cm, que caracterizam os grupos funcionais conforme o grupo de átomos formadores das moléculas.

4.8.3 Determinação de carboidratos solúveis e substâncias relacionadas pelo método colorimétrico de Dubois

O teor total de carboidratos é comumente medido pelo Método de Dubois e é útil para determinação de açúcares simples, oligossacarídios, polissacarídios e seus derivados, incluindo éteres metílicos com grupos redutores potencialmente livres. Este método, também chamado de fenol-ácido sulfúrico é um dos mais confiáveis na mensuração de açúcares neutros em oligossacarídios, proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios. É amplamente utilizado devido a sua simplicidade e sensibilidade. Outros testes utilizam antrona, orcinol, ou o resorcinol, que podem ser sensíveis, mas não tão conveniente. Na sua forma original, é necessário de 50 a 450 nmol de monossacarídeos ou equivalente para análise e, portanto, é inadequada para amostras preciosas (ABBOTT, 1995; MASUKO, 2005).

Inicialmente foi utilizada uma solução padrão D-Glicose na concentração de 100 μ g/ml. Foram diluídos os extratos com D-Glicose, após foram desidratadas com ácido sulfúrico concentrado P.A. e logo complexado com solução de fenol 5%. Aconteceu a virada de cor para amarelo-laranja, logo agitada os tubos no Vortex. Deixado em repouso por 20 min. e monitorada no espectrofotômetro Ultrapec, com a medida da absorbância realizada em λ = 490 nm, na região do visível. Este método

é simples e nos permite medir a quantidade de carboidratos presentes na amostra. Foi preparada em triplicata e depois analisada a curva padrão de glicose no intervalo de 10 a $70~\mu g/ml$.

Para construção da curva padrão, foi preparada uma solução a 0.1% ($100\mu I/mI$) de glicose diluída em água destilada. Foram utilizados como reagentes, fenol 5% e ácido sulfúrico PA (H_2SO_4).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises indicam resultados observacionais e químicos da *Azadirachta indica* e o LCCV, na busca de novos inseticidas no controle de pragas, biodegradabilidade, redução do impacto ambiental, fazendo a relação ao controle biológico. O LCCV foi colocado como coadjuante e fixador do inseticida aderindo a folha, evitando perdas em dias chuvosos.

5.1 EXTRATO DAS FOLHAS DESIDRATADAS DE NIM

O extrato obtido apresentou uma solução límpida, de cor verde oliva e de pouquíssima viscosidade. Foi obtido um litro de extrato para 150 g do pó das folhas de Nim. A figura 13 abaixo ilustra a obtenção do extrato das folhas de Nim.



Figura 13 - Foto da obtenção do extrato das folhas de Nim

Fonte: Própria autora.

5.2 ANÁLISES DA PRIMEIRA APLICAÇÃO DO BIOINSETICIDA NAS VÁRIAS COMPOSIÇÕES

A avaliação foi realizada após sete dias de aplicação das diferentes soluções do inseticida, nas plantas de limoeiro e berinjela, onde foi encontrada divergências de resultados devido às espécies de plantas diferentes e as soluções aspergidas agirem de forma diferente.

Foram consideradas as diferentes formulações dos inseticidas, a sensibilidade das folhas escolhidas e a mortandade das pragas. Os resultados obtidos durante o transcorrer do experimento estão expressos de forma sumarizada nos quadros 5 a 9 a seguir.

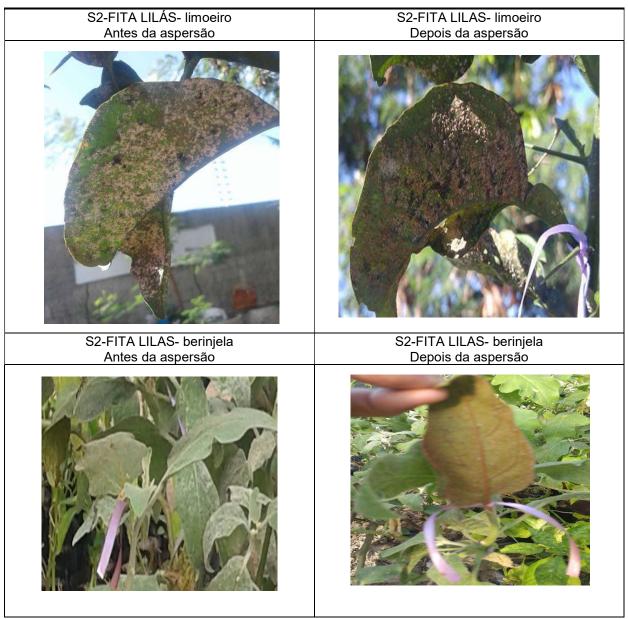
Quadro 5 – Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o uso da solução bioinseticida S1 (10% de Nim + 90% de LCCV)

DIG.110011011011011011011011011011011011011	
S1-FITA LARANJA- limoeiro	S1-FITA LARANJA-limoeiro
Antes da aspersão	Depois da aspersão
S1-FITA LARANJA- berinjela	S1-FITA LARANJA- berinjela
Antes da aspersão	Depois da aspersão

Fonte: Própria autora.

Na aspersão da **\$**1 (90% LCCV e 10% Nim) identificada pela fita laranja, foi observado que na berinjela houve comprometimento das características das folhas que ficaram com aspecto de murchas e escurecidas em ambos os lados. Nas folhas de limoeiro, foi observado controle das pragas e a folha com aspecto quebradiço.

Quadro 6 – Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o uso da solução bioinseticida S2 (20% de Nim + 80% de LCCV)

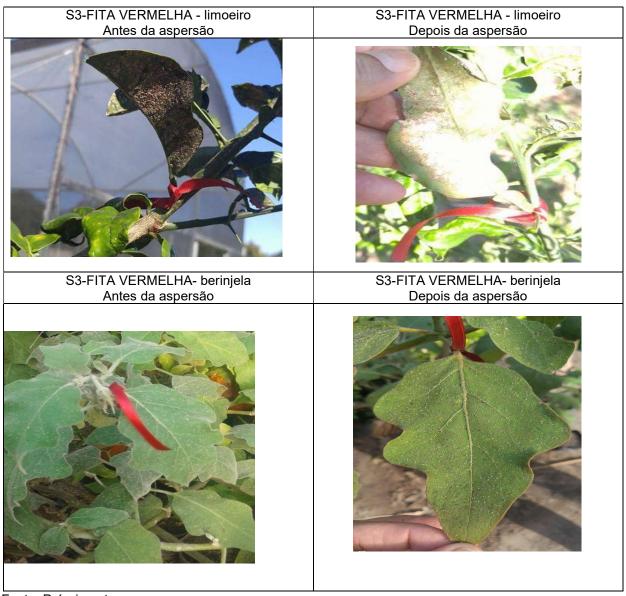


Fonte: Própria autora.

Na aspersão da **\$**2 (80% LCCV e 20% de Nim) identificada pela fita lilás, foi observado que na berinjela houve um comprometimento das características das

folhas, ficando um pouco murchas e escurecidas em ambos os lados, principalmente no lado inferior onde foi aspergido. Nas folhas de limoeiro, foi observado controle das pragas e as folhas com um aspecto um pouco quebradiço.

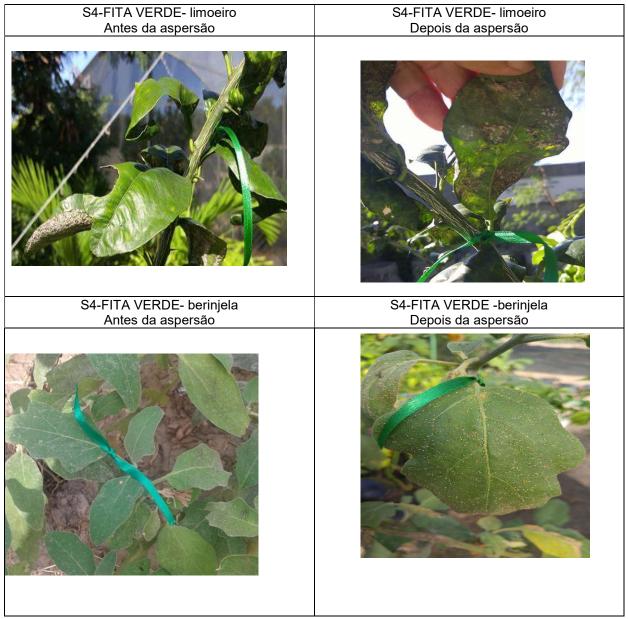
Quadro 7 – Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o uso da solução bioinseticida S3 (50% de Nim + 50% de LCCV)



Fonte: Própria autora.

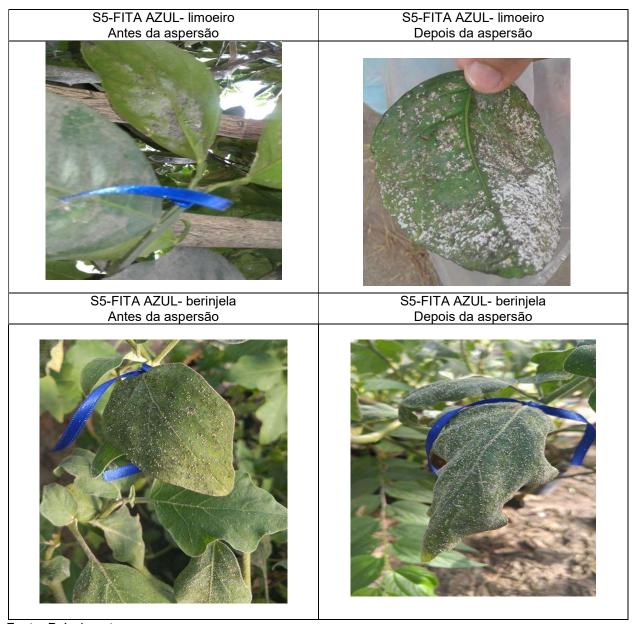
Na aspersão da **\$**3 (50% LCCV e 50% de Nim) identificada pela fita vermelha, foi observado que a berinjela apresentou uma redução das características das folhas, ficando levemente murchas e escurecidas em ambos os lados, principalmente nas bordas. No limoeiro, foi observado que nas folhas houve controle das pragas e as folhas levemente quebradiças.

Quadro 8 – Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o uso da solução bioinseticida S4 (80% de Nim + 20% de LCCV)



Na aspersão da **\$**4 (20% LCCV e 80% de Nim) identificada pela fita verde, foi observado que a berinjela apresentou uma redução das características das folhas, ficando levemente murchas, principalmente nas bordas e levemente escurecida em ambos os lados. No limoeiro, foi observado que nas folhas houve controle das pragas e as folhas estavam minimamente quebradiças.

Quadro 9 – Sensibilidade das folhas e mortalidade das pragas com o uso da solução bioinseticida S5 (90% de Nim + 10% de LCCV)



Na aspersão da \$5 (10% LCCV e 90% de Nim) identificada pela fita azul, foi observado que a berinjela apresentou pouquíssima redução das características das folhas, ficando minimamente murcha e com as bordas envergadas. No limoeiro, foi observado que as folhas estavam com um aspecto normal e as pragas controladas.

A diferenciação das soluções de inseticidas aplicadas quanto à seletividade dos inimigos naturais e as características das folhas encontra-se detalhada na tabela 2 a seguir.

Tabela 2- Avaliação das folhas após sete dias de aplicação do bioinseticida

Frascos	Limoeiro	Berinjela	
S1 - Laranja (10% Nim + 90% LCCV)	Controlou as pragas ++++ quebradiça	Controlou as pragas Aspecto murcho e muito escurecido embaixo e em cima e aspecto quebradiço	
S2 - Lilás (20% Nim + 80% LCCV)	Pragas mortas +++ quebradiça	Pragas mortas Murcha e escurecida em cima e embaixo	
S3 - Vermelha (50% Nim + 50% LCCV)	Pragas mortas ++ quebradiça	Pragas mortas Levemente murcha e levemente escurecida	
S4 - Verde (80% Nim + 20% LCCV)	Pragas mortas + quebradiça	Pragas mortas Minimamente murchas escurecida	
S5 - Azul (90% Nim + 10% LCCV)	Pragas mortas Aspecto normal	Pragas mortas Minimamente murchas	

A berinjela (*Solanum melongena* L.)tem folhas pilosas que retêm mais líquido, injuriando e absorvendo o tom do LCCV. Suas margens onduladas e lobuladas e bases arredondadas murcham com mais facilidade, sendo descartada a berinjela, e optou-se em continuar os testes somente com frutas cítricas. As folhas de limoeiro são lisas, perenes e brilhantes e ficam menos tempo em contato com a solução, logo apresentam-se menos injuriadas. O LCCV apresenta cátions, açúcares, cloretos e sulfatos que podem ressecar as folhas, deixando-as quebradiças.

5.3 MICROSCOPIA ÓPTICA DAS FOLHAS

A análise do efeito do bioinseticida pela observação através de lupa eletrônica, permitiu avaliar aspectos das folhas e os comportamentos de mortalidade das pragas (Fig. 14). Não foram analisadas as folhas de Berinjela, pois estavam muito murchas e quebradiças no momento da leitura.

Figura 14 – Análise do efeito do bioinseticida pela observação através de microscopia óptica



A análise após a aplicação sobre as plantas em presença do pulgão e da cochonilha levou aos resultados descritos a seguir no quadro 10.

Quadro 10 – Resultado da avaliação das folhas de limoeiro através de microscopia óptica

SOLUÇÃO	LIMOEIRO		
S 1	Folhas quebradiças Controlou as pragas		
\$ 2	Folhas um pouco quebradiças Controlou as pragas		
S 3	Folhas levemente quebradiças Pragas mortas		
S 4	Folhas minimamente quebradiças Pragas mortas		
\$ 5	Folhas de aspecto normal Pragas mortas		

Foi escolhida a solução **\$**5 como a mais eficiente, e denominada Solução Ideal (**\$I**) porque apresentou uma maior eficácia no controle das cochonilhas e pulgões sem apresentar sensibilidade e ressecamento nas folhas. Foram observados os efeitos dos extratos testemunho comparados ao **\$I** e analisados os efeitos individualizados do Nim e do LCCV.

5.4 ANÁLISES DA SEGUNDA APLICAÇÃO DO BIOINSETICIDA E INSETICIDAS TESTEMUNHO

A aplicação foi realizada aspergindo a solução inseticida ideal (**SI**) e os comparativos dos extratos testemunho misturados com água nas plantas de limoeiros e laranjeiras, em um sítio particular, localizado em um distrito de Caucaia. Os resultados foram registrados decorridos 12 dias da aspersão e estão apresentados no quadro 11 a seguir.

Quadro 11 - Resultado da segunda aplicação do bioinseticida e inseticidas testemunho

Soluções	Limoeiro 1	Laranjeira2	Limoeiro 3
SI (90% Nim + 10% LCCV) Fita Laranja	Controle total Folha normal	Controle total Folha normal	Controle total Folha verdinha
SX (10% LCCV + 90% água) Fita Azul	Controle parcial Folha normal	Controle parcial Folha normal	Controle parcial Folha verdinha
SY (90% Nim + 10% água) Fita Rosa	Controle total Folha normal	Controle Ótimo Folha normal	Controle parcial Folha verdinha

Fonte: Própria autora. *Nota*: O limoeiro 3 era uma árvore em crescimento.

Nas figuras 15 a 17 a seguir são mostradas as imagens com identificação através das fitas, das soluções **SI**, **SX** e **SY**.

Figura 15 – Solução Ideal – SI (90% nim + 10% LCCV), fita Iaranja



Fonte: Própria autora.



Figura 16 – SX (10% LCCV + 90% Água), fita azul



Figura 17 - SY (90% Nim + 10% Água), fita rosa

Fonte: Própria autora.

As observações desta etapa foram muito semelhantes, diferenciando somente na população das pragas das folhas aspergidas com o bioinseticida ideal (SI) versus os inseticidas testemunho SX e SY nas suas diferentes formulações. Como as folhas de limoeiro são lisas, perenes e brilhantes não ficaram injuriadas, mas a que foi usada somente o LCCV + Água, que não tem características inseticidas, não foi eficaz no controle das pragas.

5.5 TESTE DE OXIDAÇÃO DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE NIM

Os mais abundantes pigmentos naturais que são encontrados nas variadas espécies de plantas são as clorofilas, ocorrendo nos cloroplastos, assim como também em diversos tecidos vegetais. Estudos em uma diversidade de plantas revelaram que os pigmentos clorofilianos são os mesmos, sendo que as diferenças de coloração ocorrem em virtude da presença de outros pigmentos, como os carotenoides, que estão sempre juntos com as clorofilas (VON ELBE, 2000).

As moléculas de clorofilas possuem uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas as quais reagem facilmente com ácido, base, oxigênio e luz. Tais moléculas reagem facilmente com O₂sob luz formando espécies de oxigênio ativas (foto-oxidação), que oxidam outras moléculas, incluindo lipídios e proteínas e, por esta razão, devem ser monitoradas durante a extração e análises (SHOEFS, 2002).

As folhas como maioria da vida na Terra necessitam de oxigênio para a sua própria existência, mas o mesmo danifica organismos vivos através da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), logo, as folhas sofrem degradação oxidativa, o qual foi aspergido os extratos abaixo e acompanhada visualmente em sete dias, separada em dois grupos: o das folhas naturais e maceradas e das folhas desidratadas do Nim (Fig. 18), preparadas com água ou com LCCV e aspergidos em folhas de limoeiro.

Figura18 –Fotos ilustrativas de folhas naturais (1) e folhas desidratadas (2) de Nim utilizadas na preparação dos extratos



Foram preparadas as soluções comparativas dos extratos para análise da oxidação das plantas. As soluções foram aspergidas em folhas de limoeiro e os resultados observados estão ilustrados nas figuras 19 a 22 a seguir.

Figura 19 – Imagem das folhas de limoeiro no 1º dia da aspersão. Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim + 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água (fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)



Fonte: Própria autora.

Figura 20 – Imagem das folhas de limoeiro no 3º dia da aspersão. Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim + 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água (fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)

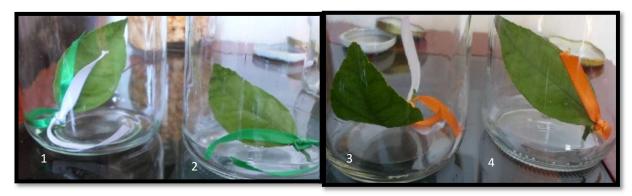


Figura 21 – Imagem das folhas de limoeiro no 5º dia da aspersão. Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim + 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água (fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)



Fonte: Própria autora.

Figura 22 – Imagem das folhas de limoeiro no 7º dia da aspersão. Folha 1 = 90% extrato de folhas verdes maceradas de Nim + 10% água (fita verde + branca); folha 2 = 90% de folhas verdes maceradas de Nim + 10% LCCV (fita verde); folha 3 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% água (fita laranja + branca); folha 4 = 90% extrato de folhas desidratadas de Nim + 10% LCCV (fita laranja)



Observações visuais: as folhas sofrem degradação oxidativa, o qual foi aspergido os extratos abaixo:

- a) O extrato de folhas desidratadas de Nim faz com que as folhas sofram uma degradação oxidativa mais rápida do que o extrato das folhas verdes maceradas, pelo fato de estar mais concentrado;
- b) A diferença entre as folhas de limoeiro aspergidas com os extratos adicionados de LCCV ou água foi que aqueles com LCCV diminuíram levemente a degradação oxidativa em relação àqueles adicionados de água.

5.6 AVALIAÇÃO DAS FOLHAS TRATADAS

Durante as etapas de desenvolvimento do bioinseticida, os estudos foram direcionados para a preservação da fisiologia das plantas, conforme descrito a seguir.

Tabela 3 – Escala de nota (0 a 5) para avaliação de danos pelo bioinseticida nas folhas de limoeiro (*Citrus x limon*)

Nota	Descrição do Dano
0	Folha sem dano
1	Folha completamente ressecada e quebradiça
2	Folha pouco ressecada e quebradiça
3	Folha levemente ressecada e quebradiça
4	Folha minimamente quebradiça
5	Folha com aspecto normal

Fonte: Mazzonetto et al. (2013).

Figura 23 – Quadro de fotos ilustrativas dos escores atribuídos na avaliação dos danos do bioinseticida nas folhas do limoeiro (*Citrus x limon*)

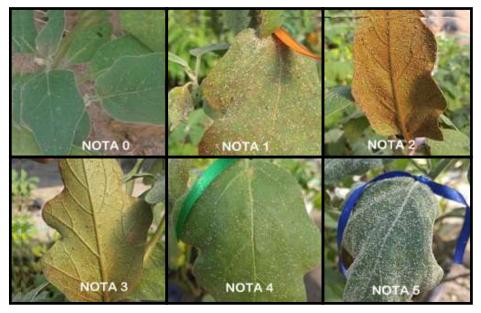


Tabela 4 – Escala de nota (0 a 5) para avaliação de danos pelo bioinseticida nas folhas de berinjela (*Solanum melongena*)

Nota	Descrição do Dano			
0	Folha sem dano			
1	Folha com características comprometidas (murchas, retorcidas,			
	escurecidas)			
2	Folhas murchas, retorcidas e escurecidas em ambos os lados			
3	Folhas levemente murchas com as bordas retorcidas e escurecidas			
4	Folhas, com bordas murchas, escurecidas e retorcidas			
5	Folha minimamente murcha e com bordas retorcidas			

Fonte: Mazzonetto et al. (2013).

Figura 24 – Quadro de fotos ilustrativas dos escores atribuídos na avaliação dos danos do bioinseticida nas folhas berinjela (*Solanum melongena*)



Fonte: Própria autora.

A viabilização do uso do bioinseticida nas plantações de limoeiro e berinjela passam a auxiliar na redução das pragas cochonilha e pulgão, reduzindo as condições favoráveis ao crescimento populacional das espécies.

Normalmente os bioinseticidas são capazes de matar um percentual das pragas, em geral 95%, independente da densidade populacional. Quanto menor a quantidade pragas, maior a eficiência do bioinseticida (CASTELO BRANCO, 2001).

A média da mortandade das pragas e as diferentes constituições dos inseticidas estão representadas na tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Mortandade das pragas pulgões e cochonilhas tratadas com diferentes concentrações do bioinseticida

Bionseticida	% de pragas mortas (média)
Testemunha (Nim + água)	95
Testemunha (LCCV + água)	50
10% de Nim + 90% de LCCV	50
20% de Nim + 90% de LCCV	60
50% de Nim + 90% de LCCV	70
80% de Nim + 90% de LCCV	85
90% de Nim + 90% de LCCV	95

Fonte: Própria autora.

5.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DO BIOINSETICIDA

O estudo da composição dos constituintes dos extratos biológicos fornece uma informação importante para o estudo de suas funções na natureza. Foram realizados ensaios de monitoramento do pH, da concentração de proteínas, da concentração de carboidratos e dos grupos funcionais, por espectroscopia do Infravermelho (CHENG, 2016; QIAN, 2014).

5.7.1 Determinação do teor de proteínas totais pelo método Bradford

A leitura efetuada do pH do inseticida foi 6,2, levemente ácido, e a partir da curva padrão plotada no *software* do espectrofotômetro NanoDrop se iniciou a padronização da medida da concentração de proteínas dos constituintes do bioinseticida, detalhada no quadro 12 a seguir.

Quadro 12 – Concentração proteica no LCCV (mg/ml)

Mistura (%)	Materiais (quantidade)	Concentração (mg/ml)
100	100 μl de LCCV	98,0
50	100 μl de LCCV / 100 μl água milli-Q	59,5
25	100 μl de LCCV / 300 μl água milli-Q	29,8
10	100 μl de LCCV / 900 μl água milli-Q	11,7
5	100 μl de LCCV / 1900 μl água milli-Q	6,5
1	20 μl de LCCV / 1980 μl água milli-Q	1,2

Fonte: Própria autora.

Figura 25 – Ilustração da realização da espectrofotometria no equipamento Nanodrop







Fonte: Própria autora.

Quadro 13 - Concentração proteica no extrato aquoso das folhas de Nim (mg/ml)

Mistura (%)	Materiais (quantidade)	Concentração (mg/ml)
100	20 μl extrato Nim	50,4
50	20 μl extrato Nim / 20 μl água milli-Q	27,0
25	20 μl extrato Nim / 60 μl água milli-Q	13,7
10	20 μl extrato Nim / 180 μl água milli-Q	5,04
1	5 μl extrato Nim / 495 μl água milli-Q	1,02

A partir das concentrações dos extratos, foi validada a presença de proteínas na amostra, através de uma estratégia química de precipitação proteica (Fig. 26), já as leituras podem ser influenciadas por taninos, fenóis e outros metabólitos de plantas.

Após a precipitação com ácido tricloroacético, o sobrenadante proteico foi analisado pelo Método Bradford, resultando em 10,6 mg/ml de proteínas no extrato de *Azadirachta indica*, e 4,2 mg/ml de proteínas no bioinseticida (90% Nim + 10% LCCV).

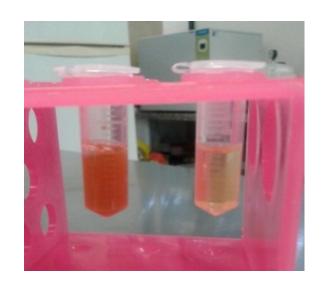


Figura 26 - Amostras precipitadas por ácido tricloroacético

Fonte: Própria autora.

5.7.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

O gráfico1 mostra os espectros do extrato de Nim e o gráfico 2 do extrato do bioinseticida analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, que caracterizam os grupos funcionais conforme o grupo de átomos formadores das moléculas, entre 600 a 3400 ondas.cm⁻¹. A identificação dos grupos funcionais predominantes é realizada através do perfil dos espectros de FTIR-ATR.

Z: Ext. Nim

| Solution | 200 | 1200 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000

Gráfico1 - Espectro infravermelho do extrato de Nim

Fonte: Própria autora.

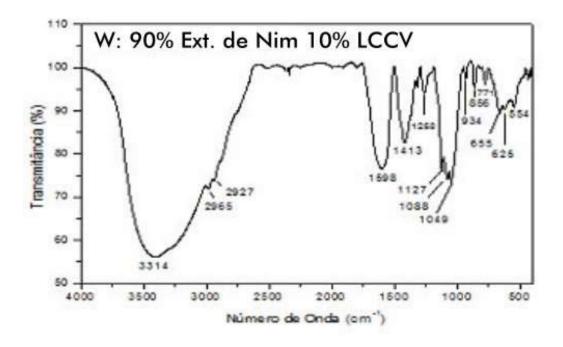


Gráfico 2 - Espectro infravermelho do bioinseticida

Fonte: Própria autora.

Os gráficos1 e 2 mostram os espectros de Nim (**Z**) e de Nim + LCCV (**W**) analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Podese observar que determinados grupos funcionais são evidenciados apenas no

bioinseticida, o que sugere a formação de complexos químicos entre o extrato do Nim e o LCCV.

Desta forma, torna-se necessária a análise detalhada de todos os grupos funcionais, da sobreposição de picos, e das modificações do potencial químico do extrato de Nim a partir da adição do LCCV.

Foi encontrada no Nim (**Z**), evidencias de sete grupos funcionais e no Nim + LCCV (**W**), oito grupos.

No gráfico **W** há a presença de uma banda de absorção em 3306e 3314 cm⁻¹indicativa de grupamento OH, de função mista como fenol, alcóois ou aldeído. Mas no gráfico **W** aparece uma banda associada a uma onda de absorção em 2965 a 2927 cm⁻¹ que é característica de CH de carbono de hibridação Csp³-H (IBRAIM, 2006).

O pico entre 1590 a 1598 (gráfico **Z** e **W**) revela a presença de grupo NH₂ de amidas primárias e secundárias, o que é confirmado pela presença das proteínas. Nas bandas de absorção de 1405 a 1413 cm⁻¹ encontra-se um estiramento do grupo C-O-H do grupo fenólico. As regiões subsequentes, entre 1258 e 1289 cm⁻¹ foram detectadas em ambas as amostras e indicam, possivelmente, a presença de carboidratos derivados do estiramento grupo C-O-C (BOERIU, 2004).

No gráfico **Z**, a banda 1040 cm⁻¹ foi atribuída aos polissacarídeos C-O em compostos cíclicos e que sofre alteração para o gráfico **W**, nas absorções entre 1127-1088-1049 cm⁻¹ também polissacarídeos de estiramento da ligação C-O quando ligado ao grupo C-O-C, caracterizando como acetileno no bioinseticida (WILLIANS; FLEMING, 1995).

No gráfico **Z** foi encontrada a banda de absorção 879 cm⁻¹, indicativa da presença de ligação dupla, caracterizando estrutura de Manose e Glicose, o que altera para o gráfico **W** as absorções entre 934-856-771 cm⁻¹ que são compatíveis com a presença de compostos fenólicos.

As bandas no gráfico **Z** de 670 cm⁻¹ que muda no gráfico **W**, para as absorções entre 655-625-554 cm⁻¹ caracterizam ligações (C-H, ArH) presentes em vários tipos de mono e polissacarídeos.

5.7.3 Determinação de carboidratos solúveis e substâncias relacionadas pelo método colorimétrico de Dubois

Para construção da curva padrão do teor total de carboidratos, foi preparada uma solução a 0,1% (100µl/ml) de glicose diluída em água destilada. Foram utilizados como reagentes, o fenol 5% e o ácido sulfúrico PA (H₂SO₄). A amostra e os reagentes foram divididos em sete tubos de ensaio, diluídos conforme a quadro 14. Os dados da leitura do espectrofotômetro da concentração de carboidratos no bioinseticida estão demonstrados no quadro 15.

Quadro 14 - Preparo das amostras da curva padrão

TUBOS	GLICOSE (ml)	ÁGUA (ml)	FENOL	H ₂ SO ₄ -
BRANCO	-	1,0	1 ml	5 ml
1	0,1	0,9	1 ml	5 ml
2	0,2	0,8	1 ml	5 ml
3	0,3	0,7	1 ml	5 ml
4	0,4	0,6	1 ml	5 ml
5	0,5	0,5	1 ml	5 ml
6	0,6	0,4	1 ml	5 ml
7	0,7	0,3	1 ml	5 ml

Quadro 15 - Leitura da curva padrão

Concentração (mg/ml)	Absorbância (490 nm)
0,1	0,112
0,1	0,119
0,2	0,198
0,2	0,192
0,2	0,188
0,3	0,304
0,3	0,308
0,3	0,337
04	0,443
0,4	0,405
0,4	0,392
0,5	0,519
0,5	0,529
0,5	0,477
0,6	0,638
0,6	0,590
0,6	0,656
0,7	0,739
0,7	0,733

Fonte: Própria autora.

Para determinação da quantidade de polissacarídeos totais, a glicose foi substituída pelas amostras em estudo, no caso, *Azadirachta indica* e o bioinseticida (90% Nim + 10% LCCV). As concentrações de carboidratos medidas no espectrofotômetro (Fig. 27) estão descritas no quadro 16 para o extrato de Nim e no quadro 17 para o bioinseticida (Nim + LCCV).

Figura 27 – Fotos ilustrativas dos tubos com as amostras (1) e da leitura em espectrofotômetro Ultrapec (2)

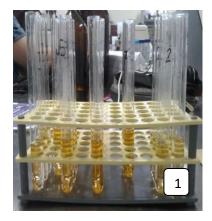




Foto: Própria autora.

Quadro 16 - Leituras do extrato de Azadirachta indica

TUBOS	Abs. (490 nm)			Média	[açúcar] (mcg/ml)
1	0,474	0,460	0,504	0,474	0,44
2	0,547	0,542	0,665	0,547	0,51

Fonte: Própria autora.

Quadro 17 - Leituras do bioinseticida (Nim + LCCV)

TUBOS	Abs. (490 nm)			Média	[açúcar] (mcg/ml)
1	0,095	0,113	0,116	0,113	0,07
2	0,112	0,110	0,111	0,111	0,07

A partir dos dados acima foi obtida a curva padrão da glicose.

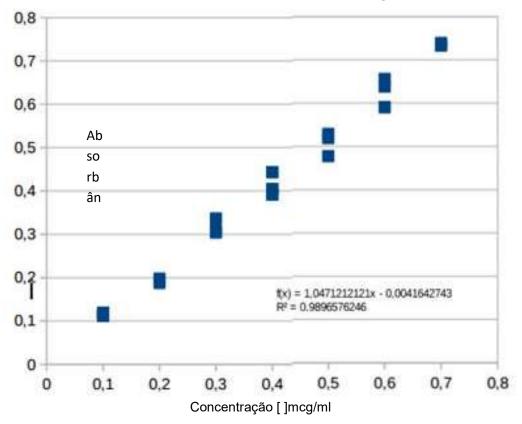


Gráfico 3 - Curva padrão da glicose

Fonte: Própria autora.

De acordo com a curva padrão e o coeficiente de regressão linear, o método colorimétrico indica que o teor de carboidratos nas amostras é:

- Nim = 0,44 a 0,50 mcg/ml;
- Bioinseticida (Nim + LCCV) = 0,07 mcg/ml.

6 CONCLUSÃO

A associação do extrato de folhas desidratadas de Nim e do líquido da casca de cocos verdes representa uma combinação de sucesso.

O bioinseticida compõe um método biotecnológico e sustentável apresentando vantagens em relação aos inseticidas convencionais por ser biodegradável e não se acumular no meio ambiente.

É um método de controle biológico que inibe o crescimento na fase larval, reduzindo a fecundidade e causando danos no trato gastrintestinal, provocando a sua morte.

O bioproduto se mostrou eficiente nos ensaios biológicos, tornando-se uma ferramenta biotecnológica para sua utilização como inseticida.

7 PERPECTIVAS

Ensaios posteriores relacionados à eficiência, testes de toxicidade em murídeos ou em peixes, e análises bioquímicas mais detalhadas são ainda necessárias.

O bioproduto deverá ser ainda testado em outras plantações e em outras pragas.

O bioinseticida deverá ter outras formas de apresentação mais convenientes, preferencialmente na forma de pó a ser diluído em água.

Após a identificação dos compostos mais relevantes do bioinseticida, a estabilização dos mesmos pelo processo de encapsulamento e liofilização potencializará seu poder de ação.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, N.; CABRALES, L.; HAIGLER, C. H. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, p. 9-16, 2014.
- ANNUNCIADO, T. R. Estudo da *Chorisiaspeciosa* e outras fibras vegetais como sorventes para o setor de petróleo. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ARAÚJO, A. M. et al. Avaliação do potencial de aproveitamento do líquido da casca de coco verde. Brasília: EMBRAPA, 2006. (Circular Técnica do Ministério da Agropecuário Embrapa).
- ARAUJO, A. M.; ROSA, M. F.; BRÍGIDA, A. I. S. Potencial de aproveitamento da casca de coco verde. In: REUNIÓN DE LA SOCIEDAD INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL. 50., 2004, Limón. **Anales...** Costa Rica: Universidad EARTH, 2004.
- ARAÚJO, L. V. C.; RODRIGUEZ, L. C. E.; PAES, J. B. Características físico-químicas e energéticas da madeira de nim indiano. **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 151-59, 2000.
- BARBOSA, F. R. *et al.* Controle do caruncho-do-feijoeiro Zzbrotessubfasciatus com óleo de vegetais, munha, materiais inertes e malathion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1213-17, 2002.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, SP, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.
- BISWAS, K. *et al.* Biological activities and medicinal properties of neem (Azadiratcha indica). **Current Science**, v. 82, n. 11, 2016. Disponível em: http://repository.ias.ac.in/5193/1/305.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2016.
- BRANCO, M. C. *et al.* Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, v. 19, p. 60-3, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normas Técnicas para Controle e certificação de Núcleos. Instrução Normativa nº 63, de 17 de dezembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1, p. 21.
- BRECHELT, A.; FERNANDEZ, C. L. **El Nim.** Un árbol para la agricultura y el medio ambiente. Experiencias en la Republica Dominicana. San Cristóbal, Rep. Dom.: Fundación Agricultura y Medio Ambiente, Amigo del Hogar, 1995.133 p.
- BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F. Determinação do teor de taninos na casca de coco

verde (Cocos nucifera). Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort., v. 47, p. 25-7, 2003.

BRUNHEROTTO, R. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lep., Gelechiidae) criadas em diferentes genótipos de tomateiro. 2000. 98f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2000.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 455-9, 2001.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 533-5, 2002.

CARVALHO, S. M.; FERREIRA, D. T. Santa Bárbara contra vaquinha. **Ciência Hoje**, v. 11, n. 65, p. 65-7, 1990.

CIOCIOLA JUNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim**: alternativa no controle de pragas e doenças. Belo Horizonte: EPAMIG. 2002. 24 p.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1118-25, 2000.

CONRICK, J. Neem: The ultimate herb. [s.l.]: Lotus Press, 2001.

CORRADEIO, E. As plantas veneno: uma alternativa aos agrotóxicos. **Brasil Agrícola**, São Paulo, v. 121, p. 22-6, 1988.

CRISÓSTOMO, L. A.; ARAGÃO, F. A. S. Utilização do líquido da casca de cocoverde em pomar de coqueiro anão e efeitos sobre as características do solo e da planta. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 26 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 56). <Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Bd_56.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

CRUZ, I. *et al.* Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (SMITH, J. E.) em milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 2, p. 293-7, 1996.

CUTLER, H. G. Natural products and their potential in agriculture. **ACS Symposium Series**, v. 380, 1988. ISBN13: 9780841215566, eISBN: 9780841212329.

DEPIERI, A. R.; MARTINEZ, S. S. Neem, *Azadirachta indica* A. Juss, oil effects in the mealy bug *Plano coccus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., 2002, Manaus, **Anais...**

Manaus, 2002, p. 136.

DEPIERI, R. A.; MARTINEZ, S. S.; MENEZES JÚNIOR, A. O. Compatibilidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) com extratos de sementes e folhas e o óleo emulsionável de nim. **Neotropical Entomology**, Londrina, PR, v. 34, n. 4, p. 601-6, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2005000400010&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 abr. 2016. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000400010.

ELAKOVICH, S. D. Terpenoids as models for new agrochemicals. In: CUTLER, G. H. **Biologically active natural products:** potential use in agriculture. Washington, DC: American Chemical Society, 1988, p. 250-61.

EMBRAPA. **Cultivo do pessegueiro pragas e métodos de controle.** Clima Temperado Sistemas de Produção, 2005. Disponível em https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/CultivodoPessegueiro/cap12.htm. Acesso em: 20 jun. 2016.

. Manual de recolhimento e controle das principais pragas do Antúrio no Estado do Ceará. Brasília: EMBRAPA, 2008. p. 12. (Documentos 114).
Inseticidas botânicos, seus principais ativos, modo de ação e uso agrícola. Brasília: EMBRAPA, 2005. (Documentos 205).
A introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agronômica Brasília: EMBRAPA, 2002. (Documentos 47).
Determinação do teor de taninos na casca de coco verde (<i>Cocos nucifera</i>). In: BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003.

FARIA, E. A. *et al.* Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, p. 5-9, 2002.

FARINHA, A. E. C. C. Insetos sugadores pragas das plantas ornamentais. São Paulo: Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Palestra 38, 2006. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/XIVRifib/. Acesso em: 20 jul. 2016.

FIGUEIREDO, M. G. *et al.* Relação econômica dos setores agrícolas do Estado do Mato Grosso com os demais setores pertencentes tanto ao Estado quanto ao restante do Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 557-75, 2005. Disponível em:

">http://dx.doi.org/10.1590/S0103-20032005000300008.

FIGUEIREDO, T. L. *et al.* Avaliação da eficiência do óleo de neem e extrato de fumo no controle do pulgão do pinus, *Cinara atlantica*, em laboratório. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 1., 2002, Colombo. **Anais...** Colombo: EMBRAPA Florestas, 2002, p.10-6.

FORIM, M. R. Estudo fitoquímico do enxerto de Azadirachta indica sobre a *Melia azadirach*: quantificação de substâncias Inseticidas. São Carlos, SP: Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 2006.

FURTADO, R. F.; SILVA, F. P.; BLEICHER, E. Flutuação populacional de pulgão e cochonilha em cultivares diferentes de algodoeiro herbáceo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 3, p. 264-9, 2008.

GOSMANN, G. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed., Porto Alegre: Ed. UFGRS / Ed. UFSC, cap. 24, p. 517-43, 2001.

GUMIERO, V. C. Estudo do efeito do extrato de nim (*Azadirachta indica*) em cultura de células de *Rubus fruticosus*. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008. doi:10.11606/D.60.2008.tde-31072009-172410. Acesso em: 17 set. 2016.

HOWATT, K. *Azadirachta indica*: one tree arsenal against pests. **Pesticides Science**, v. 37, p. 34-56, 2003.

HOWATT, K. 1994. **Azadirachta indica:** one tree's arsenal against pests. Fort Collins, Colorado, EUA: Colorado State University, n. 80523. Disponível em: _Acess

0010(20000515)80:7%3C1118::AID-JSFA570%3E3.0.CO;2-9/abstract>. Acesso em: 10 ago. 2016. doi:

http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/couses/en570/papers

IAGRO, Agencia Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal. **Neem:** planta ainda pouco conhecida no Brasil pode proteger o rebanho. 2016. Disponível em: http://www.iagro.ms.gov.br/neem-planta-ainda-pouco-conhecida-no-brasil-pode-proteger-o-rebanho/>. Acesso em: 20 jun. 2016.

IAPAR - INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. Disponível em: http://www.iapar.br/zip_pdf/Nim2.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2006.

- IBGE Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção Agrícola Municipal, Coordenação de Agropecuária COAGRO. **Resultados da Produção Agrícola Municipal 2015**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br. Acesso em: 23 set 2016.
- IBRAHIM, M. *et al.* Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. **Eclética Química**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 15-21, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-4670200600030000-46702006000300002.
- IMENES, S. D. L.; ALEXANDRE, M. A. V. **Pragas e doenças em plantas ornamentais**. São Paulo: Instituto Biológico de São Paulo, 2001.
- IMENES, S. L.; IDE, S. Principais grupos de insetos pragas em plantas de interesse econômico. **O Biológico**, v. 64, p. 235-8, 2002.
- KOUL, O.; ISMAN, M. B.; KETKAR, C. M. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 1990.
- LAGUNES-TEJEDA, A. Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. 1989.
- LEAL A. C. *et al.* Enxertia intergenérica entre neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e cinamomo (*Melia azedarach* L.). In: INTERNATIONAL CONGRESS & EXHIBITION ON FORESTRY, 6., 2000. [s.l.] **Anais...** [s.l.]: Instituto Ambiental Biosfera, Silvicultura, 2000, p. 127-8.
- LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 216-60, 1997.
- LINDEMANN, R. **Neem** A caminho da pecuária sustentável O uso do neem permite ao pecuarista abandonar os produtos químicos convencionais. 2010. Disponível em: http://www.agrolink.com.br/noticias/opiniao--neem---a-caminho-da-pecuaria-sustentavel 139243.html> Acesso em: 20 jun. 2016.
- MANCINI-FILHO, J.; CHEMIN, S. Implicações nutricionais dos ácidos graxos trans. **Óleos e Grãos**, São Caetano do Sul, RS, v. 31, n. 1, p. 41-5, 1996.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Orgs.). **Livro vermelho da flora do Brasil.** Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 187-95.
- MARTINEZ, S. S.; MENEGUIM, A. M. Redução da oviposição e da sobrevivência de ovos de *Leucoptera coffeella* causadas pelo óleo emulsionável de Nim. **Manutenção Integrada de Plagas Agroecológicas**, v. 67, p. 30-4, 2003.

- MARTINEZ, S. S. Effects of sublethal doses of azadirachtin on the development of *Spodoptera littoralis*. 1996. 250 f. Tese (Doutorado) University of Reading, England, 1996.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim** *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina, PR: IAPAR, 2002. 142 p.
- MARTINEZ, S. S.; LIMA, J.; BOIÇA Jr., A. L. Avaliação agronômica e fitoquímica de neem, Azadirachta indica de diferentes procedências em vários locais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., 1998, [s.l.] **Anais...** [s.l.]: Sociedade Entomológica do Brasil, 1998, p. 831.
- MARTINS, C. R. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010. In: MARTINS, C. R.; JEJUS JR. L. A. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 28 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 164). Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf>
- MASEL, R. I. **Principles of adsorption and reaction on solid surfaces**. New York: JohnWiley & Sons, 1996. 804 p.
- MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de pós de origem vegetal sobre Acanthoscelidesobtectus (Say) (Coleptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 7, n.1, p. 96, 2013.
- MEDINA, J. C. Coco I Cultura. In: MEDINA, J. C. *et al.* (Ed.). **Coco:** da cultura ao processamento e comercialização. São Paulo: ITAL, 1980. p. 7-172. (Série Frutas Tropicais, 5).
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. **Taninos**. In: SIMÕES, C.M. *et al.* **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFGRS / Ed. UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.
- MENEGUIM, A.M.; MARTINEZ, S. S. Avaliação da eficiência de neem (*Azadirachta indica*) para o controle de ácaros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Entomológica do Brasil, 1998. p. 1053.

MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, PR, v. 29, n. 4, p. 615-32, 2000.

MORDUE, A. J.; BLACHWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, p. 903-24, 1993.

MOSSINI, S. A. G; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. Maringá, PR: Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, 2004.

MOURA, M.; SOARES T. **CAATINGA** - Uso do Nim: uma árvore de muitas utilidades. In: CARVALHO, P. P. (Ed), Ouricuri, PE: CAATINGA, 2006.

MOURA. M. et al. Uso do nim: uma árvore de muitas utilidades. 2006.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 3-20, 2001.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 51, n. 1, p. 331-9, 2003

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L. C. B.; FREITAS, M. A. Importância da analise sanitária de sementes para o manejo da esclerotínia no cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 2 p. (Recomendação Técnica, 49).

NEVES, B. P. *et al.* **Cultivo e utilização do Nim Indiano**. Santo Antônio, GO: EMBRAPA, 2003. 12 p. (Circular Técnica, 62)

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do indiano.** Santo Antônio, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 12 p.

NUNES, J. F; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco em pó em processos biotecnológicos. In: SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA, 14, 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Instituto FRUTAL, 2007.

PINHEIRO, M. M. et al. A defesa das plantas contra doenças. Ciência Hoje, v. 147, n. 3, 1999.

PIZZI, A. **Tanin-based adhesives**. In: PIZZI, A. (Ed). **Wood adhesives**: Chemistry and technology. [s.l.]: Marcel Dekker, 1993. p. 177-246.

PORTAL BRASIL, 2015. Economia e Emprego. **Ministério da Agricultura mapeia principais pragas das lavouras brasileiras.** Disponível em: http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/08/ministerio-da-agricultura-mapeia-principais-pragas-das-lavouras-brasileiras>. Acesso em: 30 ago. 2016.

REPORT OF AN AD HOC PANEL OF THE BOARD OF SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT. **NEEM.** A Tree For Solving Global Problems. Washington, D.C.: National Research Council, National Academy Press, 1992. 139 p.

RIAR, S. S. *et al.* Volatile fraction of neem oil as a spermicide. **Contraception**, v. 42, p. 479, 1990.

RODRIGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**, v. 42, p. 14-22, 1996.

ROSA, M. F. *et al.* Aproveitamento de resíduos da indústria da água de coco verde como substrato agrícola: 1-Processo de obtenção do substrato. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS, 6., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado: CNRS, 2002.

ROSA, M. F. *et al.* Resúmenes. In: REUNIÓN DE LA SOCIEDAD INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 50., La Mercedes de Guácimo, Costa Rica. **Anales...** La Mercedes de Guácimo, Costa Rica: SIHT, 2004.

ROSA, M.F. *et al.* Caracterização do pó da casa do coco verde usado como substrato agrícola. Fortaleza: EMBRAPA CNPAT, 2001. (Comunicado Técnico, 54).

RUTHVEN, D. M. Encyclopedia of Separation Technology, v. 1, p. 94-126, New York.

SANTOS, L. U.; ANDRADE, C. F. S. **Azadirachta indica** - A Árvore do Nim e o Controle de Piolhos. Campinas, SP: Departamento de Zoologia, UNICAMP, 2000.

SAXENA, R. C. Naturally occurring pesticides and their potential. In: SHEMILT, L. W. (Ed.). **Chemistry and World Food Supplies**: The New Frontiers. Oxford: Pergamon Press, 1983. 664 p.

SCHMUTTERER, H. (Ed.). The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other Meliaceous plants. Weinheim: VCH, 1995. 696 p.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 361-71, 2002.

SILVA, F. A. C.; MARTINEZ, S. S. Effect of neem seed oil aqueous solutions on survival and development of the predator *Cyclone dasanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 751-7, 2004.

- SILVA, F. A. C.; MARTINEZ, S. S.; MENEGUIM, A. M. Ação do nim, *Azadirachta indica* A. Juss, na sobrevivência e desenvolvimento do predador *Cyclone dasanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 131.
- SINDCOCO 2012. **O maior coqueiral do mundo**. In: FRANCO, L. Disponível em http://www.sindcoco.com.br/noticia_detalhe.php?idNoticia=24. Acesso em: 17 nov. 2016.
- SINHA, K. C. *et al.* Neen oil as a vaginal contraceptive. **Indian Journal of Medical Research**, v. 79, p. 131, 1984.
- SODEPAZ. **Solidaridad para el desarrollo y la paz.** Disponível em: http://www.sodepaz.org/Nim/ Acesso em: 17 fev. 2006.
- SUNDARAM. K. M. S. Azadirachtin biopesticide: A review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behavior and biological effects. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v. 31, n. 4, p. 913-48, 1996.
- TEIXEIRA, R. B. **Fermentação alcoólica utilizando o líquido da casca do coco verde como nutrientes.** Natal, RN: Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- TULECKE, W. *et al.* The biochemical composition of coconut water (coconut Milk) as related to its plant tissue culture. **Contributions from Boyce Thompson Institute**, v. 21, p. 115-28, 1961.
- VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Org.) **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: Pallotti, 2000. p. 113-28.
- VENDRAMIM, J. D.; SCAMPINI, P. J. Efeito do extrato aquoso de *Mella azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, v. 72, n. 2, p. 159-70, 1997.
- VIANA, P. A.; PRATES, H. T.; RIBEIRO, P. E. A. Efeito de extratos de Nim e de métodos de aplicação sobre o dano foliar e o desenvolvimento da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, v. 6, n. 1, p. 17-25, 2007.
- VIANA, P. A.; PRATES, H. T. **Uso do extrato aquoso de folhas de nim para o controle de** *Spodoptera frugiperda* **na cultura do milho.** Brasília, DF: EMBRAPA Milho e Sorgo. 2006. 5 p. (Circular Técnica, 88).
- VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Mortalidade de lagarta de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de Nim (*Azadirachta indica*). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, v. 4, n. 3, p. 316-22, 2005.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Desenvolvimento e mortalidade larval de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 62, p. 69-74, 2003.

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

VON ELBE, J. H. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, 2000. cap.10, p. 782-99.

WILLIANS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. Londres: McGraw-Hill, 5. ed, 1995.