

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**Wanessa Porto Tito Gambarra**

***Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (HEMIPTERA: APHIDIDAE):  
ASPECTOS BIOLÓGICOS E RESPOSTAS ÀS AÇÕES DE  
BIOINSETICIDAS**

São Carlos, 2015

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Wanessa Porto Tito Gambarra

***Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (HEMIPTERA: APHIDIDAE):  
ASPECTOS BIOLÓGICOS E RESPOSTAS ÀS AÇÕES DE  
BIOINSETICIDAS**

Orientador: Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos, 2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G188tc      Gambarra, Wanessa Porto Tito  
              Toxoptera citricidus (Kirkaldy,1907) (HEMIPTERA :  
APHIDIDAE) : aspectos biológicos e respostas às ações  
de bioinseticidas / Wanessa Porto Tito Gambarra. --  
São Carlos : UFSCar, 2015.  
              130 p.

              Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2015.

              1. Hipoelipticidade. 2. Distribuições periódicas.  
3. Espaço de Sobolev. 4. Sistemas minimais. I. Título.



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

### Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Wanessa Porto Tito Gambarra, realizada em 11/09/2015:

Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva  
UFSCar

Profa. Dra. Odete Rocha  
UFSCar

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri  
UFSCar

Profa. Dra. Ana Lúcia Benjatti Gonzalez Peronti  
UNESP

Prof. Dr. Wesley Augusto Conde Godoy  
ESALQ-USP



“Dedico este trabalho a meu filho **Fernando Neto**, ao meu marido **Francisco Gambarra** e aos meus pais, **Givaldo e Socorro**, pelo apoio, paciência, compreensão e eterno amor. Aqui finalizo mais uma etapa de minha vida e sem vocês com certeza não teria alcançado. Amo vocês!”

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis. Ofereço-te todo meu amor e minha gratidão pela sua imensa fidelidade;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva pela orientação, exemplo de integridade profissional, apoio incondicional, confiança e valiosos ensinamentos;

À Prof. Odete Rocha pelos valiosos ensinamentos que muito acrescentaram em minha vida acadêmica e principalmente, por disponibilizar espaço, equipamentos e material para a realização do trabalho;

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, pela inestimável contribuição à minha formação acadêmica;

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida, imprescindível para minha estadia em São Carlos e para os deslocamentos relacionados à pesquisa, envolvendo diversas instituições;

Às professoras Odete Rocha, Alaíde Gessner e Ana Lúcia Peronti, pelas contribuições no Exame de Qualificação;

Aos professores Sonia Gualtieri, Ana Lúcia Peronti, Wesley Godoy e Odete Rocha pelas contribuições no Exame de Defesa;

Aos técnicos Airton Masci e Paulo Lambertucci, pela amizade e auxílio nas atividades no laboratório;

A todos os amigos dos Laboratórios de Entomologia Econômica e Ecotoxicologia Aquática do Debe – UFSCar São Carlos – SP. Em especial à Keila Rosa, Susan Zambom e Carolina Redoan pela amizade, auxílio nos trabalhos de campo e nos experimentos laboratoriais;

Ao meu esposo Chico Gambarra pela paciência, pelos conselhos, pelo amor, pela compreensão em todos os momentos, pela obtenção dos espectros de RMN e ajuda na estatística. Ao nosso pequeno Fernando Neto pela alegria que sempre nos proporcionou. Agradeço por estarem incansavelmente ao meu lado, sempre!

Aos meus pais amados, Socorro e Givaldo Tito, por me incentivarem sempre neste caminho do crescimento e do aperfeiçoamento. Por sempre cuidarem de mim com tanto amor e preocupação;

A toda minha família, meus irmãos, cunhadas, cunhados e a meus sogros Fernando Gambarra e Ana Fontes, pelo carinho e apoio em todos os sentidos;

A Simone Anese, Patrícia Grissi, Vivivane Pereira, Maria Augusta Machado, Lyege Magalhães, Daniele Santos, Israel Civico, Quezia Cass e Vanessa Pasqualotto por ceder os extratos vegetais para os testes de toxicologia;

A Lafayette Candido, pela amizade, companhia nas coletas, análises no Polo PC, incansável ajuda e atenção em todos os momentos;

Osmundo Pessoa, Amália Gama, Maristela Itatomi, Andréia Nasser, Renata Vilar, Maria Clara Fava, Tainá, Paula Biancolino e Paulo Lambertucci pela amizade, pela agradável convivência e por suprirem, em muitos momentos, a ausência da minha família em São Carlos;

A Lorena Mara, Elenilson Godoy e Luciana Vizotto pela obtenção dos espectros de RMN;

A Máira Proença pelas análises bioquímicas;

A Luciana Fernandes e Eduardo pela valiosa ajuda na confecção das fotos.

*Muito obrigada!*

## Sumário

Resumo Geral.....	IX
Abstract.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIII
Apresentação da tese.....	XVI
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Citricultura no Brasil.....	2
1.1.1 Limão cravo como porta enxertos.....	2
1.2. Aspectos gerais dos afídeos.....	3
1.2.1. Pulgões de citros.....	5
1.2.2. <i>Toxoptera citricidus</i> .....	6
1.3. Controle químico.....	8
1.4. Bioinseticidas.....	10
1.4.1. Uso de extratos botânicos no controle de afídeos.....	12
1.5. Tabela de vida.....	15
1.6. Balanço energético de Afídeos.....	16
2. Justificativa.....	19
Referências bibliográficas.....	19
3. Resultados e discussão.....	34
Capítulo 1. Atividade inseticida de espécies vegetais sobre <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	34
Resumo.....	34
1.1. Introdução.....	35
1.2. Materiais e Métodos.....	37
1.3. Resultados e Discussão.....	40
1.4. Conclusão.....	51
Agradecimentos.....	51

Referências bibliográficas.....	52
Capítulo 2. A Toxicidade do Extrato de Sementes de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss no Desenvolvimento, Sobrevivência e Crescimento de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) e seu potencial uso no controle desta praga dos citros.....	60
Resumo.....	60
2.1. Introdução.....	61
2.2. Materiais e Métodos.....	63
2.3. Resultados e Discussão.....	69
2.4. Conclusão.....	74
Agradecimentos.....	74
Referências bibliográficas.....	75
Capítulo 3. O uso da Ressonância Magnética Nuclear na caracterização e quantificação do honeydew de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	81
Resumo.....	81
3.1. Introdução.....	82
3.2. Materiais e Métodos.....	84
3.3. Resultados e Discussão.....	87
3.4. Conclusão.....	94
Agradecimentos.....	94
Referências bibliográficas.....	94
Capítulo 4. O Balanço Energético de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	100
Resumo.....	100
4.1. Introdução.....	101
4.2. Materiais e Métodos.....	103

4.3. Resultados e Discussão.....	107
4.4. Conclusão.....	115
Agradecimentos.....	116
Referências bibliográficas.....	116
4. Conclusões gerais.....	123
Apêndices.....	125
Apêndice A.....	125
Apêndice B.....	127

## RESUMO

Gambarra, W.P.T. *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae): **Aspectos biológicos e respostas às ações de bioinseticidas**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2015.

Os afídeos são importantes pragas na agricultura, principalmente por serem vetores de vírus fitopatogênicos. Entre as formas de controle desses insetos, estão incluídos os inseticidas botânicos, no entanto, para que o seu controle seja eficiente é necessário também que se conheçam as suas características biológicas. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a bioatividade de diversos extratos vegetais sobre *Toxoptera citricidus*, considerado uma das mais importantes pragas das plantações cítricas. Para isso foi estudado o ciclo de vida e quantificados importantes processos metabólicos, como: consumo, produção, respiração e excreção, e com base nestes, determinado o balanço energético e construída a tabela de vida da espécie. A bioatividade de 11 espécies de plantas incluindo uma nanoformulação do nim, *Azadirachta indica*, foi avaliada por meio de toxicidade aguda. Para isso *T. citricidus* foi mantida sobre *Citrus limonia* em condições controladas e contantes de laboratório. Destas, 5 espécies tiveram ação inseticida sobre *T. citricidus*, causando mortalidade igual ou superior a 80%. A concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) variou de 0,17 a 4,10 mg/mL para ninfas e de 0,30 a 5,01 mg/mL para adultos, assim evidenciando propriedades inseticidas e apresentando elevado potencial para serem utilizados no manejo dessa praga. Uma análise por ressonância magnética nuclear do honeydew permitiu evidenciar a presença de importantes aminoácidos além de carboidratos permitindo aprofundar o conhecimento sobre as interações afídeo-formiga e afídeo-planta hospedeira. O balanço energético total do *T. citricidus* variou dependendo da idade do afídeo. O consumo energético diário foi em média 0,3717 cal para as ninfas e de 0,4761 cal para os adultos. A fração energética à produção foi bastante elevada, em média 60%, evidenciando alta eficiência na retenção de energia. Conclui-se que *T. citricidus* tem importante papel na transferência de energia através dos ecossistemas.

**Palavras-chave:** Plantas inseticidas, tabela de vida, honeydew, balanço energético, pulgão preto.

## ABSTRACT

Gambarra, W.P.T.; *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae): **Biological aspects and answers to bioinsecticides actions.** Doctoral thesis – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2015.

Aphids are important pests in agriculture, mainly because they are vectors of phyto-pathogenic virus. One of the ways to control these insects, is the use of botanical insecticides. However in order to the control to be effective it is also necessary to know their biological characteristics. In this context, the aim of the present study was to evaluate the bioactivity of several plant extracts upon *Toxoptera citricidus*, presently considered one of the most important pests of citric plantations. For this purpose its life cycle has been studied and important metabolic processes as: consumption, production, respiration and excretion were quantified. Based on these data the species life table and energy budget were constructed. The bioactivity of 11 species of plants including a nanoformulation of the neen, *Azadirachta indica*, was evaluated through acute toxicity tests. *T. citricidus* was maintained on *Citrus limonia* under controlled constant conditions in the laboratory. Among these 5 had insecticide activity upon *T. citricidus* causing mortality to 80 % of the individuals tested or more. The lethal median concentration (CL<sub>50</sub> 48h) varied from 0.17 to 4.10 mg/mL for the nymphal phases and from 0.30 to 5.01 mg/mL to adults thus evidencing insecticide properties and presenting high to be used in the management of this pest. A magnetic nuclear resonance of honeydew, the excretion product of this aphid, evidenced the presence of important aminoacids besides carbohydrates allowing an advance in the knowledge on aphid-ants and aphid- host plant. The total energy budget of *T. citricidus* varied according to the aphid age. Mean daily energy consumption were 0.3717 cal for nymphs and 0.4761 cal for adults. The energy fraction invested in production by *T. citricidus* was high, with a mean value around 60%, evidencing high efficiency of energy retention. It was concluded that considering its biological characteristics *T. citricidus* has a relevant role in the energy transference across the ecosystem.

**Key words:** insecticide plants; life-table; honeydew, energy budget, black aphid.



## LISTA DE FIGURAS

1. Introdução.....	1
Fig. 1. Fêmea adulta áptera de <i>Toxoptera citricidus</i> . Fonte: Gambarra, 2012.....	6
Fig. 2. <i>Toxoptera citricidus</i> : a) ninfa de primeiro estágio; b) ninfa de segundo estágio; c) ninfa de terceiro estágio; d) ninfa de quarto estágio. Fonte: Gambarra, 2012.....	7
Fig. 3. Esquema do padrão de utilização de energia dos afídeos. Fonte: Llewellyn, 1987.....	18
3. Resultados e discussão.....	34
Capítulo 2. A Toxicidade do Extrato de Sementes de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss no Desenvolvimento, Sobrevivência e Crescimento de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) e seu potencial uso no controle desta praga dos citros.....	60
Fig. 2.1. Figura 2.1. Relação entre a sobrevivência (Lx) e esperança de vida (ex) de <i>Toxoptera citricidus</i> em ramos de <i>Citrus limonia</i> e quando pulverizados com óleo de nim Nano L5-3. Temperatura de 20±0,5 °C, e fotoperíodo de 12h. n: números de indivíduos.....	68
Fig. 2.2. Probabilidade de sobrevivência (Lx) e fertilidade específica (mx) de <i>Toxoptera citricidus</i> , mantidas em ramos de <i>Citrus limonia</i> e quando pulverizadas com óleo de nim Nano L5-3. Temperatura de 20±0,5 °C, com um fotoperíodo de 12 h. n: números de indivíduos.....	70

Fig. 2.2. Curva de crescimento individual do afídeo <i>Toxoptera citricidus</i> . a) grupo controle; b) exemplares submetidos à exposição crônica de nim Nano L5-3 0,01µg/mL.....	73
Capítulo 3. O uso da Ressonância Magnética Nuclear na caracterização e quantificação do honeydew de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	81
Fig. 3.1. Espectro de RMN de sacarose em D <sub>2</sub> O obtido durante o experimento de ERETIC, com o sinal de referência é colocado em 0,00 ppm.....	86
Fig. 3.2. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do produto de excreção do afídeo <i>Toxoptera citricidus</i> .....	87
Fig. 3.3. Expansões das regiões do espectro. A) 0,8 ppm a 3,4 ppm e B) 4,6 a 8,5 ppm.....	89
Capítulo 4. O Balanço Energético de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	100
Fig. 4.1. Quantidade total de energia usada para a respiração (R) por <i>Toxoptera citricidus</i> criados em laboratório sobre brotos novos de <i>Citrus limonia</i> , na temperatura de 20±0,5 °C, com fotoperíodo de 12 h.....	113

## LISTA DE TABELAS

1. Introdução.....	1
Tabela 1. Referencial científico de inseticidas botânicos e sua potencial atividade sobre os afídeos.....	12
3. Resultados e discussão.....	34
Capítulo 1. Atividade inseticida de espécies vegetais sobre <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	34
Tabela 1.1. Espécie botânica, Família, parte da planta utilizada para a produção do extrato, solventes utilizados para extração, e laboratórios produtores dos extratos vegetais.....	38
Tabela 1.2. Extratos vegetais e as concentrações utilizadas para determinação da CL <sub>50</sub> .....	39
Tabela 1.3. Efeito dos extratos vegetais sobre a mortalidade e fecundidade de <i>Toxoptera citricidus</i> .....	41
Tabela 1.4. Efeito de diferentes bioinseticidas obtidos de extrato de espécies botânicas na mortalidade de ninfas e adultos de <i>T. citricidus</i> .....	44
Tabela 1.5. Valores da Concentração Letal (CL <sub>50</sub> -48h, mg/mL) de extratos obtidos de diferentes espécies vegetais e dos intervalos de confiança (IC – 95%) do teste de toxicidade aguda com ninfas e adultos de <i>Toxoptera citricidus</i> .....	49

Capítulo 2. A Toxicidade do Extrato de Sementes de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss no Desenvolvimento, Sobrevivência e Crescimento de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) e seu potencial uso no controle desta praga dos citros.....	60
Tabela 2.1. Valores médios de duração das fases de desenvolvimento (em dias) e viabilidade (sobrevivência em %) das ninfas de <i>Toxoptera citricidus</i> em ramos de <i>Citrus limonia</i> quando pulverizadas com extrato das sementes de nim, <i>Azadirachta indica</i> , mantidas sob temperatura de $20 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 h.....	66
Tabela 2.2. Parâmetros biológicos (Média $\pm$ DP) de <i>Toxoptera citricidus</i> sobre <i>Citrus limonia</i> em condições controle e quando pulverizadas com extrato de sementes de <i>Azadirachta indica</i> . Temperatura constante de $20 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 h.....	67
Tabela 2.3. Parâmetros da tabela de vida do afídeo <i>Toxoptera citricidus</i> sobre <i>Citrus limonia</i> quando pulverizados com extrato das sementes de <i>Azadirachta indica</i> , e mantidos a $20 \pm 0,5$ °C, e em fotoperíodo de 12 h.....	71
Capítulo 3. O uso da Ressonância Magnética Nuclear na caracterização e quantificação do honeydew de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	81
Tabela 3.1. ERETIC dos compostos químicos do honeydew do afídeo <i>Toxoptera citricidus</i> .....	91
Capítulo 4. O Balanço Energético de <i>Toxoptera citricidus</i> (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).....	100

Tabela 4.1. Concentração total de lipídios, proteínas e carboidratos, porcentagens correspondentes e conteúdo calórico relativos ao peso seco das ninfas e adultos de <i>Toxoptera citricidus</i> criados em ramos de <i>Citrus limonia</i> , na temperatura de $20\pm 0,5$ °C, e fotoperíodo de 12 h.....	107
Tabela 4.2. Produção destinada ao crescimento (Pg), composição química corporal e conteúdo calórico total de ninfas de <i>Toxoptera citricidus</i> criados em laboratório, em <i>Citrus limonia</i> , na temperatura de $20\pm 0,5$ °C, e fotoperíodo de 12 h.....	110
Tabela 4.3. Conteúdo calórico destinado à produção de exúvias por <i>Toxoptera citricidus</i> criados em laboratório, sobre brotos novos de <i>Citrus limonia</i> , na temperatura de $20\pm 0,5$ °C, e fotoperíodo de 12 h.....	111
Tabela 4.4. Gasto energético diário destinado à respiração (metabolismo basal) de <i>Toxoptera citricidus</i> criados em laboratório, sobre brotos novos de <i>Citrus limonia</i> , na temperatura de $20\pm 0,5$ °C, e fotoperíodo de 12 h.....	112
Tabela 4.5. Balanço energético de <i>Toxoptera citricidus</i> expresso em calorias por indivíduo por dia para organismos criados em laboratório em ramos de <i>Citrus limonia</i> , na temperatura de $20\pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 h. Pg= energia para crescimento; Pr= energia para reprodução; Pe= energia para exúvias e Pt= energia total.....	114

## **Apresentação da Tese**

A presente tese foi construída de forma a facilitar a publicação dos resultados obtidos e, em relação ao seu formato, fazem-se necessárias algumas considerações. Inicialmente, realizou-se uma revisão da literatura com a finalidade de se ter o embasamento teórico necessário para o desenvolvimento da tese. Além disso, foi também exposta uma justificativa para a realização do trabalho. Posteriormente, os resultados obtidos e a discussão foram redigidos em capítulos no formato de artigos científicos, os quais foram escritos contemplando os itens Resumo, Introdução, Metodologia, Resultados e Discussão e Referências bibliográficas. A divisão neste formato se justifica, pois torna a publicação dos artigos científicos mais fáceis, embora devido à independência de um capítulo em relação aos demais, repetições tornam-se inevitáveis.

**Capítulo 1 – Atividade inseticida de espécies vegetais sobre *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae)** – Este capítulo aborda os efeitos da toxicidade aguda de 20 extratos vegetais sobre *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae), aplicados diretamente sobre os insetos e sobre o ramo caulinar jovem de *Citrus limonia*, o qual serviu como hospedeiro.

**Capítulo 2 – A Toxicidade do Extrato de Sementes de *Azadirachta indica* A. Juss no Desenvolvimento, Sobrevivência e Crescimento de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) e seu potencial uso no controle desta praga dos citros)** - Este capítulo foi realizado com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda e crônica da nanoformulação de nim L5-3 sobre ninfas e adultos de *Toxoptera citricidus* associados à *Citrus limonia*, em condições de laboratório.

**Capítulo 3 – O uso da Ressonância Magnética Nuclear na caracterização e quantificação do honeydew de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae)** - Este capítulo teve como objetivo a identificação e quantificação dos constituintes do honeydew do afideo *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) mantidos em *Citrus limonia* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

**Capítulo 4 – O Balanço Energético de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae)** – Neste capítulo objetivou-se determinar as principais variáveis relacionadas à equação geral do balanço energético do afídeo *T. citricidus*. A energia total gasta com os processos metabólicos foi calculada por meio da quantificação das taxas de consumo, produção, respiração e excreção.

Com base nesses quatro capítulos, as conclusões gerais da tese foram elaboradas.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura é uma das atividades agrícolas mais importantes no Brasil. É um setor que ocupa lugar de destaque gerando renda interna, empregos e contribuição em termos nutricionais (AGRIANUAL, 2002). Nesse sentido, o limão cravo, *Citrus limonia* Osbeck, exerce significativa importância nas regiões produtoras de citros como porta enxerto (SOARES FILHO et al., 2008), e atualmente com mais de 80% de participação nos pomares paulistas. Plantas enxertadas em limão cravo geralmente têm boas safras a partir dos três anos de idade, além de serem resistentes à tristeza dos citros (CITROLIMA, 2011).

Como a maioria das culturas implantadas, a citricultura é ameaçada por diferentes problemas fitossanitários como as pragas e doenças que fazem com que o custo de produção dos pomares aumente consideravelmente (MEDINA et al., 2008).

Dentre as pragas que ocorrem nos citros destaca-se o pulgão preto, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae), pois além de causar danos diretos, como a sucção contínua de seiva, implicando no enrolamento de brotações e folhas novas com redução no desenvolvimento da planta, é o principal vetor do vírus da tristeza dos citros (COSTA & GRANT, 1951).

O controle dessa praga tem sido feito basicamente através de inseticidas químicos, porém apesar de sua eficiência, estes produtos podem causar uma série de problemas tanto para os humanos como para outras espécies (THOMAZINI et al., 2000). A utilização de novas tecnologias ambientalmente seguras como os bioinseticidas constitui uma alternativa de controle eficiente e viável para diversos insetos-praga, visando minimizar os efeitos negativos do uso indiscriminado de defensivos e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, propiciando assim o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e sustentável (BETTIOL, 1991; VENZON et al., 2006).

A diversidade da flora dos diferentes ecossistemas brasileiros constitui um enorme atrativo na área de manejo de insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela dessas plantas foi investigada com tal finalidade, fazendo com que seja fundamental o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o aproveitamento de espécies vegetais para o manejo produtivo, aliadas à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas naturais (ALTIERI, 2001; BIERMANN, 2009; EMBRAPA, 2010).



## **1.1. A Citricultura no Brasil**

As primeiras plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelos portugueses, que trouxeram as mudas da Espanha no início da colonização com o objetivo de evitar o escorbuto, doença que matava a maior parte das tripulações na época (NEVES & JANK, 2006). Essas mudas se adaptaram ao clima, facilitando a sua dispersão em todo o território brasileiro. Mas, desde o início, foi na região centro-sul do Brasil que a citricultura teve maior destaque, principalmente em função das condições climáticas e pela proximidade com o mercado consumidor (NEVES et al., 2010).

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. O valor total da produção brasileira de citros (laranjas, tangerinas, limas ácidas/limões) atingiu em 2010 a expressiva marca de R\$ 7,1 bilhões, o que faz da citricultura o quinto maior representante do agronegócio brasileiro (IBGE, 2011).

A área plantada está ao redor de 1 milhão de hectares e a produção de frutas supera 19 milhões de toneladas. O suco de laranja brasileiro é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Desde a década de 80 o Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja industrializado, produzindo mais de 50% do volume mundial e exportando 98% de sua produção. Aproximadamente 85% do suco de laranja exportado mundialmente são provenientes do Brasil. Em nenhum outro setor o Brasil exerce uma posição de liderança tão isolada. O setor cítrico brasileiro somente no Estado de São Paulo gera mais de 500 mil empregos diretos e indiretos (EMBRAPA, 2003).

Apesar de não ser o foco econômico e produtivo da maioria dos estados brasileiros, a citricultura desenvolve um papel importante na balança comercial brasileira, no crescimento e no desenvolvimento econômico de várias regiões. Além da comercialização da fruta cítrica, essa atividade compreende a agroindustrialização, com destaque para a produção do suco e do óleo essencial (ZULIAN et al., 2013).

### **1.1.1. Limão cravo como porta enxertos**

Os citros podem ser propagados por sementes, porém, esta propagação restringe-se a porta enxertos devido à ocorrência de juvenalidade. A enxertia por borbulhas consiste no sistema de propagação predominante para os citros, por apresentar

uniformidade na produção e na qualidade dos frutos, precocidade na produção, maior facilidade na colheita e nos tratamentos culturais (MEDINA et al., 2008).

Nesse sentido, o limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) exerce significativa importância nas regiões produtoras de citros como porta enxerto (SOARES FILHO et al., 2008). Dentre as razões principais dessa preferência destacam-se sua produtividade alta e precoce, tolerância à tristeza dos citros e ao déficit hídrico, facilidade de obtenção de sementes, compatibilidade adequada com as variedades copas e indução de crescimento às copas nele enxertadas (POMPEU JUNIOR, 2005).

O limão cravo adaptou-se muito bem ao clima e ao solo brasileiros após a introdução no país e hoje é encontrado na maior parte do território como uma planta selvagem, nas montanhas, pastos ou beiras de rios. Plantas enxertadas em limão cravo apresentam ótimo vigor, adaptando-se muito bem aos tipos mais comuns de solos, mesmo os mais fracos e arenosos (CITROLIMA, 2011).

## **1.2. Aspectos gerais dos afídeos**

Os afídeos (Hemiptera: Aphidoidea) constituem um grande grupo de pequenos insetos de corpo mole, comprimento que varia de 1 a 7 mm, mais frequentemente 1 a 4 mm, normalmente encontrados colonizando uma grande variedade de plantas hospedeiras. Os representantes da família podem ser reconhecidos pelo corpo piriforme característico, pelo par de sifúnculos na parte posterior do abdome e pelas antenas geralmente longas (BORROR & DELONG, 1970).

São considerados monófagos, quando se alimentam de plantas da mesma família; oligófagos quando se alimentam de um pequeno número de plantas não aparentadas e, polífagos quando encontram-se associados a um grande número de plantas hospedeiras (ILHARCO, 1992). Podem ocupar diferentes partes da planta ao longo do seu ciclo biológico (BLACKMAN & EASTOP, 1994), sendo um dos grupos de insetos com maior potencial de danos aos seus hospedeiros, tanto danos diretos causados pela alimentação quanto indiretos (ILHARCO, 1992).

Os danos diretos se devem às graves alterações provocadas nos tecidos vegetais, quer pela constante sucção ou pela introdução de toxinas salivares durante a alimentação (ZUCCHI et al. 1993). Entre os danos indiretos as plantas hospedeiras destacam-se a excreção continuada de melada ou “honeydew”, atraindo formigas e

facilitando a proliferação de fumagina, que acabam por revestir a superfície foliar, prejudicando a fotossíntese e dificultando os processos de respiração e evapotranspiração da planta (GALLO et al. 1988); e a transmissão de vírus, pois constituem o principal grupo de insetos vetores de vírus de plantas, sendo que aproximadamente a metade dos 600 vírus transmitidos por vetores é transmitida pelos afídeos. A família mais importante como vetora de vírus é a Aphididae e sub família Aphidinae, em que se encontram os gêneros *Myzus*, *Macrosiphum* e *Toxoptera*, entre muitos outros (PARRA et al. 2003). Os afídeos por terem alta fecundidade e acentuado polimorfismo tornam-se pragas importantes em muitas culturas.

O desenvolvimento destes insetos pode variar de um local para outro, nas regiões temperadas a maioria das espécies são holocíclicas, ou seja, possui ciclo completo onde uma geração de machos e fêmeas sexuais são sucedidas por diversas gerações de fêmeas partenogênicas. A ovulação é extremamente precoce e o desenvolvimento embrionário das ninfas começa antes do nascimento da mãe, no interior do corpo da avó. O alimento ingerido por um indivíduo adulto sustenta, então, três gerações (BORROR & DELONG, 1970). Nas regiões tropicais e subtropicais ocorrem várias gerações anuais de reprodução partenogênica, dando origem a fêmeas vivíparas aladas e ápteras (BORROR & DELONG, 1970; GALLO et al. 1988).

A maioria das espécies passa por quatro estádios ninfais que apresentam os mesmos hábitos alimentares dos adultos, são ápteras e de menores dimensões (ILHARCO, 1992). O ciclo de vida (nínfa-adulto) é de 7 a 10 dias em climas tropicais. O polimorfismo contribui para o desenvolvimento dos afídeos, devido à presença de formas ápteras, concentradas na reprodução em condições ambientais favoráveis e aladas, para a dispersão em condições adversas (MINKS & HARREWIJN, 1987).

As formas aladas do pulgão diferenciam-se das ápteras, na colônia, a partir do 3º instar, pela presença de tecas alares, quando há o aumento da população e a quantidade de alimento diminui, assim os alados vão procurar novos hospedeiros para colonizar (OIRSA, 2003). A dispersão de ninfas de um hospedeiro a outro ocorre a uma distância de até 12 metros (TSAI et al., 1996).

As condições climáticas no Brasil são favoráveis ao desenvolvimento de formas partenogênicas o ano todo e a produção de fêmeas ovíparas é raramente observada.

### 1.2.1. Pulgões de citros

A cultura dos citros é assolada por diversos artrópodes relativamente inócuos, mas, sobre circunstâncias incomuns podem vir a se tornar pragas (PEDIGO & BUTIN, 1994). Entre os insetos considerados pragas secundárias dessa cultura estão os afídeos (Hemiptera: Aphidoidea), insetos especializados na sucção da seiva do floema, que atacam principalmente brotações e folhas novas das plantas (GALLO et al, 2002; PARRA & PANIZZI, 2009).

As formas aladas voam continuamente entre 6 a 12 horas, ou até completa exaustão no máximo de 1 dia. Após o pouso, o inseto efetua a picada de prova, e nesse ato, pode transmitir o vírus para a planta. Se o hospedeiro for favorável fica, caso contrário executa pequenos vôos próximos, à procura de outra planta, ou acaba morrendo. Esse vôo depende da ação do vento local (SILVEIRA NETO et al. 1976).

BLACKMAN & EASTOP (1984) relataram 16 espécies de afídeos se alimentando regularmente de citros. HALBERT & BROWN (1996) observaram 21 espécies de afídeos colonizando brotos vegetativos e florais em diversas espécies de cítricos. SOUSA-SILVA & ILHARCO (1995) observaram que no Brasil, as plantas cítricas são colonizadas por 4 espécies de afídeos: *Aphis spiraecola* (Patch, 1914), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Foscolombe, 1841), *Aphis gossypii* (Glover, 1887), e *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907), o principal vetor do vírus-da tristeza-dos-citros.

As formas aladas e ápteras das espécies de *Toxoptera* podem ser diferenciadas das espécies de *Aphis* principalmente pela coloração. *T. aurantii* tem o corpo marrom-escuro, *T. citricidus* tem o corpo marrom-avermelhado ou preto brilhante. *A. spiraecola* tem o corpo de coloração verde a verde-amarelado e *A. gossypii* também tem o corpo de coloração verde a verde-amarelado ou acastanhado (ILHARCO & SOUSA-SILVA 2009).

Em ápteros de *T. citricidus* o III e o IV segmentos antenais são pálidos, o V e VI são pretos. Em *T. aurantii* o ápice do segmento antenal III, IV e V, a parte apical da base do VI segmento, e algumas vezes o ápice do processo terminal são pretos. Nas formas aladas de *T. citricidus* as nervuras medianas das asas anteriores apresenta-se duas vezes ramificadas, pterostigma pálido, terceiro segmento antenal é preto contrastando com a metade basal dos segmentos IV e V que são pálidos. Em *T. aurantii* as asas anteriores apresentam a veia mediana ramificada apenas uma vez, pterostigma preto e o terceiro segmento antenal é pálido com o ápice preto (ILHARCO & SOUSA-SILVA 2009).

### 1.2.2. *Toxoptera citricidus*

*Toxoptera citricidus* é conhecido vulgarmente como pulgão marrom do citros, pulgão tropical dos citros e pulgão negro dos citros, pulgão preto dos citros (ILHARCO E SOUSA-SILVA, 2009) (Figura 1).



Figura 1. Fêmea adulta áptera de *Toxoptera citricidus*. Fonte: Gambarra, 2012.

O pulgão preto dos citros é o mais importante vetor do vírus que é agente causador da doença Tristeza dos Citros, (Citrus tristeza virus, CTV). A rápida dispersão da doença nos anos 30 e 40 causaram a morte e erradicação de milhões de árvores de citros no Brasil e na Argentina (YAKOMI et al., 1994; MICHAUD, 1999).

Os ápteros tem o comprimento do corpo variando de 1,7 a 2,8 mm e os alados variando de 1,8 a 2,6 mm. O ciclo de vida de *T. citricidus* possui quatro instares ninfais (Figura 2) e é mais complexo do que da maioria de outros afídeos. Em quase todas as áreas do mundo, este inseto é permanentemente anholocíclico (sem geração sexual) (OIRSA, 2003).



Figura 2. *Toxoptera citricidus*: a) ninfa de primeiro estágio; b) ninfa de segundo estágio; c) ninfa de terceiro estágio; d) ninfa de quarto estágio. Fonte: Gambarra, 2012.

O pulgão preto dos citros é originário do Sudeste da Ásia e foi primeiramente descrito por Kirkaldy (1907), que o incluiu no gênero *Myzus*. Ocorre predominantemente nas regiões de trópico úmido, e é comumente encontrado em toda a Ásia, incluindo China, Índia, Japão, Taiwan, Vietnã, Sumatra, Nepal, Sri Lanka, Malásia, Filipinas e Tailândia, além de Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Zelândia, países da África, Itália, Espanha e Turquia (TSAI et al., 1996; MICHAUD, 1998).

Sua introdução no Brasil ocorreu acidentalmente na década de 20, quando a citricultura estava em expansão no país e houve importação de material de propagação proveniente da Austrália e África do Sul (ROCHA-PEÑA et al. 1995). Desde então, a praga espalhou-se por todo o continente americano. Todas as espécies do gênero *Citrus* e a maioria das Rutáceas são hospedeiras do *T. citricidus*. Existem algumas citações de plantas não rutáceas onde o pulgão foi identificado (em algodoeiro, macieira, cerejeira, pessegueiro, aceroleira e maracujazeiro), mas são geralmente eventos isolados de colonização de plantas próximas às plantas de citros (STOETZEL, 1994).

O pulgão preto alimenta-se preferencialmente em brotações novas e macias do citros. Muitos autores têm observado o surgimento de suas populações aproximadamente duas semanas após chuvas pesadas que induzam o brotamento das plantas (SCHWARZ, 1965; KLAS, 1979).

Durante todo ano, os indivíduos são fêmeas partogênicas vivíparas. Esse tipo de partogênese com formação exclusiva de fêmeas recebe o nome de telitoquia. O tempo de desenvolvimento das ninfas depende da temperatura. A 20° C o período ninfal é de 6-8 dias, com trinta gerações por ano e o tempo reprodutivo é de 8,1 dias, com longevidade de 28,4 dias (OIRSA, 2003).

Tipicamente, há dois picos populacionais do pulgão preto por ano em regiões subtropicais, um na primavera e outro no outono. Isso foi observado na Argentina (NICKEL & KLINGAUF, 1985), na Austrália (KHAN, 1976; CARVER, 1978), no Brasil (CHAGAS et al. 1982), no Kenya (SEIF & ISLAM, 1988), em Formosa (TAO & TAN, 1961), e no Japão (NAKAO, 1968; SHINDO, 1972). KOMAZAKI (1981) relatou três picos anuais dos alados no Japão.

As infestações de pulgão preto tendem a ser endêmicas nos pomares de citros, sobrevivendo em densidade baixa até que um ciclo novo forneça o alimento suficiente para o desenvolvimento dos alados. Condições de tempo tais como correntes de ar ascendentes térmicas ou ventos fortes em tempestades tropicais podem auxiliar na dispersão do inseto (LEE et al. 1995).

### **1.3. Controle químico**

A modernização da agricultura, após a Segunda Guerra mundial, acelerou o processo de produção de alimentos, e a utilização de máquinas e equipamentos agrícolas, além de fertilizantes e pesticidas químicos, tornando o sistema agrícola dependente desses recursos (ROEL, 2001).

Em propriedades agrícolas utiliza-se para o controle de pragas aplicações sucessivas de inseticidas sintéticos (THOMAZINI et al., 2000), mas apesar de sua eficiência estes produtos podem causar uma série de problemas tanto para a espécie humana como para outros animais, como os desequilíbrios biológicos devido à eliminação de inimigos naturais e surgimento de populações de insetos resistentes a estes produtos (VENDRAMIM, 1997).



Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, isso equivale a 16 litros de agrotóxicos por hectare agricultável no país (MPA, 2014). De acordo com Castro Neto et al. (2010) estudos comprovam que os agrotóxicos podem contaminar os alimentos, o meio ambiente e causam danos à saúde humana, sendo que essa contaminação química associada aos processos produtivos se caracteriza como um dos mais complexos problemas de saúde pública e ambiental no país (PERES, 2009).

No Brasil, os ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde e do Meio Ambiente responsáveis pela regulação de agrotóxicos possuem menos de cinquenta profissionais, número muito inferior aos 850 profissionais responsáveis pelo gerenciamento desses produtos na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, segundo maior consumidor mundial (PELAEZ, 2012).

Nesse cenário as ações da Vigilância Sanitária, especialmente a avaliação toxicológica, a revisão do registro, a fiscalização e o controle, são prejudicadas pela carência de recursos humanos e financeiros. No entanto, a vigilância das populações, incluindo a de trabalhadores, e dos ambientes expostos também necessita de investimentos para o adequado enfrentamento dos impactos sobre a saúde decorrentes do uso desses produtos que podem estar associados a efeitos nocivos em diversos tecidos, órgãos e funções que são fundamentais à perpetuação das espécies, ao combate de doenças, às relações sociais, à garantia do bem-estar e à manutenção da vida. Os efeitos provocados por esses agroquímicos de intenso uso no Brasil não são específicos para as espécies ditas “alvo” e podem atingir todos os cinco reinos dos seres vivos (Monera, Protista, Fungi, Plantae e Animalia) (FRIEDRICH, 2013).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos para consumo interno no Brasil ainda está muito aquém do necessário para determinar o perfil de exposição aos agrotóxicos através da dieta. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa, coordena o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, PARA, que anualmente analisa cerca de 18 gêneros de alimentos *in natura* coletados em todos os estados brasileiros. Em geral, os resultados apresentados apontam problemas de extrema gravidade, como contrabando de agrotóxicos, uso intenso e/ou não permitido para diversas culturas (ANVISA, 2010).

No entanto, o programa apresenta desafios e limitações, como a rastreabilidade das amostras coletadas, que dificultam ações mitigadoras, e a disponibilidade de laboratórios públicos credenciados, com capacidade para a inclusão de culturas e ingredientes ativos (FRIEDRICH, 2013).



De uma maneira geral, o uso de inseticidas tem sido o método mais eficiente no combate ao *T. citricidus*, existindo no mercado uma vasta gama de produtos registrados à escolha. Entretanto, em alguns casos são ineficazes e perigosos se usados de forma intensiva e incorreta (MACHADO et al., 2007), podendo causar ressurgência de pragas, resistência e efeitos nos agentes de controle biológico (ALVES et al., 2001).

#### **1.4. Bioinseticidas**

O uso de plantas com propriedades inseticidas é uma prática muito antiga (ROEL et al., 2000; GALLO et al., 2002). Até a descoberta dos inseticidas organossintéticos, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos.

As variações na eficiência do controle, devido às diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas e, principalmente, os baixos efeitos residuais, que apontavam à necessidade de várias aplicações em períodos curtos, fez com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos (MACHADO et al., 2007).

É inegável a preocupação crescente com o meio ambiente, dessa forma, observa-se o crescimento da agricultura orgânica visando evitar os efeitos prejudiciais dos produtos químicos ao agroecossistema e, assim, substituí-los por métodos alternativos de controle de pragas e doenças, preservação das propriedades do solo, manejo de plantas daninhas, cobertura morta, adubação verde e rotações de culturas, entre outras práticas (LUZ et al., 2007).

Por isso, atualmente, os extratos de plantas com atividade inseticida surgem como objeto de pesquisa, e vêm sendo estudados como alternativa no manejo integrado de pragas. Nesse contexto, a família Meliaceae tem se destacado, tanto pelo número de espécies vegetais inseticidas, como pela eficiência de seus extratos (ROEL et al., 2000). Além dessa família, outras espécies botânicas (Annonaceae, Asteraceae, Cannellaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Labiateae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae, Rutaceae e Verbenaceae) também demonstram serem promissoras no controle de pragas (JACOBSON, 1989). Todavia são escassos os estudos sobre o potencial inseticida para

a grande maioria das espécies, o que implica na necessidade do desenvolvimento de pesquisas para a descoberta de novas alternativas.

De acordo com GALLO et al. (2002) o objetivo principal do uso de extratos vegetais é reduzir o crescimento da população de pragas. Segundo os autores, a mortalidade do inseto é apenas um dos efeitos e que, geralmente, necessita de concentrações muito elevadas.

Os inseticidas derivados de plantas podem interferir no desenvolvimento, alimentação e reprodução dos insetos ou serem utilizados na estratégia de atrair e matar, quando substâncias atrativas são usadas juntamente com inseticidas (COPPING & MENN, 2000; VENDRAMIM, 1997).

Diversas substâncias oriundas dos produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário dessas plantas, que podem ser encontradas nas raízes, folhas e sementes, entre eles, rotenóides, piretróides alcalóides e terpenóides, podem interferir severamente no metabolismo de outros organismos, causando impactos variáveis, como repelência, deterrência alimentar e de oviposição, esterilização, bloqueio do metabolismo e interferência no desenvolvimento (VENDRAMIM, 1997; COPPING & MENN, 2000).

Várias são as estratégias capazes de determinar a atividade de produtos de origem natural contra insetos. De uma maneira geral, a pesquisa inicia-se com extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes, tais como hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Em seguida, os extratos ativos são fracionados através de métodos cromatográficos e as frações obtidas são testadas novamente, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) composto(s) ativo(s) (SHAALAN et al., 2005).

Os extratos obtidos com solventes orgânicos contêm complexa mistura de compostos ativos. Se a concentração letal encontrada for baixa, o extrato pode ser fracionado para extrair o componente químico responsável pelo efeito. Frações isoladas do mesmo extrato podem ter diferentes atividades inseticidas, pois contêm diferentes fitoquímicos. No entanto, alguns compostos, quando testados de forma isolada, apresentam baixa eficácia, sugerindo efeito sinérgico entre as substâncias presentes no extrato, indicando que a associação destas substâncias é a responsável pela mortalidade obtida nos testes realizados (SHAALAN et al., 2005).

Para o uso de inseticidas vegetais, diversos aspectos devem ser levados em consideração, como a extração, conservação dos extratos, dosagem eficiente,

estabilidade, toxicidade e custo. Todos estes aspectos são avaliados quando se identifica as principais substâncias contidas no inseticida (NOGUEIRA & PALMÉRIO, 2001).

#### 1.4.1 Uso de extratos vegetais no controle de afídeos

Entre o complexo de pragas que podem ser afetadas por compostos químicos presentes em plantas, estão os afídeos, com os quais diversas pesquisas já foram desenvolvidas (Tabela 1).

Tabela 1. Referencial científico de inseticidas botânicos e sua potencial atividade sobre os afídeos.

<b>Afídeo</b>	<b>Espécie vegetal</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Ajuga chamaepitys</i>	Mortalidade	Fekete et al., 2004.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Mortalidade	Hummel e Kleeber, 1997.
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Aucacorthum solani</i>	<i>Tagetes minuta</i>	Mortalidade	Tomova et al., 2005.
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aphys gossypii</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Nasonovia ribis-nigri</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Metopolophium dirhodum</i> , <i>Fimbriaphis fimbriata</i> , <i>Rhopalosiphum padi</i> e <i>Chaetosiphon fragaefolii</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Efeito regulador de crescimento	Lowery e Isman, 1994.
<i>Aphis craccivora</i>	29 plantas silvestres	Mortalidade	Abdallah et al., 2004.

<b>Afídeo</b>	<b>Espécie vegetal</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Aphis craccivora</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Mortalidade	Gonçalves e Bleicher, 2006.
<i>Aphis craccivora</i>	<i>Annona muricata</i>	Mortalidade	Rabelo e Bleicher, 2014.
<i>Aphis gossypii</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Prolongamento do desenvolvimento, diminuição da reprodução e mortalidade.	Santos et al, 2004.
<i>Aphis gossypii</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Mortalidade	Breda et al., 2010
<i>Aphis gossypii</i>	<i>Glycine max e Gossypium L.</i>	Mortalidade	Butler et al., 1988.
<i>Aphis spiraecola</i>	<i>Palicourea marcgravii e Manihot esculenta</i>	Mortalidade	Gonzaga et al., 2007
<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Mortalidade e redução da fecundidade	Carvalho et al., 2008.
<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Redução na fertilidade e fecundidade	Koul, 1998.
<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Elionurus candidus</i>	Repelência	Ricci et al., 2000.
<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Nicotiana tabacum e Solanum fastigiatum</i>	Mortalidade	Lovatto et al., 2004.
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	<i>Ageratum conyzoides</i>	Mortalidade	Soares et al., 2011
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	<i>Illicium verum e Piper hispidinervum</i>	Mortalidade	Soares et al., 2012.

<b>Afideo</b>	<b>Espécie vegetal</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Myzus persicae</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Inibidores alimentares	Nisbet et al., 1993.
<i>Myzus persicae</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Toxicidade letal e subletal do nim	Venzon et al., 2007.
<i>Myzus persicae</i>	<i>Clibadium sylvestre</i> e <i>Derris amazonica</i>	Mortalidade e efeito deterrente	Filgueiras et al., 2011.
<i>Myzus persicae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i>	Óleos (cartamus, milho, amendoim, soja e girassol)	Mortalidade	Butler e Henneberry, 1990.
<i>Myzus persicae</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Coriandrum sativum</i> e <i>Nicotiana tabacum</i>	Ação tóxica semelhante ao inseticida organofosforado acefato	Rando et al., 2011.
<i>Rhopalosiphum padi</i> e <i>Sitobion avenae</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Inibidores alimentares	West e Mordue (Luntz), 1992.
<i>Schizaphis graminum</i>	<i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Illicium verum</i> , <i>Piper hispidinervum</i> e <i>Ocotea odorífera</i>	Mortalidade	Lima et al., 2014.
<i>Toxoptera citricidus</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Inibidores alimentares	Gonzaga et al., 2007.
<i>Toxoptera citricidus</i>	<i>Palicourea marcgravii</i> e <i>Manihot esculenta</i>	Mortalidade	Gonzada et al., 2008.
<i>Toxoptera citricidus</i>	<i>Lonchocarpus floribundus</i>	Mortalidade	Correa, 2006.

## 1.5. Tabela de vida

As tabelas de vida são utilizadas para estudar a dinâmica populacional de um organismo (SILVEIRA NETO et al., 1976; SOUTHWOOD, 1978), pois fornecem uma visão integrada das características biológicas de uma população, sob condições ambientais determinadas (COPPEL & MERTINS, 1977).

Estudos sobre tabela de vida envolvendo afídeos têm sido desenvolvidos por vários autores (RICCI et al., 2000; VASICEK et al., 2001; GODOY & CIVIDANES, 2002; CIVIDANES & SOUZA, 2003; MORAES & BLEICHER, 2007; MICHELOTTO & BUSOLI, 2003; TORRES et al., 2001).

De acordo com Silveira Neto et al. (1976) as tabelas de vida podem ser de idade específica e de tempo específico. As tabelas de idade específica são subdivididas em ecológica e simples ou biológica, as quais são subdivididas em tabelas de esperança de vida e tabelas de vida de fertilidade. As tabelas de esperança de vida fornecem dados essenciais sobre uma população, em relação às taxas de sobrevivência, mortalidade e esperança de vida de uma espécie (SILVEIRA NETO et al. 1976).

Na tabela de vida de fertilidade, o principal dado que se obtém é a taxa intrínseca de aumento ( $r_m$ ) (PEDIGO & ZEISS, 1996) e quanto maior o valor de ( $r_m$ ) mais bem sucedida será a espécie, em um determinado ambiente (PRICE, 1984). Outros quatro parâmetros da tabela de vida de fertilidade são, a taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), que indica o número de vezes que uma espécie consegue aumentar de uma geração para outra, a razão finita de aumento populacional ( $\lambda$ ), que é um fator de multiplicação da população a cada dia, tempo de geração (T) e TD, que representa o tempo que leva uma população para duplicar em número (RABINOVICH, 1978).

Conforme Bellows Junior et al. (1992) as informações das tabelas de vida podem servir também, no controle biológico aplicado como elemento de avaliação do impacto de inimigos naturais. Dentre os parâmetros biológicos a serem considerados na seleção de um inimigo natural, destaca-se a taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ) já que um agente de controle biológico só será realmente considerado efetivo quando sua taxa intrínseca de crescimento populacional for semelhante ou maior que a da praga alvo (LENTEREN, 2000).

## 1.6. Balanço energético de Afídeos

A construção de balanços energéticos teve início nos estudos de Lindeman (1942). Suas idéias foram aperfeiçoadas por Odum (1957) e Teal (1962), entre outros autores, que construíram balanços energéticos globais para os ecossistemas. Anos depois, Wiegert (1964) e McNeill (1971) construíram balanços energéticos para as populações de insetos, e a partir daí muitas espécies de animais têm sido investigadas (LLEWELLYN, 1987).

Vários trabalhos apresentam balanços energéticos de afídeos em laboratório. Llewellyn (1987) calculou o balanço energético para nove espécies de afídeos, incluindo espécies monófagas de Drepanosiphinae: *Eucallipterus tiliae* (L.) e *Tuberolachnus salignus* (Gmelin, 1790) e espécies polífagas de Aphidinae. Van Der Goot (1980) para as populações de *Macrosiphum liriodendri*, Llewellyn e Qureshi (1979) para *Megoura viciae* e Randolph et al. (1975) para o pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*.

Para cálculo do balanço energético dos afídeos, Llewellyn (1987) sugere o uso da fórmula proposta por Petruszewicz e Macfadyen (1970):  $C = P + R + U + F$ , em que C é a energia ingerida; P é a soma da energia contida no crescimento ninfal ( $P_g$ ), na reprodução ( $P_r$ ) e nos produtos exuviais ( $P_e$ ); R é a energia perdida como calor durante a respiração celular; U é a energia contida nas excretas nitrogenadas resultantes do catabolismo; F é a energia do alimento que passa pelo afídeo sem atravessar a parede do canal alimentar (fezes).

O consumo é representado pela ingestão de alimentos pelos pulgões. O método de Kennedy & Mittler (1953) é um dos mais refinados e consiste em cortar os estiletes do inseto enquanto este se alimenta, e determinar a taxa de seiva exudada do ápice do estilete que permanece no tecido da planta, sendo que a seiva exudada pela pressão de turgor representa a taxa normal de alimentação do afídeo. Outros métodos para avaliar a ingestão dos sugadores de seiva são o uso de elementos radioativos na dieta e na determinação da ingestão de seiva por experimentos de pesagem (PANIZZI & PARRA, 2009).

A produção em pulgões tem três aspectos: o crescimento, a troca do exoesqueleto em ecdises e a reprodução de adultos. Algumas espécies podem produzir outros materiais como, por exemplo, a cera, e todos os pulgões liberam saliva durante a alimentação (MILES, 1968), mas nem a produção de saliva ou secreções de cera são

contabilizadas no balanço energético, pois as quantidades de energia envolvidas são desprezíveis (LLEWELLYN, 1987).

Na respiração o consumo de oxigênio é multiplicado pelo "coeficiente de oxicalorífico",  $Q_{ox}$ , mas isto varia de acordo com o substrato respiratório. Para carboidratos, cada mg de oxigênio consumido é multiplicado por 14,76 Joules, para gorduras o valor é multiplicado por 13,72 Joules e se for proteína o valor depende do produto de excreção. Se for excretada amônia (a possibilidade mais provável para os pulgões) o  $Q_{ox}$  é de 13,36 Joules, mas se o produto final for ureia ou ácido úrico o valor será de 13,60 Joules por mg (LLEWELLYN, 1987).

O coeficiente respiratório assume que toda a energia liberada no processo respiratório é perdida na forma de calor, mas em animais em crescimento isto não ocorre. Uma quantidade de energia na forma de ATP é retida nas macromoléculas sintetizadas. Portanto, o coeficiente respiratório (RQ), ou a proporção de dióxido de carbono produzido para o oxigênio consumido é estimado a partir da natureza do substrato. A maioria dos animais não respira um único substrato e um  $Q_{ox}$  composto é calculado. A dieta de pulgões é formada predominantemente por carboidratos com pouca proteína, o que implica que a sacarose será o maior substrato respiratório (LLEWELLYN, 1987).

A energia perdida na forma de calor como consequência da respiração pode ser obtida em três etapas: medindo-se o consumo de oxigênio em relação ao peso do pulgão, estimando-se o R.Q. e multiplicando-se o consumo de oxigênio durante um período de tempo conhecido pela  $Q_{ox}$  para se obter a energia perdida na forma de calor (LLEWELLYN, 1987).

Em nenhum balanço energético de pulgões conseguiu-se separar fezes de urina. A excreção de nitrogênio tem duas fontes principais: ácido nucléico e o catabolismo protéico. A determinação da energia do F.U. é realizada em três etapas: medida do peso seco de melada produzida por unidade de tempo, estimativa da energia por calorimetria e multiplicação do primeiro valor pelo segundo valor (LLEWELLYN, 1987). O honeydew deve ser recolhido no período de tempo conhecido, podendo variar de 1 dia no caso do afídeo *Tuberolachnus salignus*, a 5 ou 6 dias para alguns pulgões dos cereais (LLEWELLYN, 1987).

Llewellyn considera ainda três taxas de eficiência energética que descrevem os padrões de utilização de energia (Figura 3): (a) a eficiência geral da transferência de energia por meio do inseto chamada de "eficiência de crescimento", que é dada pela



taxa  $P/C$ ; (b) o valor  $A/C$ , conhecido como “eficiência de assimilação”; e (c) o  $P/A$  é uma medida do “custo de vida”, pois a energia e os materiais liberados do alimento na digestão são utilizados no crescimento, manutenção dos tecidos e energia para síntese, transporte ativo e movimento.

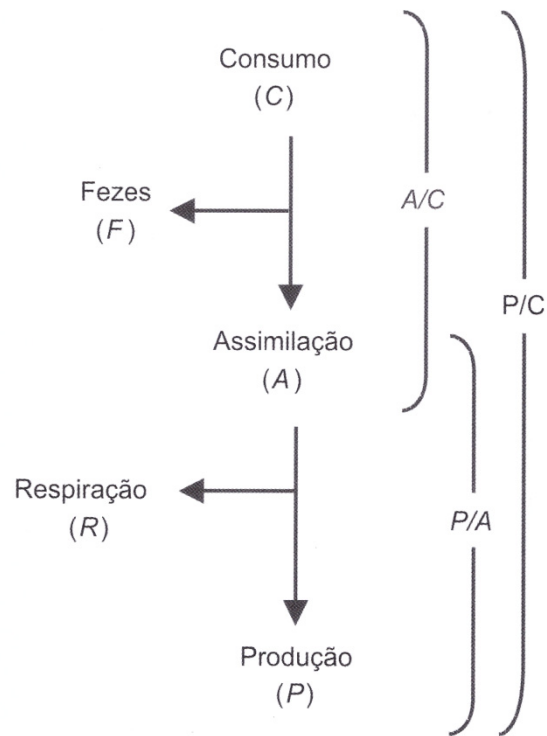


Figura 3. Esquema do padrão de utilização de energia dos afídeos. Fonte: Llewellyn, 1987.

## 2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância da ocorrência de *Toxoptera citricidus* nas culturas de citros no Brasil faz-se necessário um estudo mais detalhado sobre a biologia e sobre o metabolismo energético por meio da compreensão dos processos e fases da vida em que estes insetos sofrem maiores alterações fisiológicas, gerando assim, informações que podem ser úteis no controle desta praga.

Medidas de controle que causem menor impacto ambiental são de primordial importância, o que vem estimulando o ressurgimento do uso de plantas inseticidas como ferramenta promissora para controle desses afídeos.

Visando contribuir para os métodos de controle de *T. citricidus*, auxiliando na minimização dos impactos dos inseticidas sintéticos no ambiente e na saúde humana, este trabalho teve por objetivo estudar o ciclo de vida e calcular o balanço energético desse afídeo e investigar a ação inseticida de extratos vegetais para o seu controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, S.A.; BARAKAT, A.A.; BADAWY, H.M.A.; SOLIMAN, M.M.M. Insecticidal Activity Of Different Wild Plant Extracts Against The Cowpea Aphid, *Aphis craccivora* Koch. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 14, 1, pp 165-173, 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice Monográfico. **Glifosato** [Internet]. Brasília; 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect>. Acesso em nov. 2014.

AGRIANUAL: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 434 p., 2002.

ALTIERI, M. **Agroecologia: a Dinâmica Produtiva da Agricultura Sustentável**. 3ª ed. Editorial UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 120 p., 2001.

ALVES, H. DE M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 3, 2001.

BELLOWS JUNIOR, T.S.; VAN DRIESCHE, R.G.; ELKINTON, J.S. Life-table construction and analysis in the evaluation of natural enemies. **Annual Review of Entomology**, 37: 587-614, 1992.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA CNPDA, 388p., 1991.

BIERMANN, A. C. S. **Bioatividade de Inseticidas Botânicos sobre *Ascia monuste orseis* (Lepidoptera:Pieridae)**. Tese. Universidade Federal de Santa Maria. Brasil. 150 p., 2009.

BLACKMAN, R.L.; EASTOP, V. F. Aphids on the World's Trees: **An Identification and Information Guide**. Wallingford, CAB INTERNACIONAL, 986, 1984.

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blücher, 1970.

BREDA, M.O.; OLIVEIRA, J.V. de; ANDRADE, L.H. de. Eficácia de inseticidas botânicos no controle do pulgão do algodoeiro, *Aphis gossypii* Glover (Hem.: Aphididae), em condições de laboratório. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v.36, p.165-170, 2010.

BUTLER, G.D. Jr.; COUDRIET, D.L.; HENNEBERRY, T.J. Toxicity and repellency of soybean and cottonseed oils to the sweetpotato whitefly and the aphid on cotton in greenhouse studies. **Southwestern Entomologist**, v. 13, n. 2, p.81-86, 1988.

BUTLER, G.D. Jr.; HENNEBERRY, T.J. Pest control on vegetables and cotton with household cooking oils and liquid detergents. **Southwestern Entomologist**, v.15, n.2, p.123-131, 1990.

CARVALHO, G.A.; SANTOS, N.M.; PEDROSO E.C.; TORRES, A.F. Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (LINNAEUS, 1758) e *Myzus persicae* (SULZER, 1776) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) em couve-manteiga *Brassica oleracea* LINNAEUS VAR. *ACEPHALA*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n.2, p. 181-186, 2008.

CARVER, M. The black citrus aphids, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) and *T. aurantii* (Boyer de Fonscolombe) (Homoptera: Aphididae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 17, n. 4, p. 263-270, 1978.

CASTRO NETO, N.; DENUZI, V.S.S.; RINALDI, R.N. E STADUTO, J.A.R. Produção orgânica: uma potencialidade estratégia para a agricultura familiar. **Revista Percurso**, v. 2, n. 2, p. 73-95, 2010.

CHAGAS, E. F. D.; SILVEIRA NETO, S.; BRAZ, A. J. B. P.; MATEUS, C. P. B.; COELHO, I. P. 1982. Population fluctuations of pest and predator insects in citrus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 6, p. 817-824, 1982.

CITROLIMA- **Mudas cítricas**. Disponível em: <<http://www.citrolima.com.br/portaenxertos/limaocravo.htm>>. Acesso em julho de 2011.

CIVIDANES, F.J.; SOUZA, V.P. Exigências Térmicas e Tabelas de Vida de Fertilidade de 238 *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) em Laboratório. **Neotropical Entomology**, 239 32(3): 413-419, 2003.

COPPEL, H. C. & MERTINS, J. W.: **Biological Insect Pest Suppression**. New York: Springer-Verlag, 314p., 1977.

COPPING, L.G.; MENN, J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, London, v. 56, p. 651-676, 2000.

CORRÊA, R.S. **Toxicidade de extrato de *Lonchocarpus floribundus* Benth (Timbó) sobre *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Pulgão preto dos citros) Sternorrhyncha Aphididae**. 70p. Dissertação (Mestrado) - INPA/UFMA, Manaus, 2006.

COSTA, A.S., GRANT, T.J. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. **Phitopathology**, v.16, p.105-133,1951.

ECOBICHON D. J. **Toxic effects of pesticides**. In: Klassen, C.D. Casarett; Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, p. 763-810, 2001.

EMBRAPA, **Sistema de Produção**. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/importancia.htm>. Acesso em: Fevereiro de 2015.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc205.pdf>. Acesso em Julho de 2010.

FEKETE G.; POLG'AR L. A.; B'ATHORI M.; COLL J.; DARVAS B. Per os efficacy of *Ajuga* extracts against sucking insects. **Pest Management Science**, 60: 1099–1104, 2004.

FILGUEIRAS, C.C.; FARIAS, P.R.S.; CARDOSO, M.G.; VENDRAMIM, J.D. RAMOS, E.M.L.S.; CANTÃO, F.R. DE O. Bioactivity of aqueous extracts of *Clibadium sylvestre* (Aubl.) Baill. and *Derris amazonica* Killip on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae). **Ciência e agrotecnologia**, 35: 1059-1066, 2011.

FRIEDRICH, K. Desafios para a avaliação toxicológica de agrotóxicos no Brasil: desregulação endócrina e imunotoxicidade. **Vigilância Sanitária em Debate**, 2013; 1(2): 2-15. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Resources. Pesticides (trade) [Internet]. 2012. [acesso em 2014]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/423>.

GALLO, D.; O. NAKANO; S. SILVEIRA NETO; R. P. L. CARVALHO; G. C. BATISTA; E. BERTI FILHO; J. R. P. PARRA; R. A. ZUCCHI; S. B. ALVES & J. D. VENDRAMIM. **Manual de Entomologia Agrícola**, Editora Agronômica Ceres, 3ª ed., 649p, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; 248 BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; 249 MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 250 920p. 2002.

GODOY, K. B.; CIVIDANES, F. J. Tabelas de fertilidade e esperança de vida para *Lipaphis erisimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) sob condições de laboratório e campo. **Neotropical Entomology**, 31: 41-48, 2002.

GONÇALVES, M. E. C.; BLEICHER, E. Atividade sistêmica de azadiractina e extratos aquosos de sementes de nim sobre o pulgão-preto em feijão-de-corda. **Revista Ciência Agronômica**, v. 27, p. 177-181, 2006.

GONZAGA, A. D.; RIBEIRO, J. D'ARC.; VIEIRA, M. F.; ALÉCIO, M. R. Toxidez de três concentrações de Erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* A. St.-Hill) e Manipueira (*Manihot esculenta* Cantz) em pulgão verde dos citros (*Aphis spiraecola* Patch) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Biociência**, v.5, n.1, p. 12-14, 2007.

GONZAGA, A. D.; GARCIA; M. V. B.; SOUSA; S. G. A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R. S.; RIBEIRO, J. D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazônica**, v. 38, n. 1, p. 101-106, 2008.

HALBRT, S.E.; BROWN, L. G. *Toxoptera citricidus* (Kirkald), brown citrus aphid. Identification, biology, and management strategies.. FL. Dep. Agric. And Cons. Serv. Div. Plant Industry. **Entomology**, cir. n. 374, 1996.

HUMMEL, E.; KLEEBERG, H. Efficacy of neem-extract formulation Neemazal T/S on the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* in the laboratory. In: WORKSHOP ON PRACTICE ORIENTED RESULTS ON USE OF NEEM-INGREDIENTS AND PHEROMONES, 5. Wetzlar, Germany. **Proceedings**. Wetzlar: Kleebergh, H and Zebitz, C.P.W (ed.), 1997. p.33-39, 1997.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Estatística da Produção Agrícola**. 56p., 2011.

ILHARCO, F. A. **Equilíbrio ecológico de afídeos**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 303 p., 1992.

ILHARCO, F. A.; SOUSA-SILVA, C. R. *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphidoidea), the tropical citrus aphid in continental Portugal. **Revista de Agricultura**, v. 84, p. 71-80, 2009.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. American Chemical Society, p.1-10, 1989.

KENNEDY, J.S.; MITTLER, T.E. A method of obtaining phloem sap via the mouthparts of aphids. **Nature**, v. 171, p. 528, 1953.

KHAN, M. H. **The citrus aphid, *Toxoptera citricidus* (Kirk.)**. In: BIENNIAL Reporter Waite Agriculture Research Institute, 1976-77. Adelaide: University of Adelaide, p. 100, 1976.

KIRKALDY, G. W. On some peregrine Aphidae in Oahu, Honolulu. **Proc. Hawaiian Entomological Society**. v.1, p.100, 1907.

KLAS, F. E. Population densities and spatial patterns of the aphid tristeza vector, *Toxoptera citricida* Kirk. In: I.O.C.V. CONFERENCE, 8. **Proceedings**. p. 83-87, 1979.

KOMAZAKI, S. Life cycles and population fluctuations of aphids on citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 4., Tokyo. **Proceedings**. v. 2, p. 692-695, 1981.

KOUL, O. Effect of neem extracts and azadirachtin on fertility and fecundity of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.). **Pesticide Research Journal**, Perdikis, v.10, n.2, p.258-261, 1998.

LEE, R. F.; ROCHA-PEÑA, M.; NIBLETT, C. L.; OCHOA, F.; GARNSEY, S. M.; YOKOMI, R. K.; LASTRA, R. (Ed.). In: International Workshop on Citrus Tristeza Virus and Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: management strategies, 8., 1995.

LENTEREN, J.C. **Crêterios de sele o de inimigos naturais a serem usados em programas de controle biológico** p.1-19. In Bueno V.H.P. (ed), Controle biológico de pragas: Produ o massal e controle de qualidade. Lavras, Ed. UFLA, 207p., 2000.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; CARVALHO, S. M.; MELO, B. A.; VIEIRA, S. S. Composi o química e toxicidade de óleos essenciais para o pulgão-verde *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.81, n.1, p. 22-29, 2014.

LINDEMAN, R.L. The trophic-dynamic aspect of ecology. **Ecology**, 23: 399-418, 1942.

LLEWELLYN, M.; QURESHI, A.L. The energetics of *Megoura viciae* reared on different parts of the broad bean plant (*Viciae faba*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 26: 127-135, 1979.

LLEWELLYN, M. Aphid energy budgets. In: MINKS, A. K.; HERREWIJN, P. (Ed.). Aphids: their biology, natural enemies and control. **Elsevier**, v. 2B, p. 109-117, 1987.

LOVATTO, P.B; GOETZE, M.; THOM , G.C. Efeito de extratos de plantas da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*). **Ciência Rural**, v. 34 n. 4, p. 971-978, 2004.

LOWERY, D.T.; ISMAN, M.B. Insect growth regulating effects of nem extract and azadirachtin on aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v.72, n.1, p. 77-84, 1994.

LUZ, J.M.Q.; SHINZATO, A.V.; SILVA, M.A.D. Compara o dos sistemas de produ o de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **Bioscience Journal**. v.23, p.7-15, 2007.



MACHADO, L. A.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, M. M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 103-106, 2007.

MCNEILL, S. The energetics of a population of *Leptopterna dolabrata* (Heteroptera: Miridae). **Journal of Animal Ecology**, 40: 127-140, 1971.

MEDINA, C. L.; CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R.A.; SESTARI, I. Citros. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 864p., 2008.

MICHAUD, J.P. A Review of the Literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: 297 Aphididae). **The Florida Entomologist**, Vol. 81, v. 1, p.37-61, 1998.

MICHAUD, J.P. Sources of mortality in colonies of brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. **BioControl**, v.44, p.347-367, 1999.

MICHELOTTO M.D.; A.C. BUSOLI. Aspectos biológicos de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) em três cultivares de algodoeiro e em três espécies de plantas daninhas. **Ciência Rural**, 33: 999-1004, 2003.

MILES, P.W. **Insect secretions in plants**. Annual Review of Phytopathology, v.6, p.137-164, 1968.

MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. **Aphids: their biology, natural enemies and control**. New York: Elsevier, 1987.

MORAES, J. G. L.; BLEICHER, E. Preferência do pulgão-preto, *Aphis craccivora* Koch, a diferentes genótipos de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Ciência Rural**, v.37, n.6, 2007.

MOVIMENTO DOS PEQUENOS AGRICULTORES – MPA. **Agrotóxicos: um problema invisibilizado**. Cartilha de estudos para a militância. 34p., 2014.

NAKAO, S. Ecological studies on the insect community of citrus groves IV. A list of insects collected in a citrus grove near Fukuoka City. **Kontyû**, v. 30, n. 1, p. 50-71, 1968.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015**. Relatório Ícone/Markestra/Pensa, São Paulo, 2006. Disponível em: <[http://www.fundace.org.br/arquivos\\_diversos/agenda\\_estrategica/Agenda\\_Citrus\\_2015\\_PENSAICONE.pdf](http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.pdf)>. Acesso em abr. 2015.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R.. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. In: NEVES, M. F. (Coord.). 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat. 138 p., 2010.

NICKEL, O.; KLINGAUF, D F. Biologie und massenwechsel der tropischen citrusblattlaus *Toxoptera citricidus* in beziehung zu Nützlingsaktivität und klima in Misiones Argentinien (Homoptera: Aphididae). **Entomologia Generalis**, v. 10, p. 231-240, 1985.

NISBET, A.J.; WOODFORD, J.A.T.; STRANG, R.H.C.; CONRDLY, J.D. Systemic antifeeding effects of azadiractin on the peach-potato aphid *Mizus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 68, n. 1, p. 87-98, 1993.

NOGUEIRA, M. A. S.; PALMÉRIO, M. **Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control**. In: 1 WORKSHOP “NEEM AND PHEROMONES” da Universidade de Uberaba, 2001, Uberaba, 46p. Disponível em: [http://www.trifolio.de/info\\_service/workshops/Brasil\\_Workshop\\_1\\_Abstract\\_s.pdf](http://www.trifolio.de/info_service/workshops/Brasil_Workshop_1_Abstract_s.pdf). Acesso em: maio de 2015.

ODUM, H.T. Trophic structure and productivity of Silver Springs, Florida. **Ecological Monographs**. n. 27. p. 55-112, 1957.

OIRSA- República de China. **Áfidos associados AL cultivo de cítricos em El Salvador**. 314 Proyecto regional de fortalecimiento de La vigilância fitossanitária em cultivos de 315 exportación no tradicional. Disponível em: [HTTP://www.oirsa.gov/publicaciones](http://www.oirsa.gov/publicaciones). 2003.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J.R. P. **A bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas**, p.1107-1140. In Panizzi AR, Parra JRP (eds) Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, Embrapa/CNPq, 1164p., 2009.

PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N.; PINTO, A. S. Moscas-brancas, pulgões e psilídeos, In: PINTO, A. S. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos dos citros**. Piracicaba: FEALQ, p. 79-80, 2003.

PEDIGO, L.P.; BUNTIN, G.D. **Handbook of sampling methods for arthropods in 321 agriculture**. Boca Raton: CRC Press. 714p., 1994.

PEDIGO, L. P.; M. R. ZEISS. Developing a degree-day model for predicting insect development, p. 67-74. In: L. P. PEDIGO. & M. R. ZEISS. (eds.). **Analyses in insect ecology and management**. Ames, Iowa State University Press, p.168. 1996.

PERES, F. Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. **Ciência & Saúde coletiva**, v. 14, n. 6, p. 1995-2004, 2009.

PELAEZ, V. **Mercado e regulação**. Brasília; 2012. [acesso nov. 2014]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm>.

PETRUSEWICZ, K.; MACFADYEN, A. **Productivity of Terrestrial Animals. Principles and Methods**. IBP Handbook no. 13, International Biological Programm, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 190p., 1970.

PRICE, P. W. **Insect ecology**. 2. Ed. New York, John Wiley, 607p., 1984.

POMPEU JUNIOR, J. **Porta-enxertos**. In: MATTOS JUNIOR, D. de; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, p.61-104. 2005.

RABELO, J. S.; BLEICHER, E. Controle de pulgão-preto em feijão-caupi com o uso de sementes de Annonaceae e a bioatividade das sementes em diferentes épocas de armazenamento. **Agropecuária Científica no Semiárido**. v. 10, n. 4, p. 05-08, 2014.

RABINOVICH, J. E. **Ecología de poblaciones animales**. Washington: OEA. p.144, 1978.

RANDO, J. S. S.; LIMA, C. B.; BATISTA, N. A.; FELDHAUS, D. C.; LOURENÇO, C. C.; POLONIO, V. D.; ÁVILA, R. R.; MALANOTTE, M. L. Extratos vegetais no controle dos afídeos *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer). **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, 2011.

RANDOLPH, P.A., RANDOLPH, J.C.; BARLOW, C.A. Age specific energetics of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Ecology** 56: 359-369, 1975.

RICCI, E. M., LA ROSSA, F. R.; VASICEK, A. Demografía del "pulgón verde del duraznero" *Myzus persicae* (Sulzer)(Homoptera: Aphidoidea) sobre pimiento (*Capsicum annum*) en condiciones de laboratorio. **Ceiba** 1(1): 17-20, 2000.

ROCHA-PEÑA, M.A.; LEE, R.F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA F.M.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. **Plant Disease**, v.79, n.5, p.437, 1995.

ROEL, A.R.; VENDRAMIM, J.D.; FRIGHETTO, R.T.S.; FRIGHETTO, N. Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, v.59, n.1, p.53-58, 2000.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Interações** 1: 43-50, 2001.

SANTOS, T.M.; COSTA, N.P., TORRES, A.L. Effect of neem extract on the cotton aphid. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.11, p.1071-1076, 2004.

SCHWARZ, R. E. Seasonal fluctuations in the behaviour of *Toxoptera citricida* Kirk. In relation to yellow attractants. **Z Krankh Path Schutz**, v. 72, n. 1, p. 84- 89, 1965.

SEIF, A. A.; ISLAM, A. S. Population densities and spatial distribution patterns of *Toxoptera citricida* (Kirk.) (Aphididae) in Citrus at Kenya coast. **Insect Science and its Application**, v. 9, n. 4, p. 535-538, 1988.

SHAALAN, E. A.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL-WAHABA, H.; MANSOUR, A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v.31, p.1149-66, 2005.

SHINDO, M. Relation between ants and aphids in a citrus orchard. **Proc. Assoc. Pl. Prot.**, v. 18, n.1, p. 69-71, 1972.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N. A. **Manual de ecologia de insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 419 p., 1976.

SOARES, C. S. A.; COSTA, M. B.; SOARES, A. H. V.; BEZERRA, C. E. S.; CARVALHO, L. M. Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) sobre o pulgão *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Hemiptera: Aphididae) em roseira. **Revista Verde**, v. 6, n. 5, p. 21-24, 2011.

SOARES, C. S. A.; SILVA, M.; COSTA, M. B.; BEZERRA, C. E. S.; CARVALHO, L. M.; SOARES, A. H. V. Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) em roseira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 7(1): 169-175, 2012.

SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A. Potencial de obtenção de novos porta enxertos em cruzamentos envolvendo limoeiro 'Cravo', laranjeira 'Azeda', tangerina 'Sunki' e híbridos de *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30/1: 223-228. 2008.

SOUSA-SILVA, C. R.; ILHARCO, F. A. **Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras**, Ed. UFSCar, 85p., 1995.

SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological methods**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons. 525 p., 1978.

STOETZEL, M. B. Aphids (Homoptera: Aphididae) of potential importance on citrus in the United States with illustrated keys to species. **Proceedings of the Entomological Society**, v. 96, n. 1, p. 74-90, 1994.

TAO, C. C.; TAN, M. F. Identification, seasonal population and chemical control of citrus aphids in Taiwan. **Agricultural Research**, v. 10, n. 1, p. 41-52, 1961.

TEAL, J. M. Energy flow in the salt marsh ecosystem of Georgia. **Ecology**, 43: 614-624. 1962.

THOMAZINI, A. P. B. W.; VENDRAMIM, J. D.; LOPES, M. T. R. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, p.13-17, 2000.

TOMOVA, B.S.; WATERHOUSE, J.S.; DOBERSKI, J. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 115, p. 153-159, 2005.

TSAI, J.H; LEE, R.F. **Biology y Control Del áfido negro de los cítricos (*Toxoptera citricidus* Kirkald) y la tristeza de los cítricos**. Universidad de Florida. 1996. Disponível em: <http://ipmworld.Umn.Edu/cancelado/Spchapters/TristezaSp.htm>. Acesso em Dez. de 2014.

VAN DER GOOT, P. Aphididae of Ceylon. **Spolia Zeylanica**, Columbo v. 11, n. 1, p. 70-75, 1980.

VASICEK, A.L.; De La ROSSA, F.; PAGLIONI, A. Aspectos biológicos y poblacionales de *Aulacorthum solani*, *Myzus persicae* y *Macrosiphium euphorbiae* (Homoptera: Aphidoidea) en pimiento (*Capsicum annum* L.). **Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas**, v.27, p.439-446, 2001.

VENDRAMIM, J. D. **Uso de plantas inseticidas no controle de pragas**. In: IMENES, S.L. (Org.). II CICLO DE PALESTRAS SOBRE AGRICULTURA ORGÂNICA. 1 ed. Campinas, v. 1, p. 64-69, 1997.

VENZON, M.; ROSADO, M. C.; PINTO, C. M. F.; DUARTE, V. S.; EUZÉBIO, D. E.; PALLINI, A. Potencial de defensivos alternativos para o controle do ácaro-branco em pimenta “Malagueta”. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 224-227, 2006.

VENZON, M.; ROSADO, M. C.; PALLINI, A.; FIALHO, A.; PEREIRA, C. J. Toxicidade letal e subletal do nim sobre o pulgão-verde e seu predador *Eriopis connexa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 627-631, 2007.

VIEIRA, C.P.; FERNANDES, B.J. **Plantas inseticidas**. In: SIMÕES, C.M. et al. (Org.). Farmacognosia – da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. p.739–754, 1999.

WEST, A.J.; MORDUE (LUNTZ), A.J. The influence of azadiractin on the feeding behavior of cereal aphids and slugs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.62, n.1, p.75-79, 1992.

WIEGERT, R.G. Population energetics of meadow spittlebugs (*Philaneus spumarius* L.) as affected by migration and habitat. **Ecological Monographs**, 34: 217-241, 1964.

World Health Organization. **Pesticides** [Internet]. 2012. [acesso em nov. 2013]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e Agronegócio Cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n 11, p. 2290-2306, 2013.

ZUCCHI, R. A.; NETO, S. S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba, FEAEQ, 139 p., 1993.



## CAPÍTULO 1

### Atividade inseticida de espécies vegetais sobre *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae)

#### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação bioinseticida de onze espécies vegetais sobre adultos e ninfas de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae). As soluções foram pulverizadas sobre os insetos, e seu hospedeiro, *Citrus limonia*. A avaliação da mortalidade foi realizada após 24 e 48 horas da aplicação das soluções. Os extratos vegetais foram testados numa concentração de 5 mg/mL, com exceção da *Drimys brasiliensis* (2mg/mL), *Guarea humaitensis* (0,001mg/mL) e das substâncias puras, gossipol (1mg/mL) e composto poligodial (0,5mg/mL). Para o cálculo da CL<sub>50</sub> foram utilizados apenas os bioinseticidas que causaram mortalidade acima de 80% em pelo menos uma das formas de aplicação. As espécies *Azadirachta indica*, *D. brasiliensis*, *Sapindus saponaria*, *Spilanthes acmella*, *Hortia oreadica* e o composto poligodial demonstraram potencial inseticida sobre o pulgão preto dos citros. A concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) estimada para ninfas de *T. citricidus* variou de 0,17 a 4,10 mg/mL e 0,30 a 5,01 mg/mL para adultos. O estágio ninfal apresentou maior sensibilidade aos extratos testados em relação aos adultos, exceto para o extrato aquoso de *Serjania lethalis*. As pulverizações dos hospedeiros com o óleo de nim resultaram em mortalidade de 100% de ninfas e adultos dos afídeos, e com o extrato hexânico de *D. brasiliensis* 84%, na mortalidade de adultos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pulgão preto, Extratos vegetais, Plantas Inseticidas.

## 1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e principal exportador de suco de laranja concentrado e congelado há mais de 15 anos (FNP, 2010). Essa posição coloca a citricultura como uma das principais atividades agrícolas do País (SAMPAIO, 2008), gerando entre empregos diretos e indiretos um contingente de 230 mil posições, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões (NEVES et al., 2011).

Entretanto, a citricultura brasileira vem enfrentando problemas, principalmente devido à ocorrência de pragas e doenças, necessitando de mudanças no sistema de produção citrícola para sobrevivência deste importante Agronegócio (GUERREIRO et al., 2005; NEVES et al., 2011).

Dentro do complexo de insetos praga que atacam essa cultura atualmente no Brasil, o afídeo *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae), conhecido vulgarmente como pulgão-preto dos citros, prejudica o desenvolvimento das plantas, ao atacar os brotos terminais, folhas em desenvolvimento e os botões florais. Provocam o encarquilhamento das folhas e, indiretamente, favorecem o aparecimento de “fumagina”, altamente prejudicial à respiração e fotossíntese da planta, influenciando diretamente na produção da planta (GONZAGA et al., 2008).

Segundo Almeida et al. (1999), a utilização de extratos vegetais, como método alternativo para o controle de pragas é uma forma de contornar os problemas provocados pelos inseticidas químicos, pois estes têm uma pequena persistência no meio ambiente e uma baixa toxicidade, quando comparados com os inseticidas sintéticos mais utilizados (HOSSAIN & POEHLING, 2006).

O efeito dos bioinseticidas sobre os insetos é variável, podendo ser tóxico, repelente, modificar o comportamento e desenvolvimento, interferir ou bloquear o metabolismo, esterilizante, causar deterrência alimentar e inibir a oviposição (JESUS et al., 2011).

A utilização de derivados de plantas na agricultura remonta pelo menos há dois milênios na China, Egito, Grécia e a Índia. O controle de pragas com produtos vegetais surgiu antes mesmo do advento dos inseticidas sintéticos. Os primeiros fitoinseticidas utilizados foram a nicotina extraída da *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), rianodina extraída da *Ryania speciosa* (Flacuortiaceae), a sabadina e outros alcalóides proveniente de *Shoenoaulon officinale* (Liliaceae), as piretrinas extraídas do *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae) e a rotenona encontrada em *Derris* spp. e *Lanchocarpus*

spp. (Fabaceae). Posteriormente, esses compostos foram substituídos pelos inseticidas sintéticos (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides) que se mostravam mais eficientes no controle de insetos (GALLO et al., 2002).

Entretanto, a necessidade de novos compostos para uso no manejo de pragas sem problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais nos organismos benéficos e aumento na frequência de insetos resistentes, provocou a retomada dos estudos envolvendo extratos vegetais (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Os produtos à base de plantas, além de terem efeito inseticida comprovado, apresentam uma diversidade de compostos ativos que podem ser empregados em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativas para controle e monitoramento das populações de insetos (NAVARRO-SILVA et al., 2009).

Todas as plantas sintetizam, acumulam ou depositam substâncias, as quais constituem os princípios ativos. Todos os organismos possuem caminhos metabólicos semelhantes de produção de compostos essenciais à sobrevivência, como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, compostos esses denominados de metabólitos primários. Todavia, as plantas produzem ampla diversidade de compostos que não têm função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são conhecidas como produtos secundários ou metabólitos secundários (ALMASSY JUNIOR et al., 2005). As plantas desenvolvem essa rota secundária com a finalidade de atrair um polinizador ou para se defender do ataque de pragas.

O emprego de vegetais contra insetos em geral têm aumentado nos países industrializados, inclusive no Brasil, principalmente pelo fato de o País possuir uma flora rica e diversa. Ao observar os dados de literatura envolvendo publicações que utilizaram plantas inseticidas, percebe-se o quanto é vasta esta abordagem e pode-se observar a eficácia destes produtos como alternativa de controle contra insetos. Esses compostos por serem biodegradáveis e não tóxicos são, potencialmente, adequados para utilização no controle de pragas (KRINSKI et al., 2014). O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial inseticida de extratos de onze espécies botânicas sobre *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae).

## 2. Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brasil, em ambiente de laboratório, com temperatura média de 27,5 °C e UR de 60 ± 10%.

Adultos de *Toxoptera citricidus* foram coletados em plantas de *Citrus limonia* localizadas no município de São Carlos. Posteriormente, foram levados ao Laboratório de Entomologia Econômica para confirmação específica. Os insetos foram dispostos em ramos do mesmo hospedeiro, individualizados em eppendorf contendo água. O conjunto foi protegido por um cilindro de vidro de 15 de altura e 10 de diâmetro (recipiente-teste), com uma das extremidades vedada com tecido voil. Esses adultos e as suas crias (ninfas recém nascidas em menos de 24 horas) foram utilizados nos bioensaios.

Os extratos foram obtidos a partir de 11 espécies de plantas distribuídas em 8 famílias botânicas provenientes de diferentes laboratórios (Tabela 1.1). Para avaliar os efeitos da toxicidade aguda sobre ninfas e adultos de *T. citricidus* as soluções foram pulverizadas sobre adultos e ninfas de um dia do inseto e ou sobre o ramo caulinar jovem de *C. limonia* Osbeck, hospedeiro do inseto. As pulverizações foram realizadas com o auxílio de um frasco pulverizador, aplicando-se em cada caso 2 mL de solução por repetição. Os insetos pulverizados eram transferidos para os ramos jovens do hospedeiro com o auxílio de um pincel entomológico e mantidos nos recipientes-teste. No caso dos hospedeiros, os ramos pulverizados eram deixados secar antes de receber os insetos, e então, transferidos para o recipiente-teste.

A avaliação da mortalidade dos adultos e ninfas de um dia foi realizada após 24 e 48 horas da aplicação das soluções, considerando-se mortos aqueles insetos que não respondiam ao toque de um pincel entomológico. Os bioensaios com os extratos vegetais, separadamente, foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado. Para cada tratamento, foram feitas dez repetições (recipiente-teste), contendo cinco insetos (adultos ou ninfas) cada.

Tabela 1.1. Espécies vegetais, Família, parte da planta utilizada para a produção do extrato, solventes utilizados para extração, e laboratórios produtores dos extratos vegetais.

<b>Espécies Vegetais</b>	<b>Famílias</b>	<b>Partes da planta utilizadas</b>	<b>Solventes utilizados na extração</b>	<b>Laboratórios</b>
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Sementes	Metanol	Laboratório de Produtos Naturais, UFSCar.
<i>Drimys brasiliensis</i>	Winteraceae	Raiz	Hexano	Laboratório de Estudo Fitoquímico e Ecofisiologia da reprodução de sementes, UFSCar.
<i>Guarea humaitensis</i>	Meliaceae	Folhas	-	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
<i>Gossypium L.</i>	Malvaceae	Sementes	-	Dr. G. Waites (Special Programme in Human Reproduction, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae	Raízes	Metanol	Laboratório de Produtos Naturais, UFSCar.
<i>Lippia gracilis</i> (plantas cultivadas com e sem estresse hídrico)	Verbenaceae	Folhas	Água	Departamento de Química. Universidade Federal de Sergipe (UFS).
<i>Myrsine coriacea</i>	Primulaceae	Folhas	Água	Laboratório de Estudo Fitoquímico e Ecofisiologia da reprodução de sementes, UFSCar.
<i>Myrsine umbellata</i>	Primulaceae	Folhas	Água, acetato de etila, dicloro metano, hexano, acetona e metanol.	
<i>Serjania lethalis</i>	Sapindaceae	Folhas	Água e etanol	
<i>Sapindus saponaria</i>	Sapindaceae	Folhas	Acetato de etila e Hexano	
<i>Spilanthes acmella</i>	Asteraceae	Inflorescência	Metanol	Departamento de Química. UFS.

Os extratos foram avaliados numa concentração de 5 mg/mL, com exceção de *D. brasiliensis* (2 mg/mL) e *G. humaitensis* (0,001 mg/mL), por insuficiência de material, e das substâncias puras, gossipol (1 mg/mL) e composto poligodial (0,5 mg/mL). Foi realizado um controle com água e outro com água e dimetilsulfóxido (5 µL/mL), não tendo sido observadas alterações ou mortalidade nos insetos.

A determinação da concentração letal para 50% da população foi realizada através de testes de concentrações múltiplas que variaram em relação à espécie vegetal (Tabela 1.2). Para o cálculo da CL<sub>50</sub> foram utilizados apenas os bioinseticidas que causaram mortalidade acima de 80% (CORRÊA, 2006) em pelo menos uma das formas de aplicação, com exceção da *G. humaitensis*, por se tratar de um óleo essencial, classe de bioinseticidas bastante promissora no controle de insetos.

Tabela 1.2. Extratos vegetais e as concentrações utilizadas para determinação da CL<sub>50</sub>.

<b>Extratos vegetais</b>	<b>Concentrações</b>
<i>S. saponaria</i> (Acetato de etila)	0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 mg/mL.
<i>S. saponaria</i> (Hexano)	0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 mg/mL.
<i>S. acmella</i>	5; 10; 20 mg/mL.
<i>D. brasiliensis</i>	0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 mg/mL.
<i>D. brasiliensis</i> (Composto poligodial)	0,0625; 0,125; 0,250; 0,5 mg/mL.
<i>H. oreadica</i>	1; 2; 3; 5; 6 mg/mL.
<i>A. indica</i>	0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5 mg/mL.
<i>G. humaitensis</i>	0,0001; 0,0002; 0,0003; 0,0005; 0,001 mg/mL.

Os dados de mortalidade média acumulada superior a 80%, após 48 horas de exposição aos extratos vegetais, foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Como essas duas pressuposições foram atendidas foi aplicada análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, procedeu-se à regressão linear ou quadrática para comparar o efeito das diferentes concentrações. O ajuste do modelo foi testado a 0,05% de significância e avaliado pelo seu coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). A CL<sub>50</sub> foi estimada pela análise de Probit (FINNEY, 1971) com o auxílio do programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar® (FERREIRA, 2003).

### 3. Resultados e Discussão

Dos vinte extratos testados sobre *Toxoptera citricidus*, apenas sete causaram mortalidade igual ou superior a 80%. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.3 e são expressos em percentagem de mortalidade.

O óleo de nim apresentou potencial inseticida sobre esse afídeo, com efeito dependente da concentração; ou seja, à medida que se aumentava a concentração das soluções, aumentava a mortalidade dos pulgões. Após 48 horas de exposição, as ninfas e adultos tiveram mortalidade máxima (100%) nas concentrações estimadas de 2,87 e 2,98 mL/mL, respectivamente.

Na concentração de 1mL/mL, o óleo de nim promoveu mortalidade de 58% em ninfas e 54% em adultos. Já nas concentrações de 3 e 5mL/mL não houve produção de ninfas, possivelmente devido ao rápido efeito letal do produto sobre os adultos.

Diversos estudos comprovam o potencial do nim para o controle de afídeos. Nisbet et al. (1993) concluiu que o nim causou inibição alimentar em *M. persicae*, Abdallah et al. (2005) verificaram alta mortalidade de *Aphis craccivora* quando estes foram pulverizados com o nim, Lowery e Isman (1994) observou o efeito regulador do crescimento em 9 espécies de afídeos, Santos et al. (2004) e Oliveira (2009) comprovaram o efeito do nim sobre o desenvolvimento, sobrevivência e fecundidade de *A. gossypii*, constituindo-se assim numa boa alternativa ao uso de agroquímicos

Óleos e extratos de sementes de nim, contendo azadiractina e outras moléculas estruturalmente relacionadas, tem constituído a base do uso do nim no controle de insetos (ISMAN, 1997). Atualmente são conhecidos mais de 50 compostos terpenóides da planta, a maioria com ação sobre os insetos (MARTINEZ, 2008). Dentre eles estão nimbina, salanina e meliantrol, além da azadiractina, que é a principal responsável por seu efeito inseticida (MARTINEZ, 2002).

Tabela 1.3. Efeito dos extratos de diferentes espécies vegetais sobre a mortalidade e fecundidade de *Toxoptera citricidus*.

<b>Espécie vegetal</b>	<b>Solvente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Forma de aplicação</b>	<b>Mortalidade</b>	<b>Ninfas/Fêmeas/dia</b>
<i>Azadirachta indica</i>	Metanol	5mg/mL	No adulto	100%	0
			Na ninfa	100%	-
			No hospedeiro (Adulto)	100%	0
			No hospedeiro (Ninfa)	100%	-
<i>Drimys brasiliensis</i>	Hexano	2mg/mL	No adulto	100%	0,7
			Na ninfa	100%	-
			No hospedeiro (Adulto)	84%	1,12
			No hospedeiro (Ninfa)	76%	-
<i>Drimys brasiliensis</i> (Composto poligodial)	Hexano	500 µg/mL	No adulto	76%	2,16
			Na ninfa	96%	-
<i>Sapindus saponaria</i>	Acetato de Etila	5mg/mL	No adulto	98%	0,2
			Na ninfa	98%	-
<i>Sapindus saponaria</i>	Hexano	5mg/mL	No adulto	98%	0
			Na ninfa	100%	-
<i>Spilanthes acmella</i>	Metanol	5mg/mL	No adulto	84%	0,07
			Na ninfa	88%	-
			No hospedeiro (Adulto)	60%	0,2
			No hospedeiro (Ninfa)	40%	-
<i>Hortia oreadica</i>	Metanol	5mg/mL	No adulto	76%	1,45
			Na ninfa	80%	-
			No hospedeiro (Adulto)	12%	2,94
			No hospedeiro (Ninfa)	24%	-
<i>Guarea humaitensis</i>	-	0,001mg/mL	No adulto	44%	2,56
			Na ninfa	48%	-
			No hospedeiro (Adulto)	18%	1,57
			No hospedeiro (Ninfa)	22%	-



<b>Espécie vegetal</b>	<b>Solvente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Forma de aplicação</b>	<b>Mortalidade</b>	<b>Ninfas/Fêmeas/dia</b>
<i>Lippia gracilis</i> (com irrigação)	Água	5mg/mL	No adulto	16%	2,42
			Na ninfa	14%	-
			No hospedeiro (Adulto)	2%	1,4
			No hospedeiro (Ninfa)	6%	-
<i>Lippia gracilis</i> (sem irrigação)	Água	5mg/mL	No adulto	18%	2,7
			Na ninfa	18%	-
			No hospedeiro (Adulto)	8%	2,68
			No hospedeiro (Ninfa)	28%	-
<i>Myrsine coriacea</i>	Água	5mg/ml	No adulto	14%	2,95
			Na ninfa	20%	-
			No hospedeiro (Adulto)	18%	5,17
			No hospedeiro (Ninfa)	20%	-
<i>Myrsine umbellata</i>	Água	5mg/ml	No adulto	22%	4,32
			Na ninfa	22%	-
			No hospedeiro (Adulto)	14%	4,94
			No hospedeiro (Ninfa)	12%	-
	Acetato de Etila	5mg/ml	No adulto	18%	4,2
			Na ninfa	28%	-
	Dicloro- metano	5mg/ml	No adulto	16%	4,34
			Na ninfa	22%	-
	Hexano	5mg/ml	No adulto	26%	1,62
			Na ninfa	54%	-
	Acetona	5mg/ml	No adulto	46%	0,99
			Na ninfa	52%	-
Metanol	5mg/ml	No adulto	40%	1,84	
		Na ninfa	44%	-	
<i>Serjania lethalis</i>	Água	5mg/ml	No adulto	16%	2,84
			Na ninfa	1%	-
			No hospedeiro (Adulto)	0	1,2
			No hospedeiro (Ninfa)	14%	-

Espécie vegetal	Solvente	Concentração	Forma de aplicação	Mortalidade	Ninfas/Fêmeas/dia
<i>Serjania lethalis</i>	Etanol	5mg/ml	No adulto	18%	2,57
			Na ninfa	26%	-
			No hospedeiro (Adulto)	8%	3,63
			No hospedeiro (Ninfa)	12%	-
<i>Gossypium L.</i> (Gossipol)		1mg/ml	No adulto	0	2,45
			Na ninfa	4%	-
			No hospedeiro (Adulto)	16%	1,93
			No hospedeiro (Ninfa)	18%	-
Controle			No adulto	0%	3,31
			Na ninfa	0%	-
			No hospedeiro (Adulto)	0%	3,60
			No hospedeiro (Ninfa)	0%	-

Na literatura também são encontrados relatos do uso de óleos de várias espécies vegetais no combate de afídeos. Butler et al. (1988) estudando o efeito de emulsões de óleos de soja e algodão no controle do pulgão *Aphis gossypii*, em condições de casa de vegetação, verificaram que os óleos de algodão na concentração de 10% e de soja a 5% e 2,5% (v/v) causaram uma mortalidade de 93%, 93% e 63% respectivamente em ninfas e adultos do pulgão. Oliveira et al. (2009) estudando o efeito de diferentes concentrações de óleo de açafrão no controle do pulgão-branco em algodoeiro, observaram que a concentração de 5 e 10% (v/v) apresentou um efeito inseticida com 100% de eficiência no controle para *Aphis gossypii*.

O mecanismo de ação dos óleos se dá de forma direta pela obstrução dos espiráculos, levando assim o inseto a morrer por asfixia. Há, ainda, um efeito adicional causado pela obstrução dos receptores olfativos, interferindo na localização de hospedeiros, resultando em repelência para afídeos (BUTLER et al., 1989).

Os óleos podem ser uma alternativa ao uso de agroquímicos, pois os mesmos são bastante eficazes, promovem menor pressão de seleção para resistência entre insetos, são seguros para os seres humanos e o ambiente, além de quando utilizados junto a agroquímicos reduzirem a evaporação e lavagem dos mesmos durante estações chuvosas (BUTLER et al., 1991; BUTLER et al., 1993; LIU & STANSLY, 2000). Os

óleos tornam a cutícula dos insetos mais permeáveis e melhoram a deposição dos agroquímicos sobre as folhas, permitindo o inseticida agir de forma mais efetiva (BUTLER et al., 1991; BUTLER & HENNEBERRY, 1990; BUTLER et al., 1993; LIU & STANSLY, 2000; FENIGSTEIN et al., 2001).

As ninfas de *T. citricidus* apresentaram maior sensibilidade ao óleo do nim, sendo que mais de 50% dos pulgões nesse estágio estavam mortos já na concentração de 1mg/mL após 24 horas, enquanto que para os adultos esse registro foi possível apenas com 48 horas. A morte dos insetos em curto período de tempo demonstra a ação imediata do óleo testado, principalmente sobre ninfas desse afídeo. Esse aspecto é importante, uma vez que há risco de perda do produto pela ação da chuva logo após sua aplicação (GONZAGA et al.,2008), além de diminuir o tempo desse afídeo na cultura.

A fração hexânica das raízes de *D. brasilensis* também provocou alta mortalidade em *T. citricidus*, 100%, além de afetar significativamente a reprodução, diminuindo a quantidade de ninfas/fêmea/dia, 0,7 (Tabela 1.4). Após 48 horas de exposição, as ninfas e adultos tiveram mortalidade máxima (100%) nas concentrações estimadas de 1,58 e 1,97 mg/mL, respectivamente.

Tabela 1.4. Efeito de diferentes bioinseticidas obtidos de extrato de espécies vegetais na mortalidade de ninfas e adultos de *T. citricidus*.

Bioinseticida-espécies vegetais	Mortalidade	
	Ninfa	Adulto
<i>Azadirachta indica</i>	100 a	100 a
<i>Drimys brasilensis</i>	100 a	100 a
<i>Sapindus saponaria</i> (Hexano)	100 a	98 a
<i>Sapindus saponaria</i> (Acetato de etila)	98 ab	98 a
<i>Spilanthes acmella</i>	88 b	84 b
<i>Hortia oreadica</i>	60 c	40 c

\*Média harmônica do número de repetições;

\*\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram encontrados na literatura dados referentes às ações de *Drimys brasilensis* no controle de insetos. No entanto, espécies pertencentes ao gênero *Drimys* são conhecidas por apresentarem compostos sesquiterpenos do grupo drimanos os quais

possuem ampla variedade de atividades biológicas, incluindo elevado potencial inseticida (JANSEN & GROOT, 2004).

Segundo Tandon et al. (2009) o hexano, por ser apolar, tem afinidade com substâncias graxas, as quais são pouco ativas contra insetos, fato esse que aumentou o interesse no estudo desse extrato pois os compostos aí presentes devem estar em baixa concentração podendo, conseqüentemente, ter alta atividade sobre pulgões, tomando interessante a sua síntese.

O poligodial, isolado como composto majoritário na planta *D. brasiliensis*, foi testado apenas sobre adultos e ninfas do pulgão preto, causando mortalidade de 76% e 96%, respectivamente. Esse sesquiterpeno é relatado por ser um potente inibidor alimentar em diferentes espécies de insetos, incluindo *Spodoptera littoralis* (Lepdoptera: Noctuidae) (ZAPATA et al., 2009), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (GOLS et al., 1996), *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (PROTA et al., 2013) e *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) (ZAPATA et al., 2010).

A atividade de inibição da alimentação ocasionada por compostos do grupo drimanos, incluindo o poligodial, está relacionada aos seus efeitos sobre quimiorreceptores. Embora o poligodial atue principalmente por inibição da alimentação, quando ingerido o composto pode afetar a locomoção e prejudicar a utilização dos alimentos ingeridos, resultando na redução do crescimento ou mortalidade do inseto (ZAPATA et al., 2009).

Os extratos hexânico e acetato de etila (AcOEt) da *S. saponaria* apresentaram também potencial inseticida sobre o pulgão preto do citros (Tabela 3.4). Após 48 horas de exposição, as ninfas tiveram mortalidade de 100% nas concentrações estimadas de 3,22 mg/mL, para a fração hexânica, e 3,28mg/mL, para a fração AcOEt. Nos adultos, o percentual máximo de mortalidade pode ser registrado nas comcentrações estimadas de 3,43 e 3,86 mg/mL das frações de hexano e AcOEt, respectivamente. Na concentração de 5mL/mL não houve produção de ninfas para a fração de hexano, já na fração AcOEt a fecundidade foi de 0,2 ninfas/fêmea/dia.

Verificou-se também nas primeiras 24 horas de exposição, que à fração hexânica foi a que causou maior mortalidade em relação a fração AcOEt, 61,2% e 48,8% em adultos e 83% e 73,6% em ninfas, respectivamente. Ao contrario dos resultados apresentados nesse experimento, outros autores observaram a ineficiência do extrato hexânico sobre a mortalidade dos insetos, relatando que extratos altamente apolares são

menos eficientes do que aqueles com polaridade intermediária (CUBILLO et al., 1997). Coelho et al. (2006) constataram que a polaridade das substâncias contidas nos extratos etanólicos e hexânicos apresentou diferentes taxas de atividade; por exemplo, com extratos da raiz de *Simarouba versicolor*, a taxa de mortalidade nas ninfas de *Rhodnius milesi* (Hemiptera: Reduviidae) foi de 35% para hexano e 95% para o etanol, e com a raiz de *Guarea guidonia* a mortalidade foi de 75% para o hexano e 20% para o etanol.

*Sapindus saponaria* pode apresentar uma boa fonte de saponinas bioativas e seu potencial inseticida já foi testado em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (BOIÇA JÚNIOR et al., 2005), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (BARRETO et al., 2006), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (SANTOS et al., 2008) e *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) (PORRAS & LOPEZ-AVILA, 2009) no entanto, não foram encontrados dados na literatura sobre o seu potencial no controle do *T. citricidus*.

Os afídeos submetidos ao extrato metanólico de *S. acmella* apresentaram uma mortalidade de 92% em adultos e 64% em ninfas na concentração de 5mg/mL, e uma fecundidade de 0,07 ninfas/fêmea/dia. A mortalidade máxima (100%) após 48 horas de exposição ocorreu na concentração estimada de 15,58 mg/mL para adultos, já para ninfas não houve diferença estatística entre as concentrações testadas

*Spilanthes acmella* é conhecida no Brasil como jambú (FAVORETO & GILBERT, 2010). Tem sido bem documentada pelos seus usos populares como tempero, antibacteriano, antifúngico, antimalárico, e como remédio para dor de dentes, gripe, inseticida, tosses, além de raiva e tuberculose (DI STASI et al., 1994; AKAH; EKEKWE, 1995; SINGH, 1995; HIND; BIGGS, 2003). Ramsewak et al. (1999) ao utilizar extrato hexânico de *S. acmella* sobre larvas de *Aedes aegyptii* e *Helicoverpa zea* observaram mortalidade de 100%, numa concentração de 12,5 e 250 mg/mL, respectivamente.

Os principais efeitos biológicos observados são atribuídos ao espilantol, uma alquilamida alifática, descrita como um óleo viscoso ardente, de coloração variando de amarelo pálido ao amarelo claro, que produz um efeito anestésico e de formigamento sobre a língua. É o maior constituinte encontrado nas espécies *Spilanthes* e apresenta atividade inseticida contra ovos e larvas de *Culex* e mosquitos de *Aedes* (TIWARI et al., 2011). O espilantol tem sido descrito como inócuo para a maioria dos vertebrados, mas letal para os invertebrados (WATT & BRAYER-BRANDWIJK, 1962).

Os insetos submetidos ao extrato metanólico de *H. oreadica* causaram mortalidade de 80% em ninfas e 76% em adultos, com fecundidade de 1,45 ninfas/fêmea/dia. A Família Rutaceae compreende muitas espécies que apresentam propriedades biológicas, sendo considerada uma grande fonte de alcalóides, cumarinas, flavonóides e limonoides (WATERMAN & GRUNDON, 1983). Estudos com *Hortia* já demonstraram atividade biológica contra o *Leishmania tarentolae* (Trypanosomatidae), *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae), *Plasmodium falciparum* (Plasmodidae), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Trypanosomatidae) (BRAGA, 2005). Não foram encontrados na literatura dados referentes às ações de *Hortia oreadica* no controle de insetos-praga.

No presente trabalho, *G. humaitensis* causou mortalidade inferior a 60%, mas por se tratar de óleo essencial, uma das classes de compostos derivados de plantas mais utilizados como atraentes ou repelentes de insetos (BOWMAN, 2006; ISMAN, 2006) foram testadas concentrações múltiplas para obtenção da CL<sub>50</sub>.

Os óleos essenciais possuem um grande espectro de modos de ação incluindo deterrência, inibição da motilidade e respiração, redução do crescimento e fecundidade, rompimento da cutícula e efeito sobre ciclos bioquímicos dos artrópodes (ISMAN, 2006; COPPING & MENN, 2000). Além disso, o uso dessas substâncias tem se tornado de grande interesse para os pesquisadores por causar repelência, terem alta volatilização e rápida degradação (REGNAULT-ROGER & PHILOGÈNE, 2008).

As interações entre voláteis de plantas e afídeos são complexas, podendo apresentar diferentes respostas a depender da espécie em teste. Sampson et al. (2005) testaram 23 compostos provenientes de óleos essenciais de 14 gêneros e quatro famílias botânicas sobre o pulgão *Lipaphis pseudobrassicae* e demonstraram que o óleo puro de *Pimpinella isaurica* é bioativo para esse afídeo, matando 90% na concentração de 10 mg/mL, para o óleo de *Foeniculum vulgare* a atividade inseticida foi mais lenta, detectada apenas após os pulgões serem expostos durante 60 minutos a uma concentração de 5mg/mL.

Os óleos essenciais de *Cuminum ansium*, *Origanum syriacum* var. *bevanii* e *Eucalyptus camaldulensis* demonstraram ação inseticida para o *Aphis gossypii* na concentração de 2µl/L durante um tempo de exposição de 96 horas (TUNÇ & SAHINKAYA, 1998), bem superior ao testado no presente trabalho.

Bruce et al. (2005) utilizaram sachês com o óleo essencial de *Hemizygia petiolata* em campo de feijão e trigo, visando à redução de alados de *Acyrtosiphon*

*pisum* sobre a cultura. Os autores constataram uma redução significativa do afídeo nas parcelas de feijão que foram tratadas. Para *Sitobion avenae*, em cultura de trigo, essa redução não foi significativa, demonstrando a variabilidade de resposta em função da espécie testada.

As ninfas de *T. citricidus* também apresentaram maior sensibilidade aos bioinseticidas testados, com exceção do extrato aquoso de *Serjania lethalis* (Tabela 1.3). A maior mortalidade de ninfas deve-se, provavelmente, a sua maior suscetibilidade. De acordo com PARTRIDGE & BORDEN (1997) e STARK & RANGUS (1994) insetos jovens são mais afetados pelos efeitos dos inseticidas botânicos.

Em termos de concentrações efetivas de extratos botânicos para o controle de espécies de insetos-praga, estudos prévios apontam  $CL_{50}$ , em mg/mL, variando de 0,45 a 20 (GONZAGA et al., 2008). No presente trabalho, a concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) estimada para ninfas de *T. citricidus* variou de 0,17 a 4,10 mg/mL e 0,30 a 5,01 mg/mL para adultos (Tabela 1.5). Esses resultados demonstram que mesmo as menores concentrações utilizadas (< que 5mg/mL) foram capazes de controlar 50% da população praga em estudo.

Ao analisar a toxicidade letal de inseticidas botânicos sobre adultos ápteros de *Aphis gossypii*, Breda et al. (2010) obtiveram valores de toxicidade letal baseados em  $CL_{50}$ , que variaram de 10,15 a 13,37 mL/L, para produtos à base de nim. Esses autores também constataram valores de  $CL_{50}$  de 22,58 e  $CL_{90}$  de 142,36 mL/L para o óleo de pinhão-manso, *Jatropha curcas* L. (Malpighiales: Euphorbiaceae).

Tabela 1.5. Valores da Concentração Letal (CL50-48h, mg/mL) de extratos obtidos de diferentes espécies vegetais e dos intervalos de confiança (IC – 95%) do teste de toxicidade aguda com ninfas e adultos de *Toxoptera citricidus*.

Espécies vegetais	<i>T. citricidus</i> Estágio	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>90</sub> (IC 95%)	b (±EP)	χ <sup>2</sup>	G.L
<i>A. indica</i>	Ninfa	0,48 (0,38-0,60)	2,49 (1,71-4,42)	1,79±0,21	31,81	48
	Adulto	0,49 (0,39-0,62)	2,39 (1,66-4,10)	1,87±0,22	24,96	48
<i>D. brasilensis</i> (Hexano)	Ninfa	0,31 (0,26-0,37)	0,98 (0,77-1,38)	2,59±0,28	17,59	48
	Adulto	0,58 (0,48-0,72)	1,46 (1,12-2,16)	3,24±0,32	74,67	48
<i>D. brasilensis</i> (Composto poligodial)	Ninfa	0,17 (0,15-0,19)	0,34 (0,28-0,43)	4,31±0,48	32,15	38
	Adulto	0,30 (0,25-0,35)	0,72 (0,56-1,07)	3,36±0,43	15,84	38
<i>S. saponaria</i> (Hexano)	Ninfa	0,37 (0,31-0,43)	1,02 (0,83-1,39)	2,89±0,31	21,78	58
	Adulto	0,49 (0,41-0,59)	1,64 (1,29-2,25)	2,47±0,24	47,38	58
<i>S. saponaria</i> (Acetato de etila)	Ninfa	0,26 (0,10-0,39)	0,93 (0,65-1,90)	2,36±0,40	155,88	48
	Adulto	0,82 (0,69-0,97)	2,51 (1,98-3,51)	2,64±0,28	18,90	48
<i>S. acmella</i>	Ninfa	4,07 (2,60-5,02)	8,82 (7,34-12,43)	3,82±0,88	9,26	28
	Adulto	1,42	4,54	2,55±1,32	18,18	28
<i>H. oreadica</i>	Ninfa	4,10 (3,58-4,77)	8,84 (7,05-12,85)	3,84±0,46	64,04	48
	Adulto	5,01 (4,53-5,66)	9,21 (7,67-12,44)	4,84±0,66	39,11	48
<i>Guarea humaitensis</i>	Ninfa	0,81 (0,57-1,54)	7,56 (3,09-55,63)	1,32±0,26	27,63	48
	Adulto	3,79	228,50	0,72±0,27	20,55	48

Legenda: a. CL50: dosagem mortal a 50% da amostra, IC: intervalo de confiança; b. CL90: dosagem mortal a 90% da amostra, IC: intervalo de confiança; c. b (±EP): erro padrão; d. X<sup>2</sup> = qui-quadrado; e. G. L.: grau de liberdade.



Kimbaris et al. (2010) testaram os óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita*, *Citrus sinensis* e duas variedades de *Mentha pulegium* sobre os pulgões *Aphis fabae*, *Macrosiphoniella sanborni*, *A. pisum* e *M. persicae* e após 24 horas obtiveram as CL<sub>50</sub> máxima de 1,12 µl/L de *M. pulegium* para *M. persicae* e mínima de 0,46 µl/L de *M. piperita* para *A. fabae*.

Sampson et al. (2005) avaliando a toxicidade aguda de *Laurus nobilis* sobre *Lipaphis pseudobrassicae*, encontraram valores para CL<sub>50</sub> de 11,7; 9,3 e 7,5 mg/ml, para 10, 30 e 60 minutos respectivamente.

Os extratos de *Lippia gracilis*, *Myrsine umbellata*, *Myrsine coriacea*, *Serjania lethalis* e a substância pura Gossipol não apresentaram atividade inseticida sobre o *T. citricidus*. Para Shaalan et al. (2005) a bioatividade do fitoquímico contra insetos pode variar significativamente dependendo da parte utilizada e idade da planta.

As pulverizações dos ramos caulinares resultaram em alta mortalidade das ninfas e adultos apenas nos tratamentos com o óleo de nim, 100%, e mortalidade de ninfas e adultos, 76 e 84% respectivamente, para o extrato hexânico de *D. brasilensis*. Provavelmente a menor área de contato do inseto com a solução ou a perda do princípio ativo por volatilização do produto antes da transferência dos afídeos tenha resultado em perda de atividade inseticida do produto. Partridge & Borden (1997) e Stark & Rangus (1994) observam que a maneira de aplicação do produto e como o inseto é exposto ao contaminante são fatores que também influenciam a ação dos inseticidas botânicos. Por meio de contato direto os derivados botânicos podem interagir com o tegumento do inseto, além de atuar em enzimas digestivas e neurológicas (ISMAN, 2006), levando a morte do mesmo.

A grande variedade de substâncias presentes na flora continua sendo um enorme atrativo na área de controle de insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas pequena parcela destas plantas foi investigada com tal finalidade (SIMÕES & SPITZER, 2004) e os fitoinseticidas constituem apenas 1% do mercado mundial (ISMAN, 2006).

Entretanto, algumas barreiras para a comercialização destes fitoquímicos foram relatadas por Isman (1997) dentre elas: a escassez de recursos botânicos, sendo necessária a produção de inseticidas botânicos em larga escala para a comercialização, a menos que a planta em questão seja extremamente abundante na natureza ou já tenha sido produzida para outras finalidades; a padronização dos extratos e controle de

qualidade, baseado nos ingredientes ativos; e as dificuldades de registro destes fitoquímicos.

Esta situação pode impedir muitos pesticidas botânicos de alcançar a esfera comercial em países onde existe grande demanda por estes produtos. No entanto, a busca de novos inseticidas constitui-se um campo de investigação aberto, amplo e contínuo, que deveriam não apenas ser pesquisados em profundidade como também introduzidos nas propriedades agrícolas como fonte alternativa no controle de pragas, especialmente em sistemas orgânicos de produção.

#### **4. Conclusão**

Dentre as soluções avaliadas sobre *T. citricidus* o óleo de *A. indica*, extrato hexânico e composto poligodial de *D. brasiliensis*, extratos hexânico e acetato de etila de *S. saponaria*, extratos metanólicos de *S. acmella* e *H. oreadica* causaram mortalidade igual ou superior a 80%, com concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) estimada para ninfas variando de 0,17 a 4,10 mg/mL e 0,30 a 5,01 mg/mL para adultos, demonstrando assim propriedades inseticidas e apresentando potencial para serem utilizados como uma ferramenta no manejo dessa praga.

Os extratos de *L. gracilis*, *M. umbellata*, *M. coriacea*, *S. lethalis* e a substância pura Gossipol não apresentaram atividade inseticida sobre o *T. citricidus* e as pulverizações dos ramos caulinares resultaram em mortalidade superior a 80% nos tratamentos com o óleo de nim e com o extrato hexânico de *D. brasiliensis*. Considerando que a toxicidade dos produtos vegetais está obviamente associada às variações entre as espécies, às partes vegetais utilizadas, às formas de extração e à forma de aplicação do produto.

#### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas.

## Referências bibliográficas

ABDALLAH, S.A., BARAKAT, A.A., BADAWEY, H.M.A.; SOLIMAN, M. M.M. Insecticidal activity of different wild plant extracts against the cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch. Paper presented at the first Arab conference of applied biological pest control, April, Cairo, Egypt. 2005. Disponível em: Acesso em: junho de 2015.

ALMASSY JÚNIOR, A.A.; LOPES, R.C.; ARMOND, C.; SILVA, F. DA; CASALI, V.W.D. **Folhas de chá: Plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: Ed. UFV, 233 p., 2005.

ALMEIDA, F. A. C.; GOLDFARB, A. C.; GOUVEIA, J. P. G. Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus spp.* **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 1, n. 1, p. 13-20, 1999.

BARRETO, C. F.; CAVASIN, G. M.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponária* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 1, p. 37-57, 2006.

BRAGA, P.A.C. Estudo fitoquímico de espécies de Hortia (Rutaceae), importância quimiosistemática e atividades biológicas dos constituintes isolados. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. **Tese de doutorado**, 269 p.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; TORRES, A. L.; CHAGAS FILHO, N. R. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n. 1, p. 45-50, 2005.

BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8.ed. Barueri: Manole, 422p., 2006.

BREDA, M.O.; OLIVEIRA, J.V. de; ANDRADE, L.H. de. Eficácia de inseticidas botânicos no controle do pulgão do algodoeiro, *Aphis gossypii* Glover (Hem.: Aphididae), em condições de laboratório. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v.36, p.165-170, 2010.

BRUCE, T.J.A.; BIRKETT, M.A.; BLANDE, J.; HOOPER, A.M.; MARTIN, J.L.; KHAMBAY, B.; PROSSER, I.; SMART, L.E.; WADHAMS, L.J. Response of economically importante aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. **Pest Management Science**, London, v. 61, p. 1115-1121, 2005.

BUTLER, G.D. Jr.; COUDRIET, D.L.; HENNEBERRY, T.J. Toxicity and repellency of soybean and cottonseed oils to the sweetpotato whitefly and the aphid on cotton in greenhouse studies. **Southwestern Entomologist**, v. 13, n. 2, p.81-86, 1988.

BUTLER, G.D. Jr.; COUDRIET, D.L.; HENNEBERRY, T.J. Sweetpotato whitefly: host plant preference and repellent effect of plant-derived oils on cotton, squash, lettuce and cantaloupe. **Southwestern Entomologist**, v.14, n.1, p.9-16, 1989.

BUTLER, G.D.J.; PURY, S.N.; HENNEBERRY, T.J. Plant-derived oil and detergent solutions as control agents for *Bemisia tabaci* and *Aphis gossypii* on cotton. **Southwestern Entomologist**, v.16, n.4 p.331-337, 1991.

BUTLER, G.D. Jr.; COUDRIET, D.L.; HENNEBERRY, T.J. Insecticidal effects of selected soaps, oils and detergents on the sweetpotato whitefly: (Homoptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist**, v. 76, n.1, p.161-168, 1993.

COELHO, A. A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 1, p. 133-138, 2006.

COPPING, L.G.; MENN, J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.

CORRÊA, R.S. Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth (Timbó) sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy pulgão preto dos citros (Sternorrhyncha: Aphididae). **Dissertação (Mestrado)**. INPA/UFAM. Manaus- AM. 2006.

CUBILLO, D.; SANABRIA, G.; HIJE, L. Mortalidade de adultos de *Bemisia tabaci* com extratos de hombre grande (*Quassia amara*). **Manejo Integrado de Plagas**, v. 45, p. 25-29, 1997.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v.65, p.529-540, 1994.

FAVORETO, R., GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v.5, n.1, p.83-90, 2010.

FENIGSTEIN, A.; ELIYAHU, M.; GAN-MOR, S.; VEIEROV\_, D. Effects of five vegetable oils on the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Phytoparasitica**, v.29, n.3, p.197-206, 2001.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**, 3rd., S. Chand & Company Ltd, New Delhi, 333pp., 1971.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **Agriannual 2010: anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo. 520p., 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; 248 BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D; 249 MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 250 920p., 2002.

GOLS, G.; VAN LOON, J.; MESSCHENDORP, L. Antifeedant and toxic effect of trimanes on Colorado potato beetle larvae. **Entomologia Experimental Applicata**, v. 79, p. 69-79, 1996.

GONZAGA, A. D.; GARCIA; M. V. B.; SOUSA; S. G. A.; PY-DANIEL, V.; CORREA, R. S.; RIBEIRO, J. D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea marcovii* St. Hill) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazônica**, v. 38, n. 1, p. 101-106, 2008.

GUERREIRO, J. C.; BUENO, P. R. R.; FILHO BERTI, E.; BUSOLI, A. C. Ocorrência estacional das principais espécies de Coccinellidae predadores de *Toxoptera citricida* nos citros. **Revista Eletrônica de Agronomia**, ano IV, n. 07, p. 1-14, 2005.

HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea*: Compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, v.20, n.1, p.31-39, 2003.

HOSSAIN, M. B.; POEHLING, H. M. Non-target effects of three biorationale insecticides on two endolarval parasitoids of *Liriomyza sativae* (Diptera, Agromyzidae). **Journal of Applied Entomology**, 130 (6-7): 360-367, 2006.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: Barriers to commercialization. **Phytoparasitica**, v.25, p.339-44, 1997.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

JANSEN, B.; GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Repeports**, v. 21, n. 4, p. 449-477, 2004.

JESUS, F. G.; PAIVA, L. A.; GONÇALVES, V. C.; MARQUES, M. A.; JUNIOR, A. L. B. Efeito de plantas inseticidas no comportamento e biologia de *Plutella xylostella* (Lepidóptera: Plutellidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.279-285, 2011.

KIMBARIS, A.C.; PAPACHRISTOS, D.P.; MICHAELAKIS, A.; MARTINO, A.F.; POLISSIOU, M. Toxicity of plant essential oil vapours to aphids pests and their coccinellid predators. **Biocontrol Science and Technology**, New York, v.20, n.4, 2010.

KIRKALDY, G. W. On some peregrine Aphidae in Oahu, Honolulu. *Proc. Hawaiian Entomological Society*. v.1, p.100, 1907.

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

LeOra Software. **POLO PC**: probit or logit analysis [computer program]. Berkeley (Calif); LeOra Software; 1987.

LOWERY, D.T.; ISMAN, M.B. Insect growth regulating effects of nem extract and azadirachtin on aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Amsterdam, v.72, n.1, p. 77-84, 1994.

LIU, T. X.; STANSLY, P. A. Insecticidal activity of surfactants and oils against silverleaf whitefly nymphs (Homoptera: Aleyrodidae) on collards and tomato. *Pest Management Science*, v.56, p.861-866, 2000.

MARTINEZ, S. S. Composição do nim. In: Martinez, S.S. **O Nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p. 23-30., 2002.

MARTINEZ, S.S. **O nim: Azadirachta indica - um Inseticida Natural** . Londrina : IAPAR.. p. 5, 2008.

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

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 138p., 2011.

NISBET, A.J.; WOODFORD, J. A. T.; R.H.C. STRANG, R. H. C.; CONNOLLY, J. D. Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 68: 87-98, 1993.

PARTRIDGE, M.J.; BORDEN, J.H. Evaluation of neem seed extract for control of the spruce aphid, *Elatobium abietinum* (Walker) (Homoptera: Aphididae). **Canadian Entomologist**, v. 129, pp. 899- 905, 1997.

PORRAS, M.F.; LOPEZ-AVILA, A. Effect of extracts from *Sapindus saponaria* on the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 35, n. 1, p. 7-11, 2009.

PROTA, N.; BOUWMEESTER, H.J.; JONGSMA, M.A. Comparative antifeedant activities of polygodial and pyrethrins against whiteflies (*Bemisia tabaci*) and aphids (*Myzus persicae*). **Pest Management Science**, 70(4):682-8, 2013.

OLIVEIRA, F.S.; TAKATSUKA, F.S.; BARROS, R.G.; CZEPAK, C. **Óleo de nim indiano (*Azadirachta indica*) e óleo de açafrão (*Curcuma longa*) para o controle do pulgão branco (*Aphis gossypii*) do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)**. Disponível em: 48 [http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/131.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/131.pdf). Acesso em outubro de 2009.

REGNAULT-ROGER, C.; PHILOGÈNE, B.J.R. Past and current prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 1, 2008.

SAMPAIO, J. **A guerra da citricultura**. Viçosa: Portal do Agronegócio, 2008. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br> Acesso em agosto de 2009.

SAMPSON, B.J.; TABANCA, N.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, B.; BASER, K.H.C.; KHAN, I.A.; SPIERS, J.M.; WEDGE, D.E. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). **Pest Management Science**, v. 61, 2005.



SANTOS, T.M. dos, COSTA, N.P., TORRES, A.L. Effect of neem extract on the cotton aphid. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.11, p.1071-1076, 2004.

SANTOS, R. C. A.; COSTA, S. E. C.; DOMINGUES, L. S.; DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D. Atividade inseticida de meliáceas sobre *Diabrotica speciosa* (Col., Chrysomelidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1805-1809, 2008.

SHAALAN, E. A.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL-WAHABA, H.; MANSOUR, A. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v.31, p.1149 -66, 2005.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). Farmacognosia da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRS/UFSC, 586p, 2004.

SINGH, V. Herbal folk remedies of Morni hills (Haryana), India. **Fitoterapia**, v.66, p.425-430, 1995.

STARK, J.D.; RANGUS, T.M. Lethal and sublethal effects of the neem insecticide formulation, ‘Margosan-O’, on the pea aphid. **Pesticide Science**, v.41, p.155-160, 1994.

TANDON, R., NASRALLAH, H.A., KESHAVAN, M.S. Schizophrenia, “Just the Facts”. 4. Clinical features and concept. **Schizophrenia Research**, 110, 1–23, 2009.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KAUR, M.; KAUR, G.; KAUR, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, 1(1): 98–106, 2011.

TUNÇ, I.; SAKINKAYA. Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 86, 1998.

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.

WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. London: Academic Press: Nova Iorque, p. 31-96, 1983.

WATT, P.M.; BRAYER-BRANDWIJK, M.C. **The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa**, 2nd ed. E&S Livingstone ed., Edinburgh, 1457 pp., 1962.

ZAPATA, N.; BUDIA, F.; VINUELA, E.; MEDINA, P. Antifeedant and growth inhibitory effects of extracts and drimanes of *Drimys winteri* stem bark against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 119-125, 2009.

ZAPATA, N.; VARGAS, M.; MEDINA, P.; VIÑUELA, E.; BENJAMIN RODRIGUEZ, B.; FERERES, A. The activity of a selected extract of *Drimys winteri* bark and polygodial on settling and probing behavior of the lettuce aphid *Nasonovia ribisnigri*. **Phytoparasitica**, v. 38, p. 191-199, 2010.

## CAPÍTULO 2

### **A Toxicidade do Extrato de Sementes de *Azadirachta indica* A. Juss no Desenvolvimento, Sobrevivência e Crescimento de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) e seu potencial uso no controle desta praga dos citros**

#### **Resumo**

A toxicidade da nanoformulação de nim L5-3 para o afídeo *Toxoptera citricidus*, atualmente uma das principais pragas das culturas de citros em todo mundo, foi avaliada em laboratório por meio de testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes de toxicidade aguda mostraram que a  $CL_{50}$  após 48h foi de 1,92  $\mu\text{g/mL}$ . A exposição em longo prazo ao nim na concentração de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a sobrevivência do estágio ninfal para 35% daquela do controle, diminuiu a duração da fase adulta e conseqüentemente do período reprodutivo. Foi observada uma diminuição média de oito dias na duração do ciclo de vida para os insetos tratados com o extrato, o que resultou numa longevidade de  $20,0 \pm 1,34$  dias, muito menor que a do controle que foi de  $28,60 \pm 1,55$  dias. Este bioinseticida afetou a taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) de  $52,75 \pm 2,71$  para  $7,38 \pm 0,24$  dias e a taxa finita de crescimento populacional ( $\lambda$ ) de  $1,28 \pm 0,06$  fêmeas/dia para  $1,14 \pm 0,0028$  fêmeas/dia. A capacidade inata de aumentar em número ( $r_m$ ) para a população exposta ao extrato foi inferior à do controle,  $0,13 \pm 0,002$  e  $0,25 \pm 0,01$ , respectivamente. O tempo necessário para a população duplicar (TD) foi superior no tratamento com o bioinseticida,  $2,76 \pm 0,14$  dias, comparado ao controle, que foi de  $5,21 \pm 0,09$  dias. O presente estudo indica que em concentrações baixas o óleo de nim Nano L5-3 pode reduzir as taxas de sobrevivência e longevidade de ninfas e adultos de *T. citricidus*, assim como a fecundidade dos adultos, podendo, portanto ser utilizado com sucesso para controle desta praga.

**Palavras-chave:** *Toxoptera citricidus*, nim, nanoformulação.

## 1. Introdução

*Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) é um dos principais afídeos encontrados colonizando plantas cítricas no Brasil (ILHARCO & SOUSA-SILVA, 2009), ocasionando danos diretos pela sucção contínua da seiva da planta, acarretando o encarquilhando e atrofia de folhas e ramos novos, e/ou danos indiretos através da transmissão de vírus fitopatogênicos, como o vírus da tristeza dos *Citrus* (GRANT & COSTA, 1951; GALLO et al., 2002). *T. citricidus* ocasiona severo comprometimento das taxas fotossintéticas e respiratórias da planta devido à ação da fumagina (PARRA et al., 2003), tornando-se um fator altamente limitante à produtividade dessa cultura.

Tradicionalmente, os inseticidas sintéticos são os mais utilizados no controle de pragas, no entanto, podem contaminar os alimentos, o meio ambiente e causar danos à saúde humana. A contaminação química por pesticidas associada aos processos produtivos agrícolas é considerado um dos mais complexos problemas de saúde pública e ambiental no país (PERES, 2009; CASTRO NETO et al., 2010), devido ao uso excessivo e inadequado dos defensivos agrícolas.

Como controle alternativo existe a possibilidade de utilização de produtos vegetais com atividade inseticida, que podem interferir no metabolismo dos organismos-praga exercendo controle populacional ou causando-lhes inclusive a morte (MACHADO et al., 2007). A utilização desses compostos, no Brasil, apresenta um grande potencial devido à megadiversidade de sua flora. Nesse sentido, desenvolver ensaios, isolar, caracterizar e finalmente sintetizar ou biossintetizar compostos de origem vegetal é de extrema importância para o controle de insetos tornando-se uma alternativa com grande viabilidade (SHAPIRO, 1991).

Uma das plantas atualmente mais estudadas em todo o mundo é o nim, *Azadirachta indica* (MARTINEZ, 2002). Essa planta apresenta boa adaptação às condições climáticas do Brasil e exibe elevada eficácia contra importantes pragas na agricultura (VIANA & PRATES, 2003). É perene, não necessita ser destruída para obtenção dos extratos, tem alto teor de compostos ativos solúveis em água e de fácil extração com baixo custo, e tem aprovação mundial para uso em cultivos orgânicos (MARTINEZ, 2002).

A azadirachtina é o principal composto do nim com ação sobre os insetos. Este composto é um tetranotriterpenóide (limonóide), solúvel em água e em álcool, e

sensível aos raios ultravioleta. Por apresentar rápida biodegradação, cerca de 20 dias, este composto apresenta baixo risco de contaminação ambiental (MARTINEZ, 2002). Produtos à base de nim apresentam ação fagodeterrente e hormonal (GALLO et al., 2002)

A persistência relativamente curta dos princípios ativos presentes nos extratos de nim, a baixa estabilidade e a concentração insuficiente dos ingredientes ativos nos extratos vegetais podem ser considerados como desvantagens no uso do nim pelos agricultores. Atualmente, essas desvantagens já podem ser solucionadas com o uso da nanotecnologia, que possibilitou o desenvolvimento de partículas agrotóxicas mais estáveis e que atuam com maior eficácia sobre organismos alvo. Esse processo permite a produção de um insumo ambientalmente correto e reduz o número de pulverizações com inseticidas químicos (FERREIRA et al., 2012).

A magnitude dos efeitos toxicológicos dos bioinseticidas depende da dose do produto a ser utilizada, do tipo de contato do produto com o organismo e do próprio organismo a ser tratado. De maneira geral esses efeitos são estudados mediante avaliação da concentração letal para 50% dos indivíduos, a  $CL_{50}$ , e para 99% da população tratada,  $CL_{99}$  (STARK & BANKS, 2003), mas no caso dos insetos a tabela de vida ou a taxa instantânea de crescimento são respostas mais adequadas para a avaliação do efeito total (letais e subletais) uma vez que alguns efeitos podem aparecer semanas e até meses após o período de contato com os compostos tóxicos, sendo, portanto, mais difíceis de serem identificados (PERES & MOREIRA, 2003).

Os efeitos subletais sobre as espécies alvo podem favorecer a ocorrência de pragas quando o inseticida induz a hormese, que pode ser caracterizada como um comportamento bifásico de dose-resposta (CALABRESE & BALDWIN, 2002), onde determinado composto químico tem uma resposta estimulante em baixas doses e outra resposta tóxica em doses elevadas (MAGALHÃES et al., 2002). A primeira resposta pode ser o resultado da alteração da homeostase animal levando às mudanças em seus processos ecofisiológicos básicos. O interesse crescente no uso de inseticidas naturais como o extrato da semente do nim no controle de pragas tem incentivado o estudo dos possíveis efeitos subletais deste composto.

Atualmente são inexistentes trabalhos utilizando nanoformulações de óleo de nim no controle de afídeos. Dessa maneira o presente ensaio teve por objetivo avaliar a influência da nanoformulação de nim L5-3 sobre o desenvolvimento, sobrevivência e crescimento de *T. citricidus*, em condições de laboratório, formulando-se a hipótese de

que em concentrações bastantes baixas este nanocomposto exerce efeito deletério sobre a população deste inseto, permitindo o seu controle em níveis populacionais baixos, com o mínimo de efeitos adversos à produtividade das plantações cítricas.

## 2. Material e Métodos

Os experimentos relativos ao ciclo de vida e à avaliação de toxicidade do extrato das sementes de nim foram realizados em câmara incubadora, com temperatura controlada de  $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

Adultos de *Toxoptera citricidus* foram coletados em plantas de *Citrus limonia* no município de São Carlos. Foram mantidos em ramos do mesmo hospedeiro, individualizados em eppendorfs contendo água. O conjunto foi protegido por um cilindro de vidro de 15 cm de altura e 10 cm de diâmetro (recipiente-teste), com uma das extremidades vedada com tecido voil. Ninfas recém nascidas (com menos de 24 horas) foram utilizadas como organismos-teste nos bioensaios.

A solução estoque de nanopartículas do óleo de *Azadirachta indica* foi preparada por meio do processo de emulsão-difusão, em que o polímero foi dissolvido em 200,0 mL de acetona em agitação constante na temperatura de  $45^\circ\text{C}$ . Ao óleo de nim enriquecido com azadirachtina foram adicionados 200,0 mL de água, sendo em seguida emulsificado com Ultra-Turrax T10 IKA. O polímero (EHL Tween 80) solubilizado em acetona foi vertido em um Becker contendo a água com a fase orgânica, com o auxílio de uma bomba peristáltica na vazão de 10 mL/min., sob agitação constante. Após 10 minutos, o agente emulsificante de alto Equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) Tween 80 dissolvido em água foi adicionado ao sistema contendo a fase orgânica com o polímero, formando as nanopartículas. Em seguida, o solvente orgânico (Acetona) e parte da água foram removidos por evaporação sob pressão reduzida para se obter uma suspensão concentrada, com volume final de 150,0 mL.

Para avaliação da toxicidade aguda da formulação de óleo de nim Nano L5-3 sobre os afídeos, foram testadas cinco concentrações: 100,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e 0,01  $\mu\text{g/mL}$ . Estas concentrações foram definidas por meio da realização de testes preliminares de toxicidade, onde foram determinadas a menor concentração em que 100% dos organismos-teste morreram (CEO) e a maior concentração na qual 100% dos organismos-teste sobreviveram (CENO). O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos e dez repetições com cinco ninfas em cada uma. Para cada repetição 1 mL do extrato foi pulverizado apenas sobre os insetos, que em seguida foram transferidos para os recipientes-teste. Os dados de mortalidade foram obtidos após 24 e 48h da aplicação do extrato.

Para a avaliação da toxicidade crônica deste mesmo extrato foi testada apenas uma concentração, aquela que no teste de toxicidade aguda não causou mortalidade. Foram estabelecidas 20 repetições para o tratamento com a aplicação de 1 mL do extrato na concentração de 0,01 µg /mL de nim dissolvido em água realizando-se uma pulverização a cada 5 dias. O desenvolvimento desses afídeos foi acompanhado diariamente, para o registro dos seguintes parâmetros: duração do período ninfal; viabilidade ninfal, duração dos períodos pré-reprodutivo, reprodutivo e pós-reprodutivo; duração da fase adulta; produção média de ninfas/fêmea/dia; produção total de ninfas/fêmea e longevidade. O número e a duração dos instares ninfais foram determinados pela observação e coleta das exúvias. Para o registro da produção diária de ninfas, estas eram contadas e retiradas do hospedeiro.

### **Análise estatística**

Os dados de mortalidade nos testes de toxicidade aguda, após 24 e 48 horas de exposição ao óleo, foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene). Como essas duas pressuposições foram atendidas foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, procedeu-se à regressão linear ou quadrática para comparar o efeito das diferentes concentrações. O ajuste do modelo foi testado a 0,05% de significância e avaliado pelo seu coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A  $CL_{50}$  foi estimada pela análise de Probit (FINNEY, 1971), com o auxílio do programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987).

As tabelas de vida foram construídas de acordo com Price (1984) e Krebs (1994), com os seguintes parâmetros: taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), intervalo de tempo entre cada geração (T), capacidade inata de aumentar em número (rm), razão finita de aumento ( $\lambda$ ) e tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos (TD), sendo:

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

$$T = [\sum x l_x m_x] / [\sum l_x m_x]$$

$$r_m = \ln R_0 / T$$

$$\lambda = N_{t+1} / N_t$$

$$TD = \ln(2) / r_m$$

onde:  $l_x$  é a probabilidade do inseto estar vivo em determinada faixa etária;  $m_x$  corresponde aos descendentes fêmeas produzidos em determinada faixa etária;  $N_{t+1}$  é o número final de indivíduos e  $N_t$  é o número inicial de indivíduos (MAIA et al., 2000).

Os dados da duração dos instares foram submetidos ao teste de normalidade seguido pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa Sisvar® (FERREIRA, 2003).

As curvas de crescimento foram ajustadas utilizando-se a equação de Von Bertalanffy (1938) (os parâmetros foram determinados pela utilização da transformação Ford-Walford):  $L_t = L_\infty [1 - e^{-K(t-t_0)}]$ , onde:  $L_t$  = comprimento em um determinado tempo  $t$ , expresso em mm;  $L_\infty$  = comprimento máximo que, em média, os indivíduos podem atingir e para o qual a curva tende assintoticamente, expresso em mm;  $K$  = constante relacionada com a taxa de crescimento;  $e$  = base de logaritmo neperiano;  $t_0$  = parâmetro relacionado com o  $L_t$  médio dos indivíduos no instante do nascimento ( $L_0$ ), expresso em dias.

### 3. Resultados e Discussão

Os testes de toxicidade aguda realizados no presente estudo resultaram em uma  $CL_{50}$  48h de 1,92  $\mu\text{g/mL}$  (IC 95%: 1,19 - 3,22) para o extrato de nim Nano L5-3.

Lowery & Isman (1994) aplicando óleo de semente de nim em ninfas de segundo estágio de nove espécies de afídeos verificaram uma  $CL_{50}$  de azadirachtina variando de 2,4  $\mu\text{g/L}$  para *Myzus persicae* (Sulzer) se alimentando da seiva da pimenteira, a 635,0  $\mu\text{g/L}$  para *Chaetosiphon fragaefolii* (Cockerell), em morango.

Nos testes para a avaliação da toxicidade crônica, utilizando-se o extrato de nim Nano L5-3, na concentração de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , aplicado sobre as ninfas de *T. citricidus*, a duração média do período ninfal do grupo controle foi de  $7,85 \pm 0,2$  dias, com mínimo de



seis e máximo de nove dias, enquanto nas ninfas tratadas com o extrato foi de  $10,57 \pm 0,50$  dias, com no mínimo dez e máximo de doze dias, diferindo significativamente ( $P = 0,00001$ ) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Valores médios de duração das fases de desenvolvimento (em dias) e viabilidade (sobrevivência em %) das ninfas de *Toxoptera citricidus* em ramos de *Citrus limonia* quando pulverizadas com extrato das sementes de nim, *Azadirachta indica*, mantidas sob temperatura de  $20 \pm 0,5$  °C e fotoperíodo de 12 h.

Estádio ninfal	Controle		Extrato nim	
	Duração média(dias)	Viabilidade (%)	Duração média (dias)	Viabilidade (%)
1°	2,75±0,17 Ba	100	3,14±0,38 Ba	80
2°	1,50±0,18 Aa	100	2,29±0,49 Abc	62,5
3°	1,50±0,11 Aa	100	2,14±0,38 Ab	70
4°	2,10±0,12 Ba	100	3,00±0,58 Bb	100
Período Ninfal	7,85±0,2 Ca	100	10,57±0,50 Cb	35

Média ± Desvio Padrão, Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A sobrevivência da fase ninfal no controle foi de 100% enquanto no tratamento com nim foi de 35%. A duração média das ninfas tratadas com nim foi superior ao do grupo controle em todos os estágios. Nas ninfas do quarto ínstar, tratadas, a duração média foi de  $3,0 \pm 0,58$  dias e, no grupo controle, de  $2,10 \pm 0,12$  dias. (Tabela 2.1).

O período pré-reprodutivo após atingir a fase adulta foi de  $1,40 \pm 0,40$  dias nos afídeos tratados, e de  $1,41 \pm 0,15$  dias no controle, não havendo, portanto diferença estatística significativa entre eles. O período reprodutivo foi iniciado, em média, entre o 1° e 2° dia da fase adulta nos dois tratamentos (Tabela 2.2). Embora o tempo para o afídeo atingir o período reprodutivo seja semelhante, o tratamento dos afídeos com o extrato de nim reduziu a fecundidade total e aumentou a mortalidade dos afídeos.

Tabela 2.2. Parâmetros biológicos (Média ± DP) de *Toxoptera citricidus* sobre *Citrus limonia* em condições controle e quando pulverizadas com extrato de sementes de *Azadirachta indica*. Temperatura constante de 20 ± 0,5 °C e fotoperíodo de 12 h.

<b>Parâmetros Biológicos</b>	<b>Controle</b>	<b>Extrato Nim</b>
Período Pré-reprodutivo (dias)	1,41±0,15a	1,40 ± 0,40a
Período reprodutivo (dias)	17,30±1,39a	7,14 ± 1,14b
Período Pós-reprodutivo (dias)	2,50±0,53a	2,25 ± 0,25a
Duração da fase adulta (dias)	20,75±1,51a	9,43 ± 1,34b
Total de ninfas/fêmea	57,20±4,02a	23,14 ± 4,52b
Ninfas/fêmea/dia	3,31±0,23a	3,24 ± 0,63a
Longevidade (dias)	28,60±1,55a	20,0 ± 1,34b

Média ± Desvio Padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com Hayakawa et al. (1990) como os afídeos apresentam alta taxa de mortalidade causada por fatores ambientais, é vantajoso que iniciem a reprodução logo ao entrar na fase adulta. Para Minks & Harrewijn (1987) o início da reprodução em afídeos indica a aceitação da planta como hospedeira, uma vez que podem até se alimentar em plantas com baixa qualidade nutricional, mas não se reproduzem. No entanto, embora o tempo para o afídeo atingir o período reprodutivo seja semelhante, o extrato reduziu o período reprodutivo em dez dias, resultando assim na redução da fecundidade total. Não houve diferença estatística na duração do período pós-reprodutivo.

A duração média de indivíduos de *T. citricidus* na fase adulta pulverizados com o extrato foi de 9,43±1,34 dias, com mínimo de quatro e máximo de doze dias. A esperança de vida (ex) foi mais alta nos três primeiros dias, e então os valores flutuaram com tendência descendente, até a morte do inseto (Figura 2.1).

Para os exemplares do tratamento controle, verificou-se que a duração média da fase adulta foi 20,75±1,51 dias, com mínimo de onze e máximo de trinta dias. O maior valor para ex foi observado nos 20 primeiros dias e a queda dos valores ocorreu gradualmente até a morte do inseto (Figura 2.1).

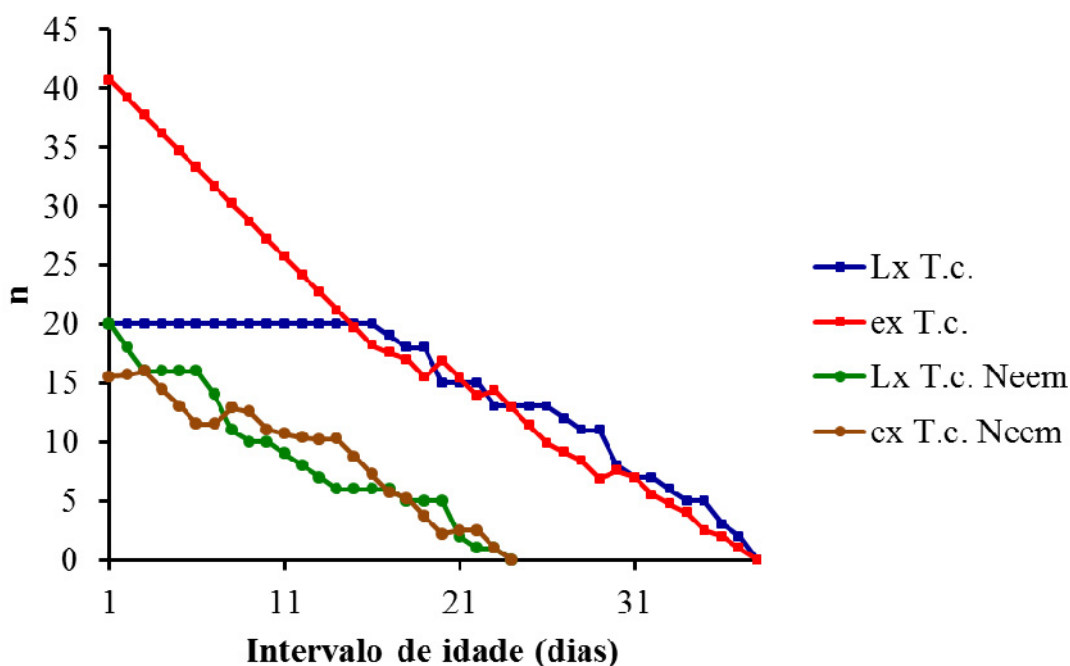


Figura 2.1. Relação entre a sobrevivência (Lx) e esperança de vida (ex) de *Toxoptera citricidus* em ramos de *Citrus limonia* e quando pulverizados com óleo de nim Nano L5-3. Temperatura de  $20 \pm 0,5$  °C, e fotoperíodo de 12h. n: números de indivíduos.

Os resultados mostram ainda que os adultos de *T. citricidus* mantiveram uma fecundidade diária semelhante à do controle como resposta à aplicação do bioinseticida. Embora em sete repetições tratadas com o extrato tenham desenvolvido as fases jovens, a duração do período reprodutivo foi dez dias mais curta, originando um número menor de descendentes, possivelmente devido ao rápido efeito letal do produto sobre os adultos, o que indica que o nim é eficaz no controle da praga em estudo,  $23,14 \pm 4,52$  ninfas/fêmea e o número de ninfas/fêmea/dia  $3,24 \pm 0,63$  (Figura 2.2).

Ensaio laboratoriais e de campo com inseticidas à base de nim, efetivamente controlaram várias espécies de afídeos, (LOWERY et al., 1993;. LOWERY & ISMAN, 1994; SCHMUTTERER & SINGH, 1995; KOUL et al., 1997;. KOUL, 1998, 1999), tendo sido tão eficazes quanto os inseticidas químicos (LOWERY & ISMAN, 1994).

No grupo controle a fecundidade total foi de  $57,20 \pm 4,02$  ninfas/fêmea e o número de ninfas/fêmea/dia  $3,31 \pm 0,23$ . Komazaki (1982) observou para a mesma espécie de afídeo uma fecundidade de 58,46 ninfas/fêmea. Galatoire (1983) também avaliou as características reprodutivas do *T. citricidus* e verificou maior fecundidade média por fêmea por dia (5 a 6 ninfas), a fecundidade total variou entre 73 e 81 ninfas/fêmeas.

Efeitos adversos significativos do extrato do nim comercialmente disponível (Neemix. 4.5, 4.5% azadirachtin, AZ) já foram anteriormente registrados sobre *T. citricidus*. Segundo Tang et al., (2002) quando pequenas mudas cítricas foram mergulhadas em extrato de nim nas concentrações de 0,4 a 0,025% de vol: vol (180, 90, 45, 22, e 11 µg/L de azadirachtina), 0-8% de ninfas e 0-17.5% dos adultos sobreviveram até 7 dias após o tratamento. O extrato reduziu o desenvolvimento de ninfas, a longevidade de ninfas e adultos e a fecundidade de adultos em todas as concentrações testadas.

Através do gráfico de fertilidade da população é possível observar que a maior fertilidade específica (mx) nos insetos tratados com o nim ocorreu no décimo sétimo dia, 3,21 ninfas/fêmeas, e que a produção de ninfas flutuou ao longo do período reprodutivo. No controle observou-se que os valores de (mx) foram superiores aos observados no tratamento com o bioinseticida, com a maior fertilidade específica no intervalo de idade do décimo segundo dia, 5,03 ninfas/fêmeas. Posteriormente, observou-se uma queda gradual na fertilidade do *T. citricidus* até quase o final da sua vida (Figura 2.2).

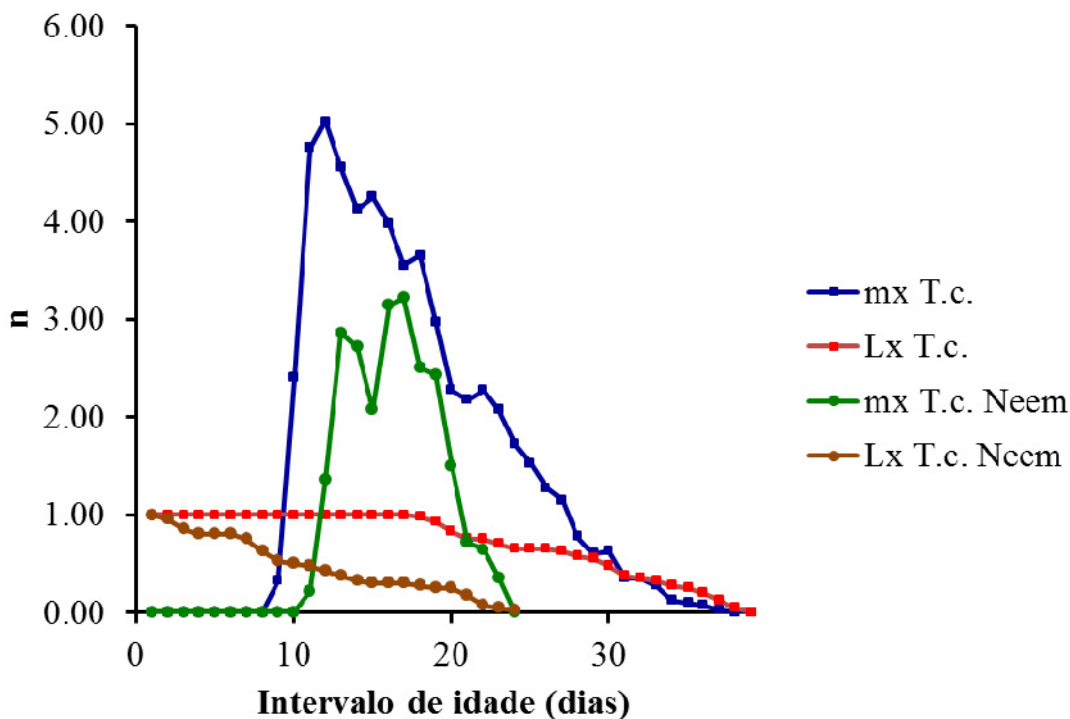


Figura 2.2. Probabilidade de sobrevivência (Lx) e fertilidade específica (mx) de *Toxoptera citricidus*, mantidas em ramos de *Citrus limonia* e quando pulverizadas com óleo de nim Nano L5-3. Temperatura de  $20 \pm 0,5$  °C, com um fotoperíodo de 12 h. n: números de indivíduos.

Neste trabalho observou-se uma diminuição da longevidade para os afídeos tratados com nim em relação àqueles do grupo controle em oito dias,  $20,0 \pm 1,34$  dias, mínimo de um e máximo de vinte e quatro dias e  $28,60 \pm 1,55$  dias, mínimo de dezoito e máximo de trinta e oito dias, respectivamente. Komazaki (1982) e Oirsa (2003) observaram, para a mesma espécie de afídeo, uma longevidade de 28,4 dias, semelhante a observada neste trabalho. Galatoire (1983) relatou a expectativa de vida média para fêmeas ápteras variando de 28 a 48 dias.

A taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) no grupo controle foi de  $57,75 \pm 2,71$  fêmeas, o que diferiu significativamente em relação aos insetos tratados com o nim, resultando em  $7,38 \pm 0,24$  fêmeas (Tabela 2.3), o menor valor de  $R_0$  encontrado deve-se, principalmente, ao maior decréscimo de sobrevivência de *T. citricidus* causados no tratamento com o bioinseticida.

Tabela 2.3. Parâmetros da tabela de vida do afídeo *Toxoptera citricidus* sobre *Citrus limonia* quando pulverizados com extrato das sementes de *Azadirahcta indica*, mantidos a  $20 \pm 0,5$  °C, fotoperíodo de 12 h.

Parâmetros	Controle	Extrato Nim
$R_0$	$57,75 \pm 2,711$	$7,38 \pm 0,244$
T	$15,79 \pm 0,810$	$15,04 \pm 0,064$
$r_m$	$0,25 \pm 0,012$	$0,13 \pm 0,002$
$\lambda$	$1,28 \pm 0,065$	$1,14 \pm 0,002$
TD	$2,76 \pm 0,141$	$5,21 \pm 0,094$

$R_0$ : Taxa Líquida de Reprodução (número total de ninfas produzidas); T: Intervalo de Tempo entre cada geração (dias);  $r_m$ : Taxa intrínseca de aumento natural;  $\lambda$ : Razão finita de aumento; TD: Tempo para a população duplicar em números de indivíduos (dias).

A duração média da geração (T) encontrada para a população submetida à exposição ao nim foi de  $15,04 \pm 0,06$  dias, semelhante ao controle, que foi de  $15,79 \pm 0,81$  dias. Os resultados observados permitem estimar que a população de *T. citricidus* tratada com o bioinsetícida, em aproximadamente 15 dias, tem capacidade para aumentar cerca de sete vezes a sua população (valor de  $R_0$ ). No grupo controle, para o mesmo período, ela poderia aumentar 57 vezes a sua população.

A capacidade intrínseca de aumento natural em número ( $r_m$ ) foi positiva para os dois tratamentos, indicando crescimento populacional. No entanto, para a população tratada com o extrato o  $r_m$  foi significativamente inferior ao controle,  $0,13 \pm 0,002$ , ou seja, foi adicionado apenas 0,13 fêmea/fêmea/dia à população (Tabela 2.3). Segundo Birch (1948) quanto maior o valor de ( $r_m$ ) mais bem sucedida será a espécie em um determinado ambiente. Pedigo e Zeiss (1996) consideram ainda a taxa intrínseca de aumento populacional ( $r_m$ ) o principal dado que se obtém em uma tabela de vida de fertilidade. Para Guldmond et al. (1998) a razão de crescimento da população de uma espécie praga é um fator importante em um programa de manejo integrado de pragas, pois permite fazer previsões sobre futuros aumentos populacionais.

A taxa finita de crescimento populacional ( $\lambda$ ) ou o fator de multiplicação da população de *T. citricidus* original, a cada intervalo unitário de tempo, foi de  $1,28 \pm 0,06$  fêmeas/dia no controle e de  $1,14 \pm 0,002$  fêmeas/dia para a população tratada com o nim.

O tempo necessário para a população duplicar em número (TD), foi de  $2,76 \pm 0,14$  dias naquela tratada com o bioinseticida, superior ao do controle, que foi de  $5,21 \pm 0,09$  dias (Tabela 2.3).

As curvas de crescimento para a população de *T. citricidus* submetida à toxicidade crônica pelo nim estão representadas na Figura 2.3. Essas curvas podem ser descritas por uma função logística, com um rápido crescimento exponencial, seguido por uma redução na taxa de crescimento, aumentando lentamente até aproximar-se do máximo assintótico.

Foram observadas diferenças entre o comprimento máximo corpóreo nos afídeos do controle ( $215 \mu\text{m}$ ) quando comparados aos comprimentos máximos corpóreos dos indivíduos expostos ao bioinseticida ( $200 \mu\text{m}$ ). Houve uma diminuição do tamanho máximo corpóreo do *T. citricidus* quando este foi exposto à concentração de  $0,01 \mu\text{g/mL}$  do extrato de nim Nano L5-3.

O nim é por excelência um regulador de crescimento sendo amplamente estudado para o controle de várias espécies-praga. Quando aplicada em indivíduos jovens, provoca inibição de crescimento e má-formação corporal (SCHMUTTERER, 1990, 1997; SABILLON & BUSTAMANTE, 1995; MORDUE & BLACKWELL, 1993). A azadarachtina provoca uma desordem hormonal em diferentes etapas de desenvolvimento nos insetos, bloqueando a síntese e liberação de ecdisteróides pela glândula protorácica, levando à ecdise incompleta em insetos imaturos (KOLLIEN & SCHAUB, 1999; ISMAN, 2006), sendo o isômero AZ-E o mais efetivo regulador de crescimento de insetos (SCHMUTTERER, 1990).

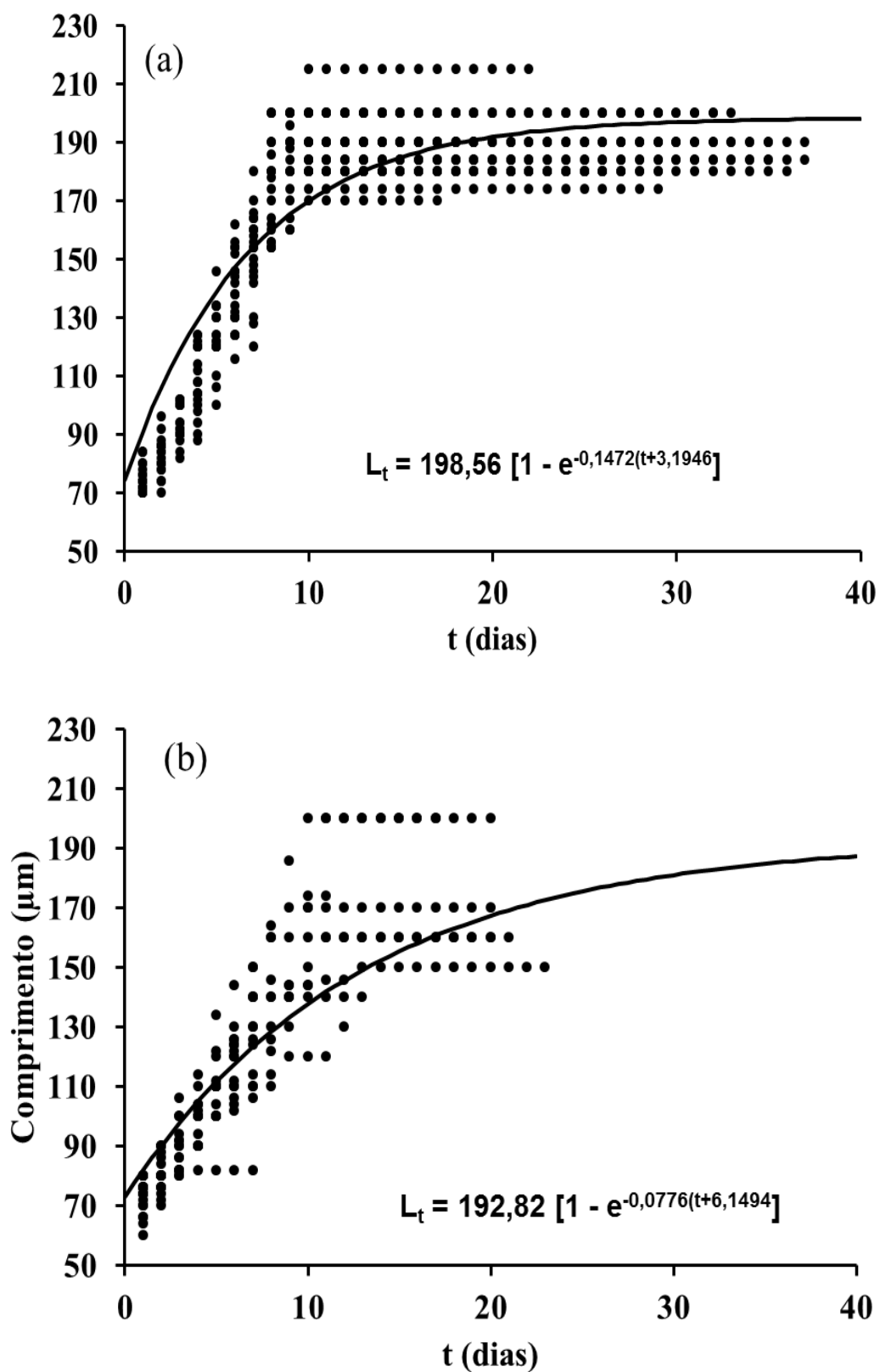


Figura 2.3. Curva de crescimento individual do afídeo *Toxoptera citricidus*. a) grupo controle; b) exemplares submetidos à exposição crônica de nim Nano L5-3 0,01 µg/mL.



Produtos derivados do nim, praticamente não apresentam toxicidade ao homem e são rapidamente degradados no solo e nas plantas (ISMAN, 2006). Com relação aos inimigos naturais os efeitos são variáveis, mas de maneira geral são menos suscetíveis ao nim do que os insetos fitófagos devido, principalmente, ao seu modo de ação (SCHMUTTERER, 1997; AKOL et al., 2002).

No presente trabalho observou-se que, em concentrações baixas, o óleo de nim Nano L5-3 reduziu as taxas de sobrevivência e longevidade de ninfas e adultos de *T. citricidus*, assim como a fecundidade dos adultos.

Estudos populacionais em campo são agora requeridos para determinar o potencial uso em larga escala, com delineamentos experimentais que permitam quantificar a redução populacional de *T. citricidus* tratada com este nanocomposto, à diminuição dos danos às plantas e o restabelecimento da produtividade dos pomares de plantas cítricas.

#### **4. Conclusão**

Concentrações muito baixas de nanopartículas de óleo de nim Nano L5-3 na concentração de 0,01µg/mL (10 nanogramas) causa toxicidade ao afídeo *Toxoptera citridus*, reduzindo significativamente as taxas de sobrevivência e longevidade de ninfas e adultos de *T. citricidus*, assim como a fecundidade dos adultos. A nanotecnologia aplicada à preparação do extrato da planta *Azadirachta indica* tem elevado potencial de uso para o controle do *T. citricidus* em plantações de citros.

#### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas.

## Referências Bibliográficas

AKOL, A.M.; SITHANANTHAM, S.; NJAGI, P.G.N.; VARELA, A.; MUEKE, J.M. Relative safety of sprays of two neem insecticides to *Diadegma mollipla* (Holmgren), a parasitoid of the diamondback moth: effects on adult longevity and foraging behavior. **Crop Protection**, v.21, p.853-859, 2002.

BIRCH L. C. The intrinsic rate of natural increase of on insect population. **Journal Animal Ecology**, 17: 15-26, 1948.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defining hormesis. **Human & Experimental Toxicology**, 21, 91-97, 2002.

CASTRO NETO, N.; DENUZI, V.S.S.; RINALDI, R.N. E STADUTO, J.A.R. Produção orgânica: uma potencialidade estratégia para a agricultura familiar. **Revista Percurso**, v. 2, n. 2, p. 73-95, 2010.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: versão 4.2. Lavras: UFLA, 2003.

FERREIRA, F. T. R. VENDRAMIM, J. D. FORIM, M. R. Bioatividade de nanoformulações de nim sobre a traça-do-tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1347-1353, 2012.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**, 3rd., S. Chand & Company Ltd, New Delhi, 333pp., 1971.

GALATOIRE, I. Vital statistics of *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 42, p.353-368, 1983.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p., 2002.

GRANT, T.J.; COSTA, A.S. A mild strain of the tristeza virus of citrus. **Phytopathology**, v.41, p.114-122, 1951.

GULDEMOND, J.A; VAN DEN BRINK, W.J.; DEN BELDER, E. Methods of assessing population increase in aphids and the effect of growth stage of the host plant on population growth rates. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.86, p.163-173, 1998.

HAYAKAWA, D.L.; GRAFIUS, E.; STEHR, F.W. Effects of temperature on longevity, reproduction, and development of the asparagus aphid (Homoptera: Aphididae) and the parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**, v.19, p.890-897, 1990.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

ILHARCO, F. A.; SOUSA-SILVA, C. R. *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphidoidea), the tropical citrus aphid in continental Portugal. **Revista de Agricultura** (Piracicaba), v. 84, p. 71-80, 2009.

KIRKALDY, G. W. On some peregrine Aphidae in Oahu, Honolulu. **Proc. Hawaiian Entomological Society**. v.1, p.100, 1907.

KOLLIEN, A.K. e SCHAUB, G.A. The effect of azadirachtin on *Blastocrithidia triatoma* and *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* (Insecta, Hemiptera). **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 403-414, 1999.

KOMAZAKI, S. Effects of constant temperatures on population growth of three aphid species, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Aphis citricola* van der Goot and *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) on Citrus. **Applied Entomology and Zoology**, v.17, p.75-81, 1982.

KOUL, O.; SHANKAR, J. S.; MEHTA, N.; TANEJA, S. C.; TRIPATHI, A. K.; DHAR, K. L. Bioefficacy of crude extracts of *Aglaia* species (Meliaceae) and some active fractions against lepidopteran larvae. **Journal of Applied Entomology**, 121, 245–248, 1997.

KOUL, O. Effect of neem extracts and azadirachtin on fertility and fecundity of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.). **Pesticide Research Journal**. v.10, n.2, p.258-261, 1998.

KOUL, O. Insect growth regulating and antifeedant effects of neem extracts and azadirachtin on two aphid species of ornamental plants. **Journal Biosciences**, 24:(1):85-90, 1999.

KREBS, C.J. **Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance**. 4. ed. New York, Harper Collins College Publishers, 801p., 1994.

LEORA SOFTWARE. **POLO PC: probit or logit analysis [computer program]**. Berkeley (Calif); LeOra Software; 1987.

LOWERY, D.T.; ISMAN, M. B. Insect growth regulating effects of neem extract and azadirachtin on aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 72: 77-74. 1994.

LOWERY, D.T.; ISMAN, M.B.; BRARD, N.L. Laboratory and field evaluation of neem for the control of aphids (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.864-870, 1993.

LOWERY DT; ISMAN MB. Insect growth regulating effects of neem extract and azadirachtin on aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 72: 77-74, 1994.

MACHADO, L. A.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, M. M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em Horticultura, **Biológico**, v.69, n.2, p.103-106, 2007.

MAGALHÃES, L. C.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; TUELHER, E. S. Desenvolvimento e reprodução do predador *Podisus distinctus* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae) frente a doses subletais de permetrina. **Crop Protection**, 31, 445-448, 2002.

MAIA, H. N. M.; LUIZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, 93: 511-518, 2000.

MARTINEZ, S. S. Composição do nim. In: Martinez, S.S. **O Nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p. 23-30, 2002.

MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. **Aphids: their biology, natural enemies and control**. Vol. A., World Crop Pests, 2A . Elsevier, New York, 450 p., 1987.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; BLACKWELL, A. Azadiractin: na update. **Journal of insect Physiology**, London, v.39, n. 11, p. 903-924, 1993.

OIRSA- República de China. **Áfidos associados AL cultivo de cítricos em El Salvador. Proyecto regional de fortalecimiento de La vigilância fitossanitária em cultivos de exportación no tradicional**. Disponível em: [HTTP://www.oirsa.gov/publicaciones](http://www.oirsa.gov/publicaciones). 2003.

PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N. de; PINTO, A. de S. Ácaros. In: **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos dos citros**. Piracicaba: A.S. Pinto.140 p., 2003.

PEDIGO, L. P.; ZEISS, M. R. **Analyses in insect ecology and management**. Ames, Iowa State University. 1996.

PERES, F. Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. **Ciência & Saúde coletiva**, v. 14, n. 6, p. 1995-2004, 2009.

PERES, F; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PRICE, P. W. **Insect ecology**. New York, John Wiley, 2.ed., 607p., 1984.

SABILLON, A; BUSTAMANTE M. 1995. Evaluación de extractos botánicos para el control de plagas del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Ceiba**, 36: 179-187, 1995.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticide from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, 35: 271-297, 1990.

SCHMUTTERER, H., SINGH, R.P. **List of insect pests susceptible to neem products**. In: Schmutterer, H. (Ed) The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceous Plants, VCH, Weinheim, Germany, pp 326-365, 1995.

SCHMUTTERER, H. Side-effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. **Journal of Applied Entomology**, 121: 121-128, 1997.

SHAPIRO, J. P. Phytochemicals at the plant-insect interface. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 17, p. 191-200, 1991.

STARK, J. D.; BANKS, J. E. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.48, p.505-519, 2003.

TANG, Y. Q.; WEATHERSBEE, A. A.; MAYER, R. T. Effect of neem seed extract on the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) and its parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae). **Environmental Entomology**, v.31, n.2, p.172-176, 2002.

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, v. 62, p. 69-74, 2003.

VON BERTALANFFY, L. A. A quantitative theory of organic growth. **Human Biology**, 10: 181-213, 1938.

## CAPÍTULO 3

### O uso da Ressonância Magnética Nuclear na caracterização e quantificação do honeydew de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae)

#### Resumo

*Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) alimenta-se no floema das plantas e o excesso de carboidratos é excretado. Essa excreta recebe o nome de melada ou honeydew. Além de servir como substrato para o desenvolvimento de fumagina, o honeydew pode mediar interações entre insetos de diferentes níveis tróficos, incluindo as formigas. O presente trabalho teve como objetivo analisar qualitativa e quantitativamente o honeydew do afídeo *T. citricidus* por RMN <sup>1</sup>H. A elucidação estrutural do honeydew foi feita com base na análise espectral de RMN 1D e 2D e o estudo da quantificação foi realizada com a utilização de padrão externo de acordo com o método Eletronic Reference To access In vivo Concentration (ERETIC). Muitos aminoácidos fazem parte da composição do honeydew do pulgão preto dos citros, dentre eles o ácido glutâmico e a glutamina (47,04 mol/L), fenilalanina (6,96 mol/L), valina (3,06 mol/L), leucina (2,69 mol/L), treonina (2,27 mol/L), alanina (2,46 mol/L) e aminoácidos fenólicos como a fenilalanina (6,96 mol/L) e a tirosina (0,57 mol/L). Dentre os carboidratos foram encontrados a sacarose (0,29 mol/L), a  $\alpha$ -glicose (1,76 mol/L) e a beta glicose (2,99 mol/L).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxoptera citricidus*, honeydew, RMN.



## 1. Introdução

Os afídeos alimentam-se de seiva floemática de seus hospedeiros, inserindo parte do seu aparelho bucal, especificamente os estiletes mandibulares e maxilares através dos tecidos da folha, perfurando a parede dos elementos crivados do floema. A alta pressão de turgor existente na planta força a seiva através do canal alimentar do inseto (DUNFOR, 2006). O floema é rico em carboidratos, porém é pobre em aminoácidos, essenciais para o desenvolvimento desses insetos. Os afídeos filtram da seiva uma parte das substâncias nitrogenadas ingerindo-a em grande quantidade a fim de obter o teor adequado de aminoácidos (LAZZARI & ZONTA-DE-CARVALHO, 2009). O excesso de carboidratos é eliminado na forma de uma excreção denominada honeydew (PANIZZI & PARRA, 2009).

Enquanto o honeydew é um “lixo” para os afídeos, pode ser fonte de alimento para as formigas (PENTEADO, 2012). As formigas são atraídas pelo honeydew e, conseqüentemente, protegem os hemípteros dos seus inimigos naturais, podendo também atacar outros insetos fitófagos que competem pela mesma fonte de alimento dos afídeos (VALÉRIO & CECÍLIO, 2005; PENTEADO, 2012). Um dos exemplos mais conhecidos de mutualismo é a relação existente entre formigas e hemípteros como os afídeos e as cochonilhas que produzem honeydew (WAY, 1963). Em agroecossistemas, a consequência dessa relação torna-se particularmente importante para o controle biológico de pragas (PENTEADO, 2012).

Buckley (1987a, 1987b) observou que os afídeos criados na presença de formigas foram beneficiados, uma vez que tiveram melhor desempenho reprodutivo e maior crescimento da colônia. Com a remoção do honeydew na planta há uma redução do risco de mortalidade pelo ataque de fungos (STADLER & DIXON, 2005).

O pulgão dos citros, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907), é considerado a principal praga de citros no mundo (HALBERT & BROWN, 1996). Embora possa causar sérios danos à cultura diretamente pela sucção contínua da seiva dos seus hospedeiros, causando o encarquilhamento das folhas, sua maior importância se deve ao fato de ser o vetor mais eficiente do vírus da tristeza dos citros, Citrus Tristeza Clostovirus (CTV) (HALBERT & BROWN, 1996).

A determinação de um constituinte em uma matriz, como por exemplo, o honeydew, bem como seus níveis de concentrações pode ser feita pela espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que é, sem dúvida, uma ferramenta importante

para desvendar estruturas moleculares em todos os estados físicos da matéria (WINNING et al., 2008). Constitui-se em um dos principais métodos para se obter informações estruturais detalhadas de compostos orgânicos em solução. Além disso, a RMN proporciona informações adicionais para a identificação completa de possíveis novas substâncias (ALBERT, 1995).

A utilização da RMN como ferramenta de quantificação (RMNq) e até mesmo na identificação de componentes minoritários pode ser problemática devido à sua inerente baixa sensibilidade. Ademais, artifícios para ampliação da intensidade do sinal, como a utilização de fatores que afetam diretamente a sensibilidade, predita a partir da equação de distribuição de Boltzmann, a escolha de núcleos com alta receptividade e a otimização de parâmetros temporais (número de varreduras, tempo de relaxação longitudinal e tempo de relaxação transversal), auxiliam na melhora da relação sinal/ruído. Ainda assim, estudos de quantificação por RMN têm sido realizados desde a década de 50 (MULLER & GOLDENSON, 1956; HOLLIS, 1963; JUNGnickel & FORBES, 1963; RACKHAM, 1976).

Adicionalmente, o encontro entre ciência e engenharia que culmina no alcance de novas tecnologias também é importante para transpor as dificuldades experimentais inerentes à RMN. Assim a ampliação de campos magnéticos bem como sua homogeneidade, softwares modernos, sondas imersas em líquidos criogênicos (criossondas) (KEUN et al., 2002) proporcionaram um salto na sensibilidade da técnica.

Akoka et al. (1999) desenvolveram o método Eletronic REference To access In vivo Concentration (ERETIC) diante do desafio em encontrar um padrão interno que atendesse a todos os requisitos da espectroscopia de RMNq que é uma ferramenta eficiente para a quantificação relativa ou absoluta de um composto químico.

A área sob um sinal de RMNq é proporcional ao número de mols de núcleos do honeydew do *Toxoptera citricidus*, desde que o sinal seja bem quantificado ou seja, que não haja contaminação da amostra ao adicionar um padrão interno, que seja solúvel, quimicamente inerte, estável ao longo da aquisição do espectro de RMN e obtenha os sinais do padrão interno com a mínima sobreposição entre os sinais dos compostos.

Este trabalho teve como objetivo analisar qualitativa e quantitativamente o honeydew de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae) por RMN de  $^1\text{H}$ .

## 2. Material e métodos

Inicialmente adultos ápteros de *Toxoptera citricidus* foram coletados em plantas de *Citrus limonia* Osbeck no município de São Carlos, Estado de São Paulo. O material coletado foi levado ao Laboratório de Entomologia Econômica no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) para confirmação da espécie utilizando-se um microscópio estereoscópico e literatura especializada (ILHARCO & SOUSA-SILVA, 2009).

Para a obtenção do honeydew, vinte adultos de *Toxoptera citricidus* foram dispostos em ramos de *C. limonia*, individualizados em eppendorfs contendo água. O conjunto foi protegido por um cilindro de vidro de 15 de altura e 10 de diâmetro, contido por uma placa de Petri devidamente limpa (recipiente-teste). A extremidade superior do cilindro era vedada com tecido voil. Os afídeos foram deixados no recipiente teste por 48 horas para que houvesse a excreção do honeydew. As excretas foram coletadas lavando-se a placa com 5 mL de metanol grau HPLC. O metanol foi evaporado com passagem de fluxo de nitrogênio (N<sub>2</sub>) e o extrato resultante foi ressolubilizado em 150 µL de metanol deuterado para a realização dos experimentos de RMN. A placa de petri foi pesada antes e depois da excreção para obtenção da quantidade de honeydew de *T. citricidus* em mg.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III 600 (14.1 T) equipado com uma sonda criogênica tripla de 5mm TCI <sup>1</sup>H {<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N} e com gradiente na direção z, instalado no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

Para garantir a completa relaxação de todos os núcleos amostrais, a sequência de inversão recuperação foi utilizada após a calibração do pulso de 90°. Esta sequência consiste em um pulso de 180° que inverte o vetor resultante da magnetização longitudinal (T<sub>1</sub>) do eixo “z” para “-z”, seguido de um intervalo de tempo (T) onde a magnetização evolui segundo o processo de relaxação longitudinal, com um subsequente pulso de 90° para leitura do FID (*Free Induction Decay*). A amplitude dos sinais avaliados é diretamente proporcional a resultante da magnetização no eixo “z” no intervalo T. Com isso, o valor do tempo de relaxação longitudinal dos núcleos foi determinado e distribuído foi entre os tempos de AQ e d1.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi obtido utilizando uma sequência (lc1pnf2) baseada na versão 1D da NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) em que a água e o metanol são suprimidos durante o de tempo de espera entre cada aquisição d1 (2,4 s). Além disto, foram acumulados 64 espectros (NS) com 2,73 s de tempo de aquisição (AQ) e 64 k de números de pontos na aquisição (TD).

Para auxiliar na identificação dos compostos presentes no honeydew, experimentos bidimensionais foram empregados. Para se estabelecer correlações entre os hidrogênios que estão acoplados o  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  g-COSY (*CORrelation SpectroscopY*) foi empregado utilizando uma janela espectral de 12019.230 Hz, um tempo de aquisição de 0.17 s, tempo de espera entre cada aquisição de 1s e acúmulo de 16 espectros. Para obter informações dos acoplamentos heteronucleares dos carbonos e hidrogênios, foram empregados os experimentos de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Para o  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  g-HSQC foi utilizado uma janela espectral de 20,02 Hz para F2 ( $^1\text{H}$ ) e 238,88 Hz para F1 ( $^{13}\text{C}$ ) com 0,34 s de tempo de aquisição, 1s de tempo de espera entre cada aquisição e acúmulo de 64 espectros. Para o  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  g-HMBC foi utilizado uma janela espectral de 20,02 Hz para F2 ( $^1\text{H}$ ) e 238,88 Hz para F1 ( $^{13}\text{C}$ ) com 0,34 s de tempo de aquisição, 1s de tempo de espera entre cada aquisição e acúmulo de 96 espectros.

Todas as substâncias foram quantificadas pelo ERECTIC (Electronic REFERENCE To access In vivo Concentrations). Neste método, uma solução de sacarose 2,00 mmol/L em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) foi preparada para que o seu sinal característico (anomérico) fosse utilizado como uma referência externa para a quantificação. A Figura 3.3.1 mostra o espectro da sacarose o qual foi referenciado com o TMS em 0,00 ppm.

O ERETIC é baseado no princípio da reciprocidade (Equação 3.1):

$$C_{UNK} = kC_{REF} \frac{A_{UNK} T_{UNK} \theta_{90}^{UNK} n_{REF}}{A_{REF} T_{REF} \theta_{90}^{REF} n_{UNK}}$$

$C_{UNK}$  é a concentração desconhecida,  $k$  é o fator de correção,  $C_{REF}$  é a concentração de referência,  $A_{UNK}$  é área do sinal desconhecido,  $A_{REF}$  é a área do sinal de referência,  $T_{UNK}$  é a temperatura da amostra desconhecida,  $T_{REF}$  é a temperatura da amostra de referência,  $\theta_{90}^{UNK}$  é a largura do pulso magnético de  $90^\circ$  da amostra desconhecida,

$\theta_{90}^{REF}$  é a largura do pulso magnético de  $90^\circ$  da amostra de referência,  $n_{REF}$  é o número de transientes (*scans*) da amostra de referência e  $n_{UNK}$  é o número de transientes da amostra desconhecida.

O espectro de RMN-1D, foi registrado sob condições quantitativas, com a sintonia otimizada, calibração de pulso de  $90^\circ$ , tempo de aquisição de um transiente de  $5 \cdot T_1$  e maior do que  $T_2$  e relação sinal/ruído maior ou igual a 100:1 no menor e mais limpo sinal. O software TopSpin 3.0 (Bruker BioSpin) foi utilizado para aquisição e processamento dos dados.

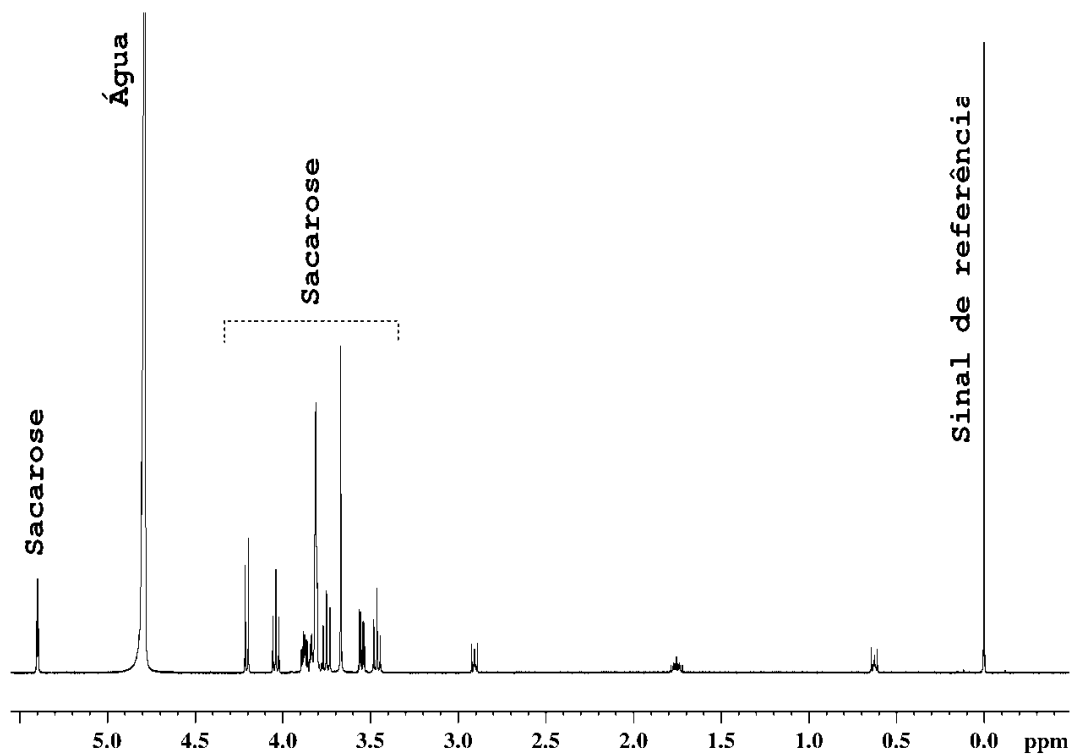


Figura 3.1. Espectro de RMN de sacarose em  $D_2O$  obtido durante o experimento de ERETIC, com o sinal de referência é colocado em 0,00 ppm.

### 3. Resultados e discussão

A quantidade de honeydew produzida por um adulto de *T. citricidus* diariamente foi de 0,00084 mg, entretanto a produção de melada é extremamente variável e a quantidade eliminada já foi estimada como sendo várias vezes o peso do corpo do inseto por hora (AUCLAIR, 1963; LARSEN et al., 1991).

A composição básica do honeydew excretado pelo *Toxoptera citricidus* está intimamente relacionada com a sua fonte de nutrientes, *Citrus limonia*. Tal fato pode ser corroborado quando se compara a composição de algumas frutas cítricas (BELTON et al., 1996; LE GALL et al., 2001; SILVA et al., 2012) e a composição do produto de excreção analisado. Segundo Stadler & Dixon (1999) a constituição do honeydew difere qualitativa e quantitativamente, conforme a espécie de afídeo, da planta hospedeira e da presença ou não de formigas.

Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto de excreção do afídeo *T. citricidus* (Figura 3.2) é perceptível à presença de três distintas regiões: a de hidrogênios aromáticos (6,0 a 9,0 ppm), a região de hidrogênios carbinólicos (3,0 a 6,0 ppm) e a região de hidrogênios carbinólicos, alílicos, de resíduos alquílicos, dentre outros (1,0 a 3,0 ppm) (LE GALL et al., 2001).

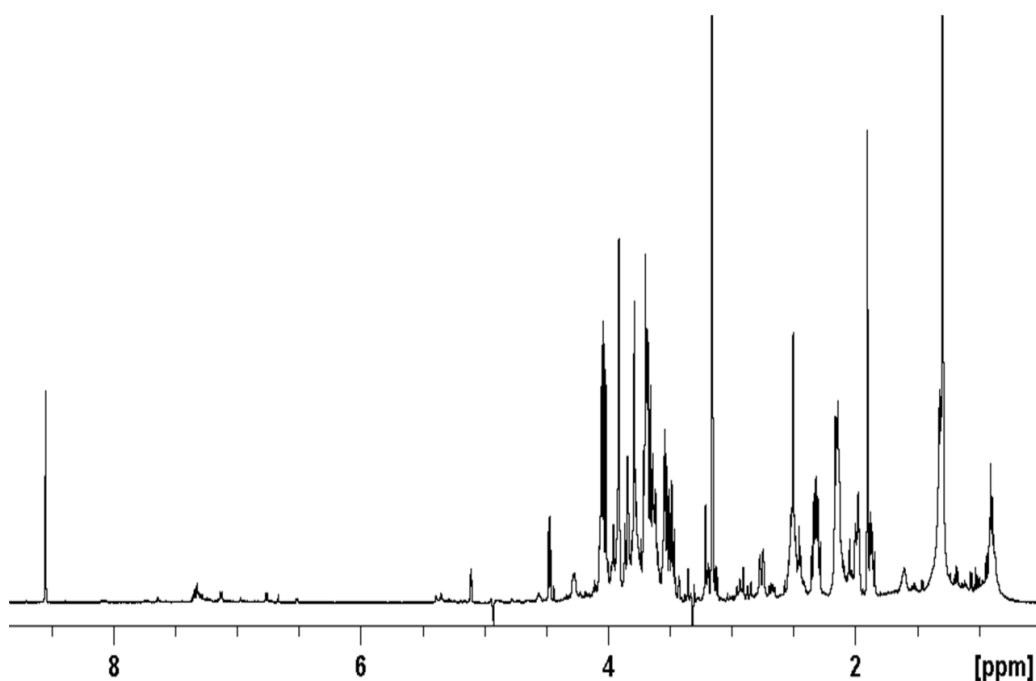


Figura 3.2. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto de excreção do afídeo *Toxoptera citricidus*.

Os deslocamentos químicos relativos ao metanol deuterado em 3,31 ppm bem como informações da literatura, permitiram a realização da atribuição de diversas substâncias químicas no honeydew. Na Figura 3.3 são apresentadas expansões das regiões de 0,8 ppm a 3,4 ppm (Fig. 3.3.3A) e 4,6 a 8,5 ppm (Fig 3.3.3B) com as respectivas atribuições.

Muitos aminoácidos fazem parte da composição do honeydew do pulgão preto dos citros, dentre eles a leucina (duplete em 0,10 e 1,86 ppm); valina (dupletos em 1,02 e 1,06 ppm); treonina (duplete em 1,46 ppm); alanina (duplete em 1,52 ppm); ácido glutâmico e glutamina com seus multipletos em 2,14 ppm, em 2,31 ppm e 2,50 ppm além dos aminoácidos fenólicos como a fenilalanina (multiplete em 7,32 ppm) e a tirosina (dois dupletos em 6,76 e 7,12 ppm). Entretanto, todos os aminoácidos encontrados têm sido observados em várias espécies de pulgões (AUCLAIR, 1963).

Além dos aminoácidos supracitados, muitas moléculas orgânicas de cadeias pequenas como ácidos, álcoois e carboidratos também foram identificados. Dentre os ácidos orgânicos tem-se o ácido láctico (duplete em 1,31 ppm); o ácido aspártico (duplos dupletos em 2,67 e 2,94 ppm); o ácido succínico em 2,90 ppm; o ácido málico (multiplete em 2,45 ppm; duplo duplete 2,75 ppm e um multiplete em 4,27 ppm) e o ácido fórmico em 8,54 ppm que deve ser oriundo da degradação do solvente deuterado, o metanol. Dentre os carboidratos, foram encontrados a sacarose (duplete em 5,40), a  $\alpha$ -glicose (duplete em 5,10 ppm) e a beta glicose (duplete em 4,47 ppm). Pode-se verificar também que resíduos de graxa foram encontrados no espectro.

A composição bioquímica do honeydew pode, em parte, explicar a relação mutualística entre afídeos e formigas (VÖLKL et al.,1999). Na melada de muitos afídeos e coccídeos já foram identificados muitos oligossacarídeos, como malto-sacarose, malto-trissacarose, melezitose, entre outros (AUCLAIR, 1963).

A melezitose, que é um trissacarídeo excretado em altas concentrações (mais de 40%) no honeydew de diversas espécies de afídeos, é provavelmente sintetizada por esses insetos e tem como função reduzir a absorção de açúcares pelo intestino (AUCLAIR, 1963). Kiss (1981) considera que a síntese e excreção desse trissacarídeo no honeydew dos afídeos têm a função evolutiva de atrair formigas nas associações mutualísticas entre esses dois organismos.

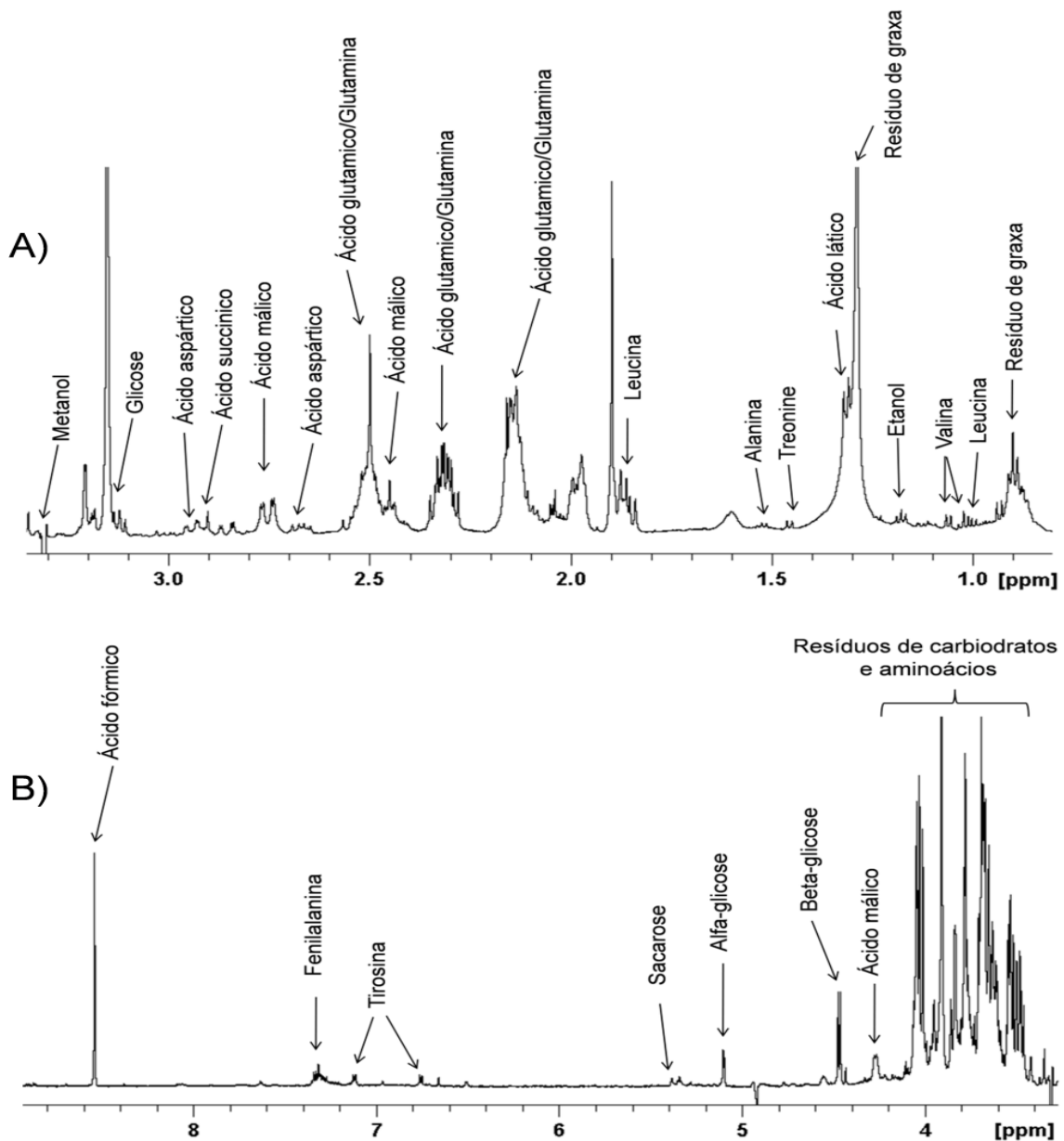


Figura 3.3. Expansões das regiões do espectro. A) 0,8 ppm a 3,4 ppm e B) 4,6 a 8,5 ppm.

As formigas alimentam-se de recursos muito diversificados, que podem ser de origem fúngica, vegetal ou animal, incluindo o honeydew (CAROLL & JANZEN, 1973) e, em função do seu hábito alimentar, podem ser separadas como herbívoras, carnívoras, detritívoras ou onívoras (FOWLER, 1991). A utilização de alimento de mais de um nível trófico é comum entre as formigas, de modo que a onivoria pode ser considerada o hábito mais comum (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Algumas vezes o honeydew pode ser a única fonte de alimento para as formigas. Como as formigas estimulam os afídeos a se alimentarem de duas a três vezes mais que o normal



e uma vez que as formigas adultas não têm necessidade de proteínas, somente de açúcares, o honeydew é um alimento perfeito para elas (OHIO STATE UNIVERSITY, 2011).

Apesar das diferenças observadas entre o aparelho digestivo das poneróides (geralmente predadoras) e a dos formicóides (geralmente associadas com afídeos), o que indica tendências em relação ao seu hábito alimentar, ambos os grupos (primitivas e avançadas) apresentam adaptações para utilizarem recursos variáveis. Um exemplo é a existência de predação em Formicinae e a presença de espécies de Myrmicinae na associação com hemípteros (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Contudo, as formigas não são sempre favoráveis aos afídeos, pois podem controlar sua população utilizando o excedente para alimentar as suas larvas (OHIO STATE UNIVERSITY, 2011).

Cada componente químico do honeydew de *T. citricidus* foi obtido com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com o seu deslocamento químico em ppm, a multiplicidade e a constante de acoplamento em Hz (Tabela 3.1). A amostra de referência foi a sacarose na concentração de 2 mmol/L com a integral igual a 1, integrando-se os demais sinais em ppm do honeydew do afídeo *T. citricidus*. O ERECTIC forneceu a concentração em mmol/L e a conversão para mol/L foi feita multiplicando-se por 1000. As diferentes concentrações dos constituintes do honeydew foram obtidas pela multiplicação da integral do componente químico pela concentração de um  $^1\text{H}$ .

Tabela 3.1. ERETIC dos compostos químicos do honeydew do afídeo *Toxoptera citricidus*.

Compostos Químicos	ERETIC						
	RMN de <sup>1</sup> H			Integral de <sup>1</sup> H		Concentração de <sup>1</sup> H (mol/L)	Integral x Conc. de <sup>1</sup> H Honeydew (mol/L)
	ppm	Multiplicidade	J (Hz)***	Ref.****	Honeydew		
Leucina	0.90	dubleto	6.74	1	1	2.69	2.69*
Valina	0.96	dubleto	7.00	1	1	3.06	3.06*
Etanol	1.08	triplete	7.05	1	2	3.21	6.42
Ácido láctico	1.21	dubleto	6.80	1	6	4.22	25.33
Treonina	1.36	dubleto	7.22	1	1	2.27	2.27*
Alanina	1.42	dubleto	6.76	1	1	2.46	2.46*
Ácido glutâmico/Glutamina	2.21	multiplete	--	1	12	3.92	47.04*
Ácido málico	2.65	duplo dubleto	3.56 e 15.82	1	4	3.45	13.79
Ácido succínico	2.80	simpleto	--	1	1	1.29	1.29
Ácido aspártico	2.84	duplo dubleto	3.26 e 16.56	1	1	3.58	3.58
Res. de carboidratos e aminoácidos	3.24 a 4.03	multiplete	--	1	132	3.73	491.85
Beta-glicose	4.37	dubleto	7.78	1	2	1.49	2.99**
Alfa-glicose	5.00	dubleto	3.68	1	1	1.76	1.76**
Sacarose	5.29	dubleto	3.50	1	1	0.29	0.29**
Tirosina	6.66	dubleto	8.48	1	1	0.57	0.57*
Fenilalanina	7.20	multiplete	--	1	2	3.48	6.96*
Ácido fórmico	8.44	simpleto	--	1	2	1.91	3.81

\* Proteínas = 65.04 mol/L; \*\* Carboidratos = 5.04 mol/L; \*\*\* J é a distância em Hz da multiplicidade;

\*\*\*\* A referência foi a sacarose que é um padrão Bruker BioSpin na concentração 2,00 mmol/L em água.

Obs.: As integrais e concentrações foram para 20 pulgões *Toxoptera citricidus* (TC).

A glutamina foi o aminoácido encontrado em maior quantidade no honeydew do pulgão preto, 47,04 mol/L. Ela pertence ao grupo dos aminoácidos essenciais, uma vez que o organismo pode sintetizá-la por todos os tecidos a partir do ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, valina e isoleucina (SMITH & WILMORE, 1990; RODWELL, 1996). É o aminoácido livre mais abundante, além de ser precursor da síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos nucléicos, açúcares aminados, proteínas e muitas outras moléculas biologicamente importantes (SMITH, 1990). Resultado semelhante foi encontrado por Byrne & Miller (1990) ao analisar a melada da mosca branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) pela técnica HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), segundo esses autores a concentração elevada de glutamina pode ser justificada por esse aminoácido ser relativamente barato energeticamente para ser produzido.

Febvay et al. (1988) observou que os principais aminoácidos de *A. pisum* cultivadas em favas são glutamina ou ácido glutâmico, asparagina, seguido do ácido aspártico. Sasaki et al. (1990) estudando o honeydew de *A. pisum* determinou pelo HPLC que a asparagina e glutamina foram os aminoácidos em maior quantidade na seiva do floema do seu hospedeiro *Vicia faba* (L.) e na melada desses insetos estéreis de 21-23 dias de idade. Entretanto, nos insetos com alta atividade reprodutora verificou-se que o teor de asparagina e glutamina, em especial a glutamina, foram consideravelmente mais baixos do que a dos insetos estéreis, sugerindo que os afídeos utilizam essas amidas de forma eficiente para a síntese de proteínas na embriogênese.

Fenilalanina foi o segundo aminoácido em maior quantidade no honeydew do *T. citricidus*, 6,96 mol/L. Hussain et al. (1974) também identificou compostos fenólicos no honeydew de *M. persicae* alimentados com rabanete.

Dentre os carboidratos, a  $\beta$ -glicose (2,99 mol/L) foi o encontrado em maior quantidade, seguido da  $\alpha$ -glicose (1,76 mol/L) e da sacarose (0,29 mol/L). A presença de sacarose é esperada, já que este é o principal açúcar em plantas e está em grande quantidade na seiva do floema (HUSSAIN et al., 1974; HAWKER, 1985). Segundo Panizze & Parra (2009) a sacarose é um requisito especial para afídeos, podendo atuar como fagoestimulante. *M. persicae* requer entre 10 e 20% desse glicídio na dieta para o crescimento, reprodução e sobrevivência ótimos (MITTLER, 1956). Para Faye & Ghorbel (1988) a presença de glicose e frutose também não é surpreendente.

Os ácidos orgânicos málico e succínico, encontrados no honeydew do pulgão preto também foram identificados na seiva presente nos estiletes de afídeos e em

exsudatos do floema de algumas plantas, em quantidades mínimas (PANIZZI & PARRA, 2009).

Fischer & Shingleton (2001) verificaram que quando as formigas são escassas, os afídeos podem aumentar a atratividade do seu honeydew, aumentando a quantidade produzida, ou aumentando o nível de um trissacarídeo, a melezitose. Contudo, Stadler & Dixon (1998) sugerem que a grande quantidade de honeydew excretada pode ter um alto custo metabólico para os afídeos e isto pode explicar porque os afídeos reduzem a produção de honeydew quando as formigas estão ausentes. Similarmente, se a melezitose tiver um alto custo metabólico para ser sintetizada, os afídeos podem reduzir a sua produção em um ambiente onde não há formigas.

Diferente dos resultados encontrados nesse trabalho, Lamb (1959) e Hussain et al. (1974) relataram a presença de baixos níveis de aminoácidos na melada de *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae*, respectivamente. No entanto, uma pesquisa mostrou que plantas podem acumular proteínas na seiva elaborada em altas concentrações (KEHR, 2006) e indica a ocorrência de proteases no intestino médio de insetos que se alimentam do floema (CRISTOFOLETTI et al., 2003). Muitas proteínas da seiva do floema têm funções de cicatrização e de defesa de plantas contra insetos. Além disso, verificou-se que o floema não é o único tecido com que os pulgões interagem, as proteínas também podem ocorrer naturalmente nas paredes celulares da planta, ou como um resultado de infestação de pulgões (RAHBE & FEBVAY, 1993). WOODRING et al. (2004) observaram ainda que o honeydew de espécies mimercófilas é mais rico em aminoácidos, especialmente asparagina, glutamina, ácido glutâmico e serina, do que o de afídeos não-mirmecófilos.

A interação formiga-afídeo pode ser prejudicial às culturas orgânicas, uma vez que as formigas mantêm as populações de afídeos em crescimento, podendo consequentemente gerar perdas na produtividade da planta pela sucção contínua e o desenvolvimento de fumagina. Logo, os conhecimentos sobre as interações ecológicas das comunidades em sistemas agrícolas permitirão uma melhor escolha do tipo de controle biológico a ser usado em cada cultura.

#### 4. Conclusões

A análise por ressonância magnética nuclear do honeydew, o produto de excreção do *T. citricidus*, permitiu evidenciar a presença de importantes aminoácidos, dentre eles a leucina, valina, treonina, alanina, tirosina, ácido glutâmico e glutamina, fenilalanina, sendo os dois últimos os encontrados em maior quantidade. Também foram identificados carboidratos como a sacarose,  $\alpha$ -glicose e a beta glicose. A identificação dos compostos do honeydew do pulgão preto dos citros permitiu aprofundar o conhecimento sobre as interações afídeo-formiga e afídeo-planta hospedeira.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas; Ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

#### Referências Bibliográficas

AKOKA, S.; BARANTIN, L.; TRIERWEILER, M. Concentration measurement by próton NMR using the ERETIC method, **Analytical Chemistry**, 71, 2554-2557. 1999.

ALBERT, K. On-line use of NMR detection in separation chemistry. **Journal of Chromatography A**, v.703, p.123-147, 1995.

AUCLAIR, J. L. Aphid feeding and nutrition. **Annual Review of Entomology**, 8, 439–491. 1963.

BELTON, P. S.; DELGADILLO, I.; HOLMES, E.; NICHOLLS, A.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Use of High-Field  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy for the Analysis of Liquid Foods. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 44, 1483-1487, 1996.

BUCKLEY, R. Ant-plant-homoptera interactions. **Advances in Ecological Research**, 16, 53-85, 1987.

BUCKLEY, R. Interactions involving plants, homóptera, and ants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18, 111-138, 1987.

BYRNE, D.N.; W.B. MILLER. Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. **Journal of Insect Physiology**, 36: 433-439, 1990.

CARROLL, C. R.; JANZEN, D. H. Ecology of foraging by ants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 4, p. 231– 257, 1973.

CRISTOFOLETTI P.T., RIBEIRO A.F. Deraison C., Rahbe Y., Terra W.R., J. **Insect Physiol**, 49, 11-24. 2003.

DUNFORD, S. Topic 10.3 Sampling phloem SAP. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology** [ on line] Fourth Edition. 2006. Disponível em: [4HTTP://4e.plantphys.net/article.php?ch=10&id=136](http://4e.plantphys.net/article.php?ch=10&id=136). Acesso em: 02/2012.

FAY, L.; GHORBEL, A. Studies on  $\beta$ -fructosidase from radish seedlings. III. Comparative structure of soluble and wall bound forms. **Plant Science Letters**, 29: 33–48. 1983.

FEBVAY G., DELOBEL B. AND RAHBE Y. Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). **Canadian Journal Zoology**, 66, 2449-2453, 1988.

FISCHER, M. K.; SHINGLETON, A. W. Host plant and ants influence the honeydew sugar composition of aphids. **Functional Ecology**. 15, p. 544–550, 2001.

FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. **Ecologia nutricional de formigas**. In: PANIZZU, A. R.;

PARRA, J. R. P. (Ed.), Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: Manole; Brasília, DF: CNPq, p. 131-223. 1991.

HALBERT, S. E.; BROWN, L.G. *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), brown citrus aphid - identification, biology and management strategies. Fla. Dept. Agric. & Cons. Serv., Div. Plant Industry, Entomol. Cir. No. 374, 1996.

HAWKER, J. S. **Sucrose**. In: DEY, P.M.; DIXEN, R.A. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. London: Academic, p.1-48. 1985.

HOLLIS D. P. Quantitative Analysis of Aspirin, Phenacetin, and Caffeine Mixtures by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Analytical Chemistry**, 35, 1682-1684, 1963.

HUSSAIN A., FORREST J. M. S.; DIXON A. F. G. Sugar, organic acid, phenolic acid and plant growth regulator content of extracts of honeydew of the aphid *Myzus persicae* and of its host plant, *Raphanus sativus*. **Annals applied Biology**, 78, 65-78, 1974.

ILHARCO, F. A.; SOUSA-SILVA, C. R. *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphidoidea), the tropical citrus aphid in continental Portugal. **Revista de Agricultura** (Piracicaba), v. 84, p. 71-80, 2009.

JUNGNICKEL, J. L.; FORBES, J. W. Quantitative Measurement of Hydrogen Types by Intergrated Nuclear Magnetic Resonance Intensities. **Analytical Chemistry**, 35, 938-942. 1963.

KEHR, J. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. **Journal Experimental Botany**, 57: 767-774. 2006.

KEUN, H.C.; BECKONERT, O.; GRIFFIN, J.L.; RICHTER, C.; MOSKAU, D.; LINDON, J.C.; NICHOLSON, J.K. Cryogenic probe C-13 NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies, **Analytical Chemistry**, 74, p.:4588-4593. 2002.

KIRKALDY, G. W. On some peregrine Aphidae in Oahu, Honolulu. *Proc. Hawaiian Entomological Society*, v.1, p.100, 1907.

KISS, A. **Melzitose, aphids and ants**. *Oikos*, v. 37, p. 382, 1981.

LAMB, K. P. Composition of the honeydew of the aphid *Brevicoryne brassicae* (L.) feeding on swedes (*Brassica napobrassica* DC.). *Journal of Insect Physiology*, 3, 1-13. 1959.

LAZZARI, S. M. N.; ZONTA-DE-CARVALHO, R.C. **Sugadores de seiva (Aphidoidea)**, p. 767- 836. In Panizzi AR & Parra JP (Eds.). *Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas*. Embrapa Infomação Tecnológica, Brasília, 2009.

LE GALL, G.; PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 580-588, 2001.

MULLER N., GOLDENSON J. Rapid Analysis of Reaction Mixtures by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 78, 5182-5183, 1956.

OHIO STATE UNIVERSITY. **Christmas tree: fact sheet**. 2 p., 2011. Disponível em: <http://bugs.osu.edu/bugdoc/Shetlar/factsheet/christmasstree/images/CinaraAphid/Cinara.PDF>. Acesso em: maio de 2015.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J.R. P. **A bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas**, p.1107-1140. In Panizzi AR, Parra JRP (eds) *Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas*. Brasília, Embrapa/CNPq, 1164p. 2009.



PENTEADO, S. R. C.; LAZZARI, S. M. N.; FILHO, W. R.; NICKELE, M. A. Associações entre *Cinara atlantica*, seus inimigos naturais e formigas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 71, p. 309-320, jul./set. 2012.

RAHBE, Y.; FEBVAY, G. Protein toxicity to aphids: na in vitro test on *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 67, 149-160, 1993.

RACKHAM, D. M. Recent applications of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy in pharmaceutical research. **Talanta**, 23:269–274, 1976.

RODWELL, V. **Conversion of aminoacids to specialized products**. In: MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P., RODWELL, V. (Ed.). Harper's biochemistry. 24. p.341-362. 1996.

SASAKI, T.; AOKI, T.; HAYASHI, H.; ISHIKAWA, H. Amino acid composition of the honeydew of symbiotic and aposymbiotic pea aphids *Acyrtosiphon pisum*. **Journal Insect Physiol**, Vol. 36, No. 1. p. 35-40, 1990.

SILVA, L. M. A.; ALVES FILHO, E. G.; CHOZE, R.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B. <sup>1</sup>H HRMAS NMR Spectroscopy and Chemometrics for Evaluation of Metabolic Changes in Citrus sinensis Caused by Xanthomonas axonopodis pv. Citri. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 23, No. 6, 1054-1061, 2012.

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 14: 40-44, 1990.

SMITH, R. J.; WILMORE, D. H. Glutamine nutrition and requirements. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, 14:94-99. 1990.

STADLER, B.; DIXON, A. F. G. Costs of ant attendance for aphids. **Journal of Animal Ecology**, v. 67, p. 454–459, 1998.

STADLER, B.; DIXON, A. F. G. Ant attendance in aphids: why different degrees of myrmecophily? **Ecological Entomology**, v. 24, p. 363-369, 1999.

STADLER B.; DIXON, A. F. G. Ecology and evolution of aphidant interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 36, p. 345–372, 2005.

VALÉRIO, E.; CECÍLIO, A. **Afídeos**. In: PALHA MG (coord.). Manual do morangueiro. Alhos Vedros: Belgráfica, Lda., p. 35-42. 2005.

VÖLKL, W.; WOODRING, J.; FISCHER, M.; LORENZ, M. W.; HOFFMANN, K. H. Ant–aphid mutualisms: the impact of honeydew production and honeydew sugar composition on ant preferences. **Oecologia, Berlin**, v. 118, p. 483–491, 1999.

WAY, M. J. Mutualism between ants and honeydew producing Homoptera. **Annual Review of Entomology**, Santafor, v. 8, p. 307–344, 1963.

WINNING, H.; LARSEN F. H.; BRO, R.; ENGELSEN, S. B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance**, 190, p. 26–32, 2008.

WOODRING, J.; WIEDEMANN, R.; FISCHER, M. K.; HOFFMANN, K. H.; VÖLKL, W. Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). **Physiological Entomology**, 29:311–319, 2004.

## CAPÍTULO 4

### O Balanço Energético de *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy, 1907) (Hemiptera: Aphididae)

#### Resumo

Um estudo do fluxo de energia em diferentes fases do ciclo de vida do pulgão preto do citros, *Toxoptera citricidus*, foi realizado experimentalmente, por meio do balanço energético, utilizando-se a abordagem fisiológica, em laboratório. Ninfas recém-nascidas desse afídeo foram criadas em brotos jovens de *Citrus limonia*, em incubadora, com temperatura controlada de  $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos foram realizados durante trinta e oito dias, durante os quais foram calculadas as principais variáveis relacionadas à equação geral de balanço energético:  $C = P + R + \text{FU}$ , onde C = consumo de alimento; P = produção; R = respiração e FU = rejecta (fezes e urina). Estas foram determinadas por meio do balanço de massa em peso fresco e convertidas em peso seco e posteriormente em energia (calorias) por meio de fatores de conversão disponíveis na literatura. As quantidades absolutas de energia canalizadas para o crescimento, reprodução, produção de exúvias, respiração e rejecta variaram com a idade do pulgão. O consumo energético diário por *T. citricidus* foi de 0,3717 e 0,4761 cal para ninfas e adultos, respectivamente. A produção total diária das ninfas correspondeu a 0,2579 cal e a dos adultos a 0,1983 cal. A energia gasta com a respiração foi de 0,112 e 0,276 cal/afídeo/dia para ninfas e adultos, respectivamente. A energia eliminada através de FU foi igual a 0,0018 cal/afídeo/dia. Em relação às eficiências de conversão energética, a eficiência bruta de produção (P/C) variou de acordo com a fase do ciclo de vida, 69% em ninfas e de 41% em adultos. A eficiência de produção líquida (P/A) foi igual a 69,72% em ninfas e 41,80% em adultos. A eficiência de assimilação (A/C) não variou com a idade (99,5% em ninfas e 99,6% em adultos) e os valores obtidos para *T. citricidus* são mais elevados do que os reportados na literatura para a maioria dos outros insetos relatados.

**Palavras-chave:** Balanço energético, *Toxoptera citricidus*, pulgão preto do citros.

## 1. Introdução

Os pulgões, ou afídeos, pertencem à ordem Hemiptera e a superfamília Aphidoidea, sendo a família Aphididae a mais comum, com aproximadamente 4.000 espécies, presentes no mundo inteiro. A distribuição deste grupo reflete a grande habilidade que estes possuem em sobreviver sob condições climáticas adversas (DIXON, 1987). São um grupo de insetos de grande importância agrícola em termos mundiais, em função dos seus danos diretos e principalmente indiretos que ocasionam à produção agrícola (PEÑA-MARTÍNEZ, 1992).

Os danos diretos são provocados pela simples alimentação nas plantas. Os afídeos, típicos sugadores, se nutrem da seiva das plantas hospedeiras provocando o murchamento generalizado, encarquilhamento das folhas e a paralisação do desenvolvimento das mesmas (VENDRAMIM & NAKANO, 1981). Já os indiretos são de origens diferentes, em parte ocasionados pelo excesso de açúcares que excretam, “honeydew”, formando um meio rico para a ocorrência de fungos saprófitas, dificultando a respiração e a fotossíntese das plantas (PEÑA-MARTÍNEZ, 1992), e em parte pela capacidade de transmitir vírus fitopatogênicos.

Os seres vivos, em geral, são o reflexo daquilo que consomem, e esse fato evidencia a importância do alimento para os organismos. No caso dos insetos, a quantidade, qualidade e proporção de nutrientes presentes na dieta interferem em muitos aspectos da sua biologia, incluindo o comportamento, a fisiologia e a ecologia (PANIZZI & PARRA, 2009).

A fisiologia nutricional dos afídeos inclui os mecanismos de obtenção de seiva, sua composição química, os requisitos nutricionais, os processos químicos e fisiológicos necessários para transformar o alimento ingerido em energia nos tecidos, bem como o papel da nutrição nas funções metabólicas para o crescimento e a reprodução (SRIVASTAVA, 1987).

As espécies possuem padrões particulares de aquisição e alocação de energia, no entanto, as variações no ambiente, sejam elas diárias ou sazonais, podem afetar as funções biológicas de diversas maneiras. Nesse sentido, os estudos bioenergéticos auxiliam a compreender o papel dos organismos nos ecossistemas, pois refletem as interações entre os processos fisiológicos e de alocação de energia com as variáveis ambientais. Eles expressam a proporção de energia consumida que é alocada aos vários processos vitais e mostram como esta pode flutuar durante o ciclo de vida. Desse modo,

a bioenergética permite, por exemplo, quantificar as relações entre as taxas de gastos, perdas e produção com as de consumo, permitindo a compreensão das transformações de energia por unidades ecológicas (PHILLIPSON, 1975).

A construção de balanços energéticos teve início nos estudos de Lindeman (1942). Suas idéias foram aperfeiçoadas por Odum (1957) e Teal (1962), entre outros autores, que construíram balanços energéticos globais para os ecossistemas. Anos depois, Wiegert (1964) e McNeill (1971) construíram balanços energéticos para as populações de insetos, e a partir daí a bioenergética de muitas espécies de animais têm sido investigadas (LLEWELLYN, 1987).

Os balanços energéticos de alguns afídeos já foram determinados em laboratório. Llewellyn (1987) mediu o balanço energético para nove espécies de afídeos, incluindo espécies monófagas como *Eucallipterus tiliae* (L.) e *Tuberolachnus salignus* (Hemiptera: Drepanosiphidae) e espécies polífagas de Aphidinae; Van Hook et al. (1980) estudou o balanço em populações de *Macrosiphum liriodendri* e Llewellyn e Qureshi (1979) para *Megoura viciae*. Randolph et al. (1975) realizaram o estudo clássico do balanço energético do pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum*, considerado um dos mais completos estudos deste tipo (PIANKA, 1981).

A quantificação de parâmetros do balanço energético, envolvidos na aquisição e alocação de energia, possibilita ainda a quantificação do fluxo de energia através de cadeias tróficas que auxiliam na compreensão da estrutura das comunidades e no funcionamento dos ecossistemas (PHILLIPSON, 1975; KITCHELL et al., 1977; KARAS & THORESSON, 1992; DORIA & ANDRIAN, 1997; MARCHAND & BOISCLAIR, 1998; DOURADO & BENEDITO-CECILIO, 2005). No caso dos insetos, a energia é alocada por meio de uma gama de estratégias, canalizando-a para o crescimento e ou reprodução, de modo a garantir o seu sucesso e manutenção das espécies no ambiente. Este trabalho teve como objetivo quantificar a entrada, os gastos com os processos metabólicos, o armazenamento e alocação dos recursos energéticos de *T. citricidus*, através da quantificação das taxas de consumo, produção, respiração e excreção de diferentes fases do ciclo de vida desta espécie.

#### 4. Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados em câmara incubadora, com temperatura controlada de  $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Adultos de *Toxoptera citricidus* foram coletados em plantas de *Citrus limonia*, no município de São Carlos. Os insetos foram dispostos em ramos do mesmo hospedeiro, individualizados em *eppendorfs* contendo água. O conjunto foi protegido por um cilindro de vidro de 15 de altura e 10 de diâmetro (recipiente-teste), com uma das extremidades vedada com tecido voil de algodão. Ninfas recém-nascidas (com menos de 4 horas) foram utilizadas como organismos-teste nos bioensaios.

Para a determinação do balanço energético instantâneo neonatos ápteros (vinte repetições) foram utilizados. Estes foram criados em laboratório desde o nascimento até a morte. Os experimentos tiveram a duração de trinta e oito dias, durante os quais foram realizadas medidas das principais variáveis relacionadas à equação geral de balanço energético de acordo com Grodzinski et al. (1975) tendo-se:  $C = P + R + FU$ , onde C = consumo de alimento; P = produção; R = respiração e FU = fezes e excreta.

##### ***Determinação do Consumo (C)***

Não foi possível medir o consumo de seiva, único alimento de *T. citricidus* experimentalmente. Por esta razão esta variável foi calculada utilizando-se a equação do balanço energético, uma vez que toda a matéria incorporada como produção e a eliminada foram quantificadas. A matéria utilizada na respiração e seu equivalente calórico foram também calculados, com base em taxas respiratórias de afídeos, e fatores de conversão da matéria em energia disponíveis na literatura (LLEWELLYN & QURESHI, 1979). A somatória destas variáveis é equivalente à matéria/energia consumida.

### ***Produção Secundária (P)***

A produção foi determinada por meio da soma dos incrementos ( $\Delta B$ ) de peso corporal entre cada dois estádios ninfais sucessivos e entre o último estádio ninfal e o adulto. Estes incrementos correspondem à matéria/energia canalizada para o crescimento corporal ( $P_g$ ). A produção reprodutiva foi determinada por meio da multiplicação do número médio de ninfas produzidas pelo adulto pelo peso corporal médio das ninfas recém nascidas ( $P_r$ ). Foi também calculada a produção eliminada em produtos exuviais. Para cálculo da produção investida no crescimento ( $P_g$ ), cinco adultos e cinco ninfas de cada estádio foram pesados em balança analítica e a biomassa foi calculada de acordo com Grodzinski et al. (1975) onde:

$P_g = \Delta B$  em mg/dia de peso fresco

$\Sigma = P_g =$  Produção em crescimento

$\Delta B / \Delta t = (PN_2 + Ex_1 - PN_1) + (PN_3 + Ex_2 - PN_2) + (PN_4 + Ex_3 - PN_3) + (PA + Ex_4 - PN_4)$

$PN_1$ ,  $PN_2$ ,  $PN_3$  e  $PN_4$  correspondem aos pesos corporais médios de cada estádio ninfal, e  $PA$  ao peso corporal médio do adulto.  $Ex_1$ ,  $Ex_2$ ,  $Ex_3$  e  $Ex_4$  correspondem aos pesos médios das exúvias de cada estádio ninfal sucessivo, liberada após cada processo de ecdise.

Para o cálculo da quantidade de calorías contidas nos pulgões, foram feitas análises bioquímicas dos indivíduos adultos e ninfas de primeiro ínstar. Estes foram coletados e deixados em estufa a 60 °C por 48 horas até a obtenção de peso constante e acumulados até que se atingisse a quantidade mínima necessária para a realização das análises químicas. Os indivíduos foram macerados e previamente pesados em balança de precisão (Scientech SA 210). Para os demais instares considerou-se um valor médio da composição química encontrada para a ninfa de primeiro ínstar e para o adulto.

A quantificação do teor de lipídios foi feita pelo método de Bligh & Dyer (1959), que consiste em uma adaptação simples do método de Folch et al. (1957) utilizando como solventes o clorofórmio e o metanol (2:1), e água destilada, onde ocorre a separação da fase orgânica que contem os lipídios isolados. A quantidade total de lipídios na amostra foi determinada por gravimetria, em balança de precisão, após secagem em estufa por 48 horas ou mais, até peso constante.

A quantidade total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), uma técnica que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. O método baseia-se na interação do corante com as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. Para determinação da curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de albumina bovina. A análise foi feita por fotometria, com leituras a 620 nm em um espectrofotômetro.

Para a determinação de carboidratos foi utilizado o método do fenol-sulfúrico (fenol 4,1% e ácido sulfúrico) (DUBOIS, 1956), onde se utiliza como solução padrão a glicose 1 mM. A análise foi feita pela leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 480 nm. Após determinadas as porcentagens do peso corporal correspondentes a estes três constituintes básicos, lipídeos, proteínas e carboidratos, e utilizando os fatores de conversão para cada um destes, o peso foi convertido em conteúdo energético, expresso em calorias.

Na determinação da produção reprodutiva (Pr), os recém-nascidos produzidos pelos pulgões foram contados e removidos a cada 24 horas, durante toda a vida reprodutiva. A produção de novos indivíduos foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Pr} = \text{PN}_1 \times \text{Número médio de ninfas produzidas pelos adultos, sendo Pr expresso em mg/dia.}$$

A fração de energia perdida em exúvias durante os processos de ecdise foi quantificada a partir da coleta e determinação do peso das mesmas em balança de precisão para obtenção inicialmente da quantidade de matéria orgânica seca eliminada e em seguida convertida em energia, expressa em calorias.

Já a quantidade total de matéria orgânica total armazenada pelos pulgões, canalizada para o crescimento corporal, a reprodução e as exúvias, após expressas em miligramas de peso seco foram convertidas em calorias calculando-se seus teores de carboidratos, lipídeos e proteínas e multiplicando-os por seus respectivos coeficientes calóricos: 5,65 cal para carboidratos; 9,35 cal para lipídios e 3,90 cal para proteínas (PETRUSEWICZ & MACFADYEN, 1970). O peso seco foi assumido como sendo 10% do peso fresco, como recomendado por Grodzinski et al., (1975).



### ***Respiração (R)***

Para calcular a respiração foi utilizada a regressão linear obtida por Llewellyn & Qureshi (1979) quando determinaram o balanço energético da espécie de afídeo *Megoura viciae*:  $y=0,244x + 0,105$  ( $r = 0,80$   $p < 0,001$ ), onde  $x$  é o peso médio de cada estádio.

### ***Produção de fezes (FU)***

F é o conteúdo energético de fezes (honeydew) e U é o conteúdo energético das excretas nitrogenadas. Em pulgões F é inseparável de U.

Inicialmente vinte exemplares do afídeo *Toxoptera citricidus* foram coletados e colocados em uma placa de Petri devidamente limpa e pesada. Tais indivíduos foram deixados nas placas por 48 horas para que houvesse a excreção do honeydew. Após tal período, a placa foi pesada novamente e o honeydew foi coletado lavando-se a mesma com 5 mL de metanol grau HPLC. Este metanol foi evaporado com passagem de fluxo de N<sub>2</sub> e o extrato resultante foi ressolubilizado em 150 µL de metanol deuterado para a realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) quantitativa.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III 600 (14.1 T) equipado com uma sonda criogênica tripla de 5mm TCI <sup>1</sup>H {<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N} e com gradiente na direção z, instalado no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

### ***Eficiências metabólicas***

As eficiências metabólicas foram calculadas a partir dos parâmetros do balanço energético C, P e R de acordo com as fórmulas propostas por Grodzinski et al. (1975) e Duncan & Klekowski (1975).

- I) Coeficiente instantâneo de eficiência de assimilação:  $U_i^{-1}=A/C$
- II) Coeficiente instantâneo de utilização de energia consumida para crescimento, ou coeficiente de produção bruta:  $K1_i=P/C$
- III) Coeficiente instantâneo de utilização de energia assimilada para crescimento, ou coeficiente de produção líquida:  $K2_i=P/A$

## 5. Resultados e Discussão

### *A Biomassa dos Diferentes Estádios Ninfais e Adultos de Toxoptera citricidus*

O peso das ninfas de *Toxoptera citricidus* teve um aumento superior a 100% a cada ínstar (Tabela 4.1), do primeiro para o segundo estágio, as ninfas apresentaram o maior ganho de peso, de 2,37 vezes o peso inicial. De acordo com Panizzi & Parra (2009) para que o inseto adulto seja reprodutivamente competitivo, existem duas características que devem ser atingidas ao final da fase imatura: o tamanho mínimo, o qual pode influenciar no sucesso da cópula, não é o caso do afídeo aqui estudado, na dispersão e o peso, um indicativo dos nutrientes e energia armazenados e que podem influenciar na procura do parceiro para a cópula, os vôos de dispersão e a fecundidade. Ainda segundo estes autores, o acúmulo de lipídios nos insetos hemimetabólicos ocorre principalmente no último ínstar larval, o que pode justificar o segundo maior aumento de peso no ínstar 4.

Llewellyn & Qureshi (1978) determinaram o balanço energético do pulgão *Aphis fabae*, e obtiveram um valor médio de 0,789 mg para o peso do adulto, um valor similar ao encontrado neste estudo para *T. citricidus*, de 0,701 mg.

A proteína foi o componente presente em maior quantidade em ninfas de primeiro ínstar do afídeo, 33,80% e o de menor quantidade em adultos, 15,39% (Tabela 4.1). As proteínas desempenham funções cruciais em praticamente todos os processos biológicos pois executam e controlam as funções essenciais nos organismos vivos (ALBERTS et al., 2002). Os insetos diferem da maioria dos outros organismos em relação ao teor de aminoácidos livres. O sangue da maioria dos vertebrados contém

cerca de 50 mg de aminoácidos livres por 100 ml enquanto a hemolinfa dos insetos tem um teor de aminoácidos de cerca de 100 mg por 100 ml (LAWRENCE & HOWARD, 1961), portanto, duas vezes mais elevado.

Tabela 4.1. Concentração total de lipídios, proteínas e carboidratos, porcentagens correspondentes e conteúdo calórico relativos ao peso seco das ninfas e adultos de *Toxoptera citricidus* criados em ramos de *Citrus limonia*, na temperatura de 20±0,5 °C, e fotoperíodo de 12 h. O peso seco foi assumido como sendo 10% do peso fresco, como recomendado por Grodzinski et al., (1975).

Estágio	Peso fresco (mg)	Peso seco(mg)	Composição química(mg)		%	Conteúdo calórico (cal)
N1	0.030	0.0030	0.00082	lipídeos	27.70	0.0077
			0.00100	proteínas	33.80	0.0039
			0.00081	carboidratos	27.27	0.0046
N2	0.069	0.0060	0.00153	lipídeos	25.48	0.0143
			0.00148	proteínas	24.60	0.0058
			0.00133	carboidratos	22.23	0.0075
N3	0.155	0.0150	0.00384	lipídeos	25.48	0.0357
			0.00369	proteínas	24.60	0.0144
			0.00333	carboidratos	22.23	0.0188
N4	0.359	0.0350	0.00892	lipídeos	25.48	0.0834
			0.00861	proteínas	24.60	0.0336
			0.00778	carboidratos	22.23	0.0440
Adulto	0.702	0.0702	0.01632	lipídeos	23.26	0.1526
			0.01080	proteínas	15.39	0.0421
			0.01203	carboidratos	17.15	0.0680

Os lipídios constituíram 25,48%, em média, da massa corporal de *T. citricidus*, e no adulto foi o componente presente em maior quantidade, 23,26%. Nos insetos, os lipídios acumulados durante o período pré reprodutivo são a principal reserva de energia a ser alocada na reprodução (LIM & LEE, 1981). São fundamentais em algumas situações de grande demanda metabólica, tais como o vôo e a produção de ovos; são constituintes primários em estruturas celulares e atuam como hormônios (ARRESE et

al., 2001). Além disso, sugere-se que o principal destino de sacarose extra nos pulgões são os lipídeos (FEBVAY et al., 1999).

O teor de carboidratos de *T. citricidus* foi em média de 22,23%, sendo o componente orgânico presente em menor quantidade nas ninfas de primeiro ínstar, mas no adulto está em maior quantidade que as proteínas (Tabela 4.1). A variedade e complexidade de estruturas que os carboidratos podem adotar tornam este grupo de moléculas essenciais e estas são empregadas pelos organismos vivos em uma grande quantidade e variedade de funções biológicas, como por exemplo: reserva energética, função estrutural e eventos de sinalização (GEISLER-LEE, 2006).

Ahsaei et al. (2013) estudando duas formas de *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae), verificou que a reserva de energia mais importante em ninfas de coloração verde nos últimos estágios eram proteínas (42,14%), seguidas de lipídios (41,06%) e de hidratos de carbono (16,04%). No entanto, em pulgões da mesma espécie e de coloração vermelha, os lipídios eram a reserva de energia mais abundante (53,20%), seguidos de carboidratos (24,28%) e proteínas (22,06%). Tabadkani et al. (2013) também verificaram que em ninfas de *A. pisum* os lipídios foram os componentes mais importantes correspondendo a 53,20% e 57,54% do balanço total de energia dos pulgões vermelhos e verdes, respectivamente, seguidos dos carboidratos (24,28% e 21,23%) e proteínas (22,06% e 20,69%).

A produção total destinada ao crescimento diário do afídeo *T. citricidus* foi de 0,0406 mg. O conteúdo energético destinado ao crescimento desse afídeo aumentou proporcionalmente com a idade ao longo da fase imatura (Tabela 4.2). Randolph et al. (1975) observaram esse mesmo padrão de investimento energético para as ninfas de *Acyrtosiphon pisum*.

A fração total da produção destinada à reprodução em adultos de *T. citricidus* foi em média 0,0052 mg/dia, correspondendo a um conteúdo calórico de 0,1983. Os pulgões começaram a se reproduzir no décimo dia de idade e a fecundidade aumentou rapidamente de 1 até 13 ninfas, com valor médio de 3,3 ninfas produzidas por fêmea a cada dia e diminuiu de forma constante a partir do vigésimo dia. A partir deste dia houve um rápido declínio na fecundidade média em decorrência da morte de alguns indivíduos. Nenhum pulgão viveu mais de 38 dias, sob essas condições.

Tabela 4.2. Produção destinada ao crescimento (Pg), composição química corporal e conteúdo calórico total de ninfas de *Toxoptera citricidus* criados em laboratório, em *Citrus limonia*, na temperatura de 20±0,5 °C, e fotoperíodo de 12 h.

<b>Estágio</b>	<b>Pg (mg/dia)</b>	<b>Conteúdo calórico (cal)</b>
<b>N<sub>1</sub> → N<sub>2</sub></b>	0.0016	0.0041 (lipídios) 0.0021 (proteínas) 0.0025 (carboidratos)
<b>N<sub>2</sub> → N<sub>3</sub></b>	0.0070	0.0167 (lipídios) 0.0067 (proteínas) 0.0088 (carboidratos)
<b>N<sub>3</sub> → N<sub>4</sub></b>	0.0144	0.0343 (lipídios) 0.0138 (proteínas) 0.0181 (carboidratos)
<b>N<sub>4</sub> → Adulto</b>	0.0176	0.0419 (lipídios) 0.0169 (proteínas) 0.0221 (carboidratos)

Assumindo que o exosqueleto é composto apenas de carboidratos, a produção destinada à produção do exoesqueleto foi de 0,0065 mg, correspondendo a um conteúdo calórico de 0,0366 calorias (Tabela 4.3). Sob condições de laboratório, *T. citricidus* apresentou ecdise, eliminando quatro exúvias durante seu desenvolvimento ninfal, geralmente nos dias 2-3, 4, 6 e 8. Esta perda de energia nos afídeos é muito pequena (0,0079; 0,0084; 0,0096; 0,0107 cal/pulgão para a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> exúvias, respectivamente). Randolph et al. (1975) observaram valores maiores para as exúvias de ninfas de *Acyrtosiphon pisum*, (0,022, 0,026, 0,044, 0,087 cal/pulgão para a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> exúvias respectivamente).

Tabela 4.3 Conteúdo calórico destinado à produção de exúvias por *Toxoptera citricidus* criados em laboratório, sobre brotos novos de *Citrus limonia*, na temperatura de  $20\pm 0,5$  °C, e fotoperíodo de 12 h.

Estágio	Exúvia		
	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	Equivalente calórico
N <sub>1</sub>	0,014	0,0014	0,0079
N <sub>2</sub>	0,015	0,0015	0,0084
N <sub>3</sub>	0,017	0,0017	0,0096
N <sub>4</sub>	0,019	0,0019	0,0107
<b>Estágio ninfal</b>	<b>0,065</b>	<b>0,0065</b>	<b>0,0366</b>

Llewellyn & Qureshi (1978) também reportaram o peso seco médio das exúvias de *Aphis fabae* superior ao encontrado neste trabalho com *T. citricidus*, 0,0019 mg para o primeiro instar, 0,0024 mg para o segundo instar, 0,0043 mg para o terceiro instar e 0,0081 mg para as exúvias de quarto instar. O conteúdo calórico médio das exúvias de *A. fabae* produzidas durante o crescimento ninfal também foi superior ao encontrado no presente trabalho que foi de 0,083 cal por exemplar de *T. citricidus*. No ano seguinte Llewellyn & Qureshi determinaram o conteúdo calórico para a produção total de exúvias do pulgão *Megoura viciae* encontrando 0,32 cal.

Os gastos energéticos alocados para a reprodução podem resultar em limitação do crescimento da fêmea, devido ao direcionamento de recursos energéticos para fins reprodutivos e não de crescimento, e/ou afetar a fecundidade e redução no desempenho reprodutivo (WILLIAMS, 1966; CALOW, 1979). Tuomi et al. (1983) relatam duas maneiras pelas quais os animais podem superar essas limitações e estocar energia: uma delas diz respeito à alimentação continuada enquanto o animal está em reprodução; a outra concerne ao intervalo de tempo entre as desovas, de forma que maiores intervalos permitem ao animal obter energia suficiente para ovipositar com sucesso.

Tanto o crescimento como a reprodução são processos que competem por recursos, logo podem envolver riscos (ROFF, 1983, HARTNOLL, 1985). Para afídeos, o crescimento requer recursos ou reservas energéticas apenas na fase imatura e para a reprodução apenas na fase adulta. Para o *T. citricidus* toda a produção antes do nono dia foi destinada ao crescimento, e toda a produção após esse dia foi canalizada para a

reprodução. Dessa forma, entre os eventos de muda e reprodução, ocorreram ajustes nos níveis de gasto e consequentemente, de alocação de energia.

A quantidade total de energia usada para a respiração (R) aumentou exponencialmente durante o período ninfal até a chegada da fase adulta, variando entre 0,112 cal/pulgão/dia para as ninfas de primeiro instar a 0,276 cal/pulgão/dia para adultos (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Gasto energético diário destinado à respiração (metabolismo basal) de *Toxoptera citricidus* criados em laboratório, sobre brotos novos de *Citrus limonia*, na temperatura de  $20\pm 0,5$  °C, e fotoperíodo de 12 h.

<b>Estádio</b>	<b>Gasto energético (cal)</b>
N <sub>1</sub>	0,112
N <sub>2</sub>	0,122
N <sub>3</sub>	0,143
N <sub>4</sub>	0,193
Adulto	0,276

A quantidade total de energia usada para a respiração (R) por afídeo foi de 0,308 cal no primeiro instar, 0,183 cal no segundo instar, 0,214 cal no terceiro instar, 0,405 cal no quarto instar e 5,727cal na fase adulta. Como os gastos energéticos com a respiração variam de acordo com a idade do organismo, o aumento máximo no oitavo e nono dias é explicado pelo fato de corresponder ao início da fase adulta e início da reprodução, respectivamente (Figura 4.1).

Randolph et al. (1975) também observaram um aumento nos custos com a respiração na fase pré-reprodutiva e reprodutiva, provavelmente pelos custos para síntese e armazenamento de lipídios (compostos de maior conteúdo calórico) e ou uma maior proporção de tecidos com alta taxa metabólica. Ainda para esses autores, com o passar do tempo na fase adulta os custos com a respiração diminuem linearmente.

A produção secundária média por dia, expressa em peso seco, de honeydew por adulto de *Toxoptera citricidus* foi de 0,00084 mg com equivalente calórico igual a 0,0018 calorias. Em relação às fezes e urinas, estes são sempre contabilizados conjuntamente e nenhum dos balanços energéticos de afídeos construídos até agora reportaram valores separados (LLEWELLYN, 1987).

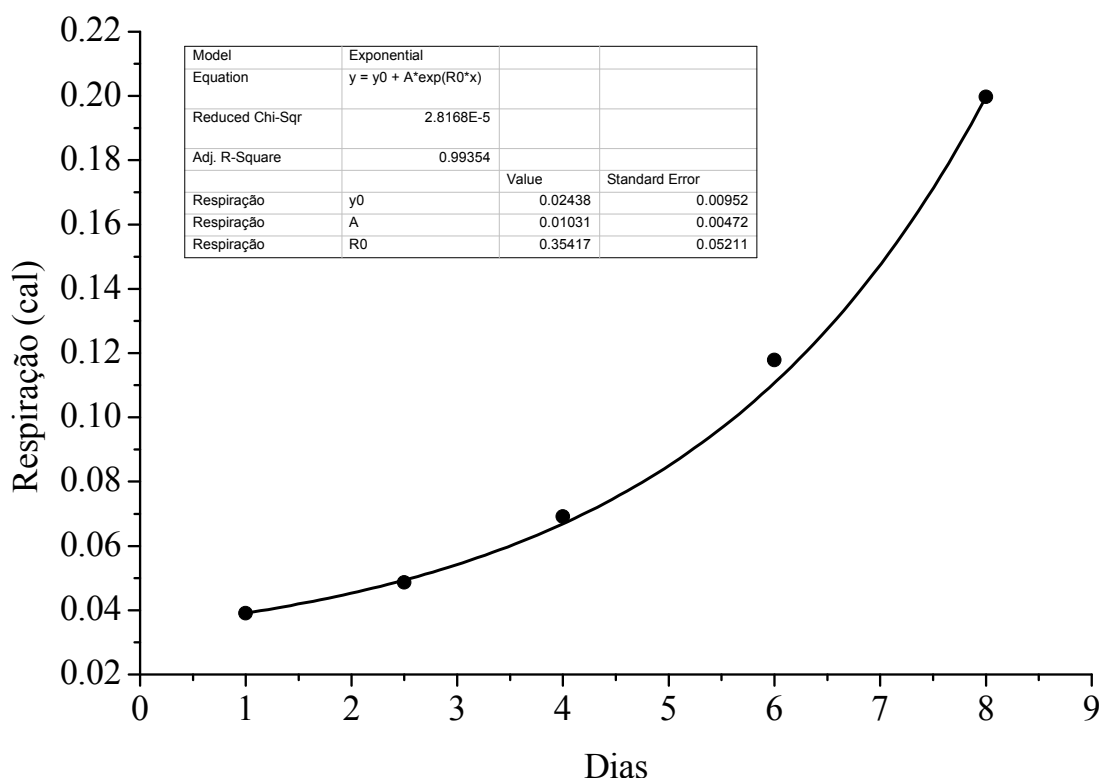


Figura 4.1. Quantidade total de energia usada para a respiração (R) por *Toxoptera citricidus* criados em laboratório sobre brotos novos de *Citrus limonia*, na temperatura de  $20 \pm 0,5$  °C, com fotoperíodo de 12 h.

Llewellyn & Qureshi (1978), concluíram que a excreção diária média de ninfas de *Aphis fabae* foi de 0,033 mg e para adultos foi de 0,077 mg de peso seco de *honeydew*, valor superior ao encontrado nesse trabalho. Já o valor calórico foi de 3,67 cal/mg de peso seco. Segundo esses autores, embora os pulgões percam peso gradualmente durante a vida reprodutiva a sua taxa de excreção aumenta dia antes de diminuir lentamente, sendo maior durante o período reprodutivo em afídeos que se alimentam em folhas e caules jovens. Estes mesmos autores (LLEWELLYN & QURESHI, 1979), estudando *Megoura viciae* observaram que a quantidade de *honeydew* excretada por esse afídeo durante toda a vida foi equivalente a 11,14 calorias.

O consumo diário de *T. citricidus* expresso em energia foi calculado com base nos parâmetros obtidos ou calculados para as outras variáveis do balanço energético. Outros valores de consumo e dos demais parâmetros são apresentados conjuntamente na Tabela 4.5 a qual sintetiza todo o balanço para os diferentes estágios de desenvolvimento deste afídeo, ninfas e adultos. O consumo de alimento (seiva) foi em média de 0,3717 cal para as ninfas e de 0,4761 cal para os adultos. Houve um aumento



no consumo total, de cerca de 2,91 cal/pulgão no período ninfal para 9,8790 cal/pulgão no período adulto.

Tabela 4.5. Balanço energético de *Toxoptera citricidus* expresso em calorias por indivíduo por dia para organismos criados em laboratório em ramos de *Citrus limonia*, na temperatura de 20±0,5 °C e fotoperíodo de 12 h. Pg= energia para crescimento; Pr= energia para reprodução; Pe= energia para exúvias e Pt= energia total.

Estágio	Consumo	Produção				Respiração	Excreção
		Pg	Pr	Pe	Pt		
Ninfa	0,3717	0,2213	-	0,0366	0,2579	0,112	0,0018
Adulto	0,4761	-	0,1983	-	0,1983	0,276	0,0018

O cálculo do balanço energético é importante para os estudos do fluxo de energia através das populações e comunidades e para se entender o funcionamento dos ecossistemas. Entretanto, a sua utilização para a compreensão e comparação da fisiologia de afídeos requer o cálculo dos índices de eficiência de transferência de energia. A eficiência da transferência de energia total através do animal é determinada pela relação P/C, também chamada de "eficiência de crescimento" ou eficiência média bruta de produção. Para as ninfas de *T. citricidus* o valor obtido para P/C foi 0,6938 (69%) e para adultos 0,4165 (41%). A produção deste pulgão foi mais eficiente no período ninfal, provavelmente porque após a maturidade os adultos tiveram maior gasto energético com a reprodução (produção de ninfas) que com o crescimento corporal.

A relação P/C depende dos valores das duas outras proporções, A/C, é também chamada de "eficiência de assimilação" e é uma medida da assimilação de energia a partir dos alimentos. Em pulgões, grande parte dela é dependente da composição da seiva do floema ingerido. Para *T. citricidus* essa eficiência não variou com a idade, foi 0,9951 (99,5%) em ninfas e 0,9962 (99,6%) em adultos. A alta relação A/C indica que grande parte do conteúdo energético do alimento é assimilado através da parede do intestino e uma quantidade mínima é excretada.

A relação entre A/C e a idade não pode ser claramente definida neste estudo, visto que não foi possível medir duas variáveis importantes, o consumo e a respiração, tendo sido estas calculadas a partir de equações. Espera-se que insetos sugadores de seiva em todas as idades tenham eficiências de assimilação bem próximas da máxima. É possível que *T. citricidus* estivesse operando com eficiência máxima, dadas as

condições controladas e constantes deste experimento e ausência de competição pelo alimento.

Llewellyn & Qureshi (1979) estudando *Megoura viciae* obtiveram um valor de P/C foi igual a 59%. Randolph et al. (1975) estudando o pulgão *Acyrtosiphon pisum*, também encontrou uma eficiência alta, de 83%. Rathcke (1968) em um estudo sobre balanços energéticos em afídeos afirma que os ganhos de eficiência do pulgão da ervilha são mais semelhantes ao A/C de carnívoros do que de insetos herbívoros. Os valores médios de assimilação para carnívoros variam entre 47% e 92%, enquanto que em herbívoros variam de 36% a 78% do consumo (REICHLE, 1971).

A eficiência de assimilação varia amplamente entre as espécies estudadas e o tipo de alimento ingerido. Llewellyn (1972) obteve para *Eucallipterus tiliae* uma assimilação de 8,6% da ingestão; Nielson & VanHook (1971) encontraram uma assimilação de 23% para *Macrosiphum liriodendroni*; Banks & Macaulay (1964, 1965) relataram 29,4% de A/C em *Aphis fabae*; Mittler (1958) encontrou uma eficiência de assimilação menor que 10% da ingestão na assimilação de *Tuberolachnus salignus*, enquanto Ehrhardt (1962, 1963) demonstrou que *Megoura viciae* assimilou mais de 80% do ingerido.

P/A é uma medida do "custo de vida". A energia liberada a partir dos alimentos durante a digestão é utilizada no crescimento, manutenção dos tecidos corporais, movimento do corpo e reprodução. Assim, um baixo teor de P/A indica que R e U são elevadas, sendo necessário menos energia para "viver". No presente estudo, *T. citricidus* apresentou uma produção líquida de 0,6972 (69,7%) em ninfas e 0,4180 (41,8%) em adultos. A literatura sugere um padrão geral de 50% a 60% de P/A em herbívoros (RANDOLPH et al., 1975). Llewellyn (1972) encontraram uma P/A para os pulgões de 58%. Llewellyn & Qureshi (1979), estudando *Megoura viciae* observaram que a P/A foi igual a 86%.

#### **4. Conclusão**

A proteína é o componente orgânico em maior quantidade em ninfas de primeiro instar de *Toxoptera citricidus*, seguido de lípidios e hidratos de carbono. Em adultos, no entanto, lipídios é a reserva de energia mais abundante, seguido de carboidratos e proteínas.

O balanço energético total do *T. citricidus* variou dependendo da idade do afídeo. O consumo diário do pulgão preto dos citros foi maior em adultos. A fração energética à produção foi bastante elevada, em média 60%, evidenciando alta eficiência na retenção de energia. A energia gasta diariamente na respiração aumentou com a idade e a produção média por dia de peso seco de honeydew por adulto foi de 0,00084 mg. A eficiência média bruta de produção (P/C) e a produção líquida (P/A) foram superiores nas ninfas e a eficiência de assimilação (A/C) foi alta e não variou com a idade do afídeo. *T. citricidus* tem importante papel na transferência de energia através dos ecossistemas.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas; Ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.

## Referências Bibliográficas

AHSAEI, S. M.; TABADKANI, S. M.; HOSSEININAVEH, V.; ALLAHYARI, H.; BIGHAM, M. Differential accumulation of energy by the color morphs of the pea aphid *Acyrtosiphon Pisum* (Hemiptera: Aphididae) mirrors their ecological adaptations. **European Journal of Entomology**, 110(2): 241-245, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the cell**, 4 ed. New York: Garland Science, 2002.

ARRESE, E.L., CANAVOSO, L.E., JOUNI, Z.E., PENNINGTON, J.E., TSUCHIDA, K., WELLS, M.A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 31, 7-17, 2001.

BANKS, C. J.; MACAULAY, E. D. M. The feeding, growth and reproduction of *Aphis fabae* Scop. on *Vicia faba* under experimental conditions. **Annals of Applied Biology**, 53 : 229-242, 1964.

BANKS, C. J.; MACAULAY, E. D. M. The ingestion of nitrogen and solid matter from *Vicia faba* by *Aphis fabae* Scop. **Annals of Applied Biology**, 55: 207-218, 1965.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALOW, P. The cost of reproduction – a physiological approach. **Biological Reviews**, Cambridge, 54: 23-40, 1979.

DIXON, A. F. G. Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids, p.269-287. In Minks, A.K. & P. Harrewijn. (eds.), *Aphids: their biology, natural enemies and control*. Amsterdam, **Elsevier**, v.2A, 450p, 1987.

DORIA, C. R. C.; ANDRIAN, I. F. Variation in energy content of somatic and reproductive, tissues related to the reproductive cycle and feeding of female *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) and *Schizodon borellii*, Boulenger, 1895 (Characiformes, Anostomidae). **Revista Unimar**, v. 19, n. 2, p. 421-437, 1997.

DOURADO, E. C. S.; BENEDITO-CECILIO, E. **Ecologia energética de peixes: influência de fatores abióticos e bióticos**. Maringá: Eduem, 2005.

DUBOIS, M. ; GILLES, K. H. ; HAMILTON, J. K. ; ROBERTS, P. A. ; SMITH, F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28, p. 350-358, 1956.

DUNCAN, A.; KLEKOWSKI, R. Z. **Parameters of an energy budget**. Pp. 97-147 in Grodzinski, W., Klekowski, R. Z. & Duncan, A. (eds.): Methods for ecological bioenergetics. IBP Handbook 24, 1975.

EHRHARDT, P. Untersuchungen zur Stoffwechselphysiologie von *Megoura viciae* Buckt., einer Phloemsaugenden Aphide. **Z. Vergl. Ph.** 46:169-211, 1962.

EHRHARDT, P. Untersuchungen über Bau und Funktion des Verdauungstraktes von *Megoura viciae* Buckt. (Aphididae, Homoptera) unter besonderer Berücksichtigung der Nahrungsaufnahme und der Honigtauabgabe. **Z. Morph. Okol. Tiere** 52:597-677, 1963.

FEBVAY, G.; RAHBE, Y.; RYNKIEWICZ, M.; GUILLAUD, J. BONNOT, G. Fate of dietary sucrose and neosynthesis of amino acids in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, reared on different diets. **Journal of Experimental Biology**, 202:2639-52, 1999.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry** 226: 497-509, 1957.

GEISLER-LEE, J.; GEISLER, M.; COUTINHO, P. M.; SERGERMAN, B.; NISHIKUBO, N.; TAKAHASHI, J.; ASPERGORG, H.; DJERBI, S.; MASTER, E.; ANDERSSON-GUNNERAS, S.; SUNDBERG, B.; KARPINSSKI, S.; TEERI, T. T.; KLECZKOWSKI, L. A.; HENRISSAT, B.; MELLEROWICZ, E. J. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression. Analysis. **Plant Physiology**, v. 140, n.3, p. 9466-962, 2006.

GRODZINSKI, W.; KLEKOWSKI, R. Z.; DUNCAN, A. (EDS.). **Methods for ecological bioenergetids**. I. B .P. Handbook No. 24. Oxford: Blackwell, 1975.

HARTNOLL, R. G. **Growth, sexual maturity and reproductive output**, p. 101-128. In: A. M. Wenner (Ed.). Factors in adult growth. Rotterdam, A.A. Balkema. 1985.

KARAS, P.; THORESSON, G. An application of bioenergetics model to *Eurasian perch* (*Perca fluviatilis* L.). **Journal of Fish Biology**, v. 41, p. 217-230, 1992.

KITCHELL, J. F.; MAGNUSON, J. J.; NEILL, W. H. Estimation of caloric content for fish biomass. **Environmental Biology of Fishes**, v. 2 n. 2, p. 185- 189, 1977.

LAWRENCE I. G.; HOWARD A. S. Some Biochemical aspects of insect metamorphosis. **American Zoologist**, 1:11-51, 1961.

LIM, S. J; LEE, S. S. The effects of starvation on haemolymph metabolites, fat body, and ovarian development in *Oxya japonica* (Acrididae: Orthoptera). **Journal of Insect Physiology**; 27:93–6, 1981.

LINDEMAN, R. L. The trophic-dynamic aspect of ecology. **Ecology**, 23: 399-418. 1942.

LLEWELLYN, M. The effects of the lime aphid, *Eucallipterus tiliae* L. (Aphididae) on the growth of the lime *Tilia vulgaris* Hyne. I. Energy require-ments of the aphid population. **Journal of Applied Ecology**, 9: 261- 282, 1972.

LLEWELLYN, M. Aphid energy budgets. In: MINKS, A. K.; HERREWIJN, P. (Ed.). Aphids: their biology, natural enemies and control. Amsterdam: **Elsevier**, v. 2B, p. 109-117, 1987.

LLEWELLYN, M.; QURESHI, A. L. The energetics and growth efficiency of *Aphis fabae* Scop. Reared on different parts of the broad bean plant (*Vicia faba*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 23:26-39, 1978.

LLEWELLYN, M.; QURESHI, A. L. The energetics of *Megoura viciae* reared on different parts of the broad bean plant (*Vicia faba*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 26: 127-135. 1979.

MARCHAND, F.; BOISCLAIR, D. Influence of fish density on the energy allocation pattern of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, p. 796-805, 1998.

MCNEILL, S. The energetics of a population of *Leptopterna dolabrata* (Heteroptera: Miridae). **Journal of Animal Ecology**, 40: 127-140. 1971.

MITTLER, T. E. Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) (Homoptera: Aphididae). III. The nitrogen economy. **Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 35, p. 626-638, 1958.

NIELSON, M. G.; VANHOOK, R. I. **Biomass, energy, and mineral aspects of a Liriodendron canopy aphid population**. Eastern Deciduous Forest Biome Memo Report, 71-85, 1971.

ODUM, H. T. Trophic structure and productivity of Silver Springs, Florida. **Ecological Monographs**. n. 27. p. 55-112, 1957.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J.R. P. **A bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas**, p.1107-1140. In Panizzi AR, Parra JRP (eds) Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, Embrapa/CNPq, 1164p., 2009.

PENA-MARTINEZ, R. Biología de afidos y su relación con la transmisión de virus. In: URIAS, M.C.; RODRIGUES, M.R. e ALEJANDRE, T.A. **Afidos como vectores de virus em México**, Vol.1. p.11-24, 1992.

PETRUSEWICZ, K.; MACFADYEN, A. **Productivity of Terrestrial Animals. Principles and Methods**. IBP Handbook no. 13, International Biological Program, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 190p., 1970.

PHILLIPSON, J. **Ecologia Energética**. Companhia Editora Nacional. Ed. da USP. 93p., 1969.

PHILLIPSON, J. **Introduction to ecological energetics**. In: GRODZINSKI, W.; KLEKOWSKI, R. Z.; DUNCAN, A. (Ed.). *Methods for ecological bioenergetics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.

PIANKA, E. R. **Resource Acquisition and Allocation among Animals**. Chapter 12. 300-314pp, In: TOWNSEND, C. R. and CALOW, P (Eds). *Physiological Ecology: An evolutionary approach to resource use*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1<sup>st</sup> ed. 393 pp. 1981.

RANDOLPH, P. A., RANDOLPH, J. C. ; BARLOW, C. A. Age specific energetics of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Ecology**, 56: 359-369. 1975.

RATHCKE, B. **Energy utilization of Acyrthosiphon pisum (Harris) (Hemiptera: Aphididae)**. University of London. 1968.

REICHLER, D. E. **Energy and nutrient metabolism of soil and litter invertebrates**. p. 465-477. In UNESCO productivity of forest ecosystems. Proc. Brussels Symp., 1971.

ROFF, D. A. An allocation model of growth and reproduction in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, 40: 1395-1404, 1983.



SRIVASTAVA, P. N. Nutritional physiology. In **Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control** (Edited by Minks A. K. and Harrewijn P.), Vol. A, pp. 91-121. Elsevier, Amsterdam, 1987.

TABADKANI, S. M.; AHSAEI, S. M.; HOSSEININAVEH, V.; NOZARI, J. Food stress prompts dispersal behavior in apterous pea aphids: Do activated aphids incur energy loss? **Physiology and Behavior**, 110-111: 221-225, 2013.

TEAL, J. M. Energy flow in the salt marsh ecosystem of Georgia. **Ecology**, 43: 614-624. 1962.

TUOMI, J.; T. HAKALA & E. HAUKIOJA. Alternative concepts of reproductive effort, costs of reproduction, and selection in life-history evolution. **American Zoologist**, Thousand Oaks, 23: 25-34, 1983.

VAN HOOK, R. I.; NIELSEN, M. G.; SHUGART, H. H. Energy and nitrogen relations for a *Macrosiphum liriodendri* (Homoptera: Aphididae) population in an east Tennessee *Liriodendron tulipifera* stand. **Ecology**, 61: 960-975, 1980.

VENDRAMIM, J. D.; NAKANO, O. Aspectos biológicos de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Homoptera: Aphididae) em algodoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.10, n.2, p.163-173, 1981.

WIEGERT, R. G. Population energetics of meadow spittlebugs (*Philaneus spumarius* L.) as affected by migration and habitat. **Ecological Monographs**, 34: 217-241, 1964.

WILLIAMS, G.C. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. **American Naturalist**, 100: 687-690, 1966.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Com este estudo, as seguintes conclusões gerais puderam ser obtidas:

- O extrato de *Azadirachta indica*, *D. brasiliensis*, *Sapindus saponaria*, *Spilanthes acmella*, *Hortia oreadica* e o composto poligodial foram os mais tóxicos dentre os estudados nas exposições agudas, demonstraram potencial inseticida sobre o pulgão preto dos citros.
- Nos testes de toxicidade aguda, o estágio ninfal apresentou maior sensibilidade aos extratos testados em relação aos adultos do afídeo *Toxoptera citricidus*.
- Os testes de toxicidade crônica revelam alterações no ciclo de vida e na dinâmica populacional da espécie *Toxoptera citricidus* para o óleo de nim Nano L5-3 na concentração de 0,01µg/mL, evidenciando o potencial uso desta formulação nanotecnológica para o controle deste inseto-praga.
- Muitos aminoácidos fazem parte da composição do honeydew do *Toxoptera citricidus*, dentre eles o ácido glutâmico e glutamina, fenilalanina, valina, leucina, treonina, alanina, fenilalanina e a tirosina. Dentre os carboidratos foram encontrados sacarose,  $\alpha$ -glicose e beta glicose.
- O balanço energético total de *Toxoptera citricidus* variou dependendo da idade do afídeo; o consumo foi maior no adulto e a produção total foi mais eficiente no período ninfal; A energia gasta com a respiração aumentou com a idade de *T. citricidus*;
- A eficiência bruta e a produção líquida variou de acordo com a fase do ciclo de vida. A eficiência de assimilação foi igual para ninfas e adultos do pulgão preto.

- *Toxoptera citricidus* tem elevada eficiência na retenção de energia devido sua elevada produção, como revelado pelo seu balanço energético, desta forma desempenhando provavelmente um importante papel na transferência de energia através do ecossistema.

## **Apêndice A**

### **Fotos**



Figura 1. Sequência de fotos evidenciando a criação de *Toxoptera citricidus*.

## **Apêndice B**

### **Espectros de RMN**

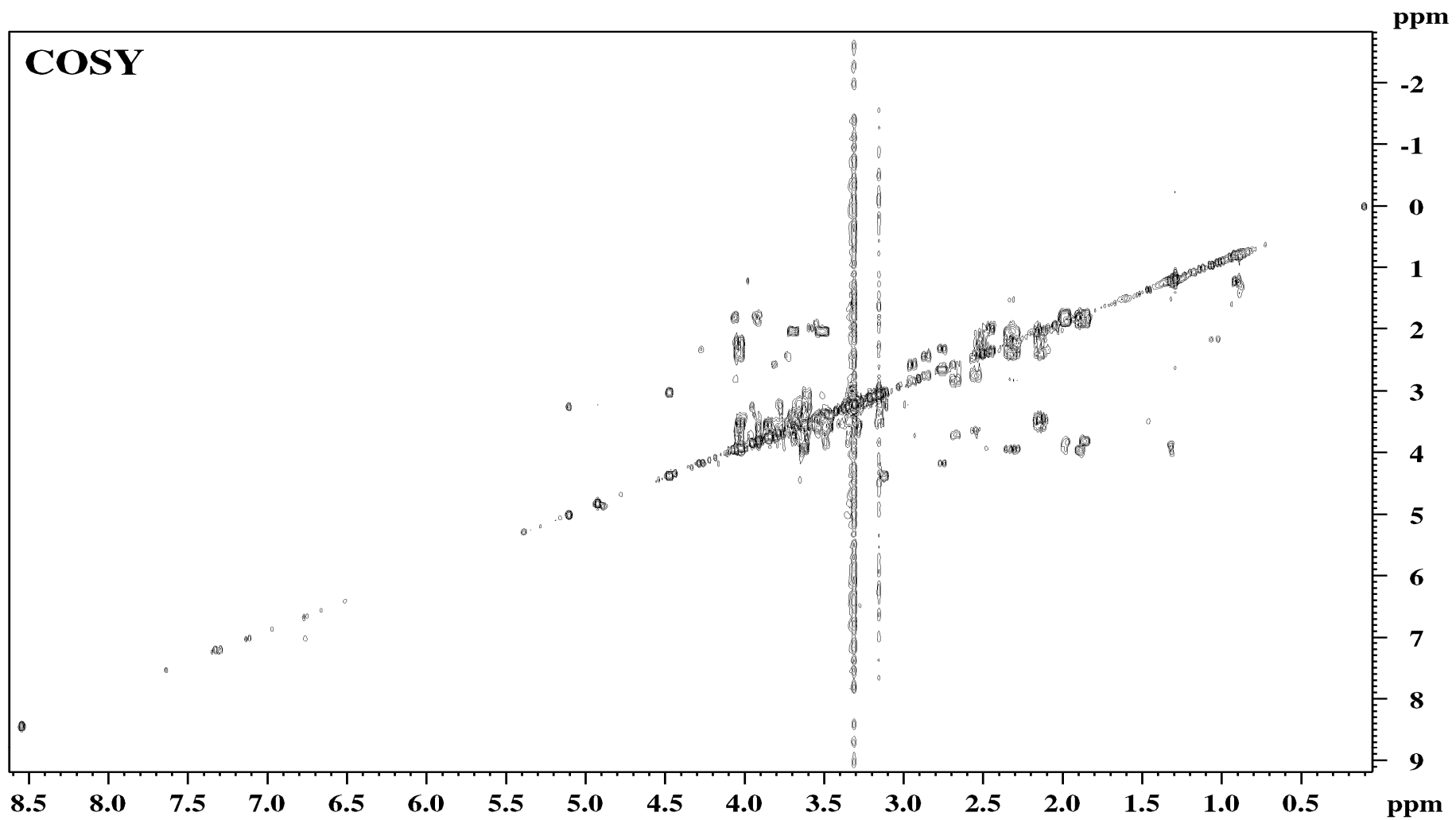


Figura 1. RMN de COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  do honeydew de *Toxoptera citricidus*.

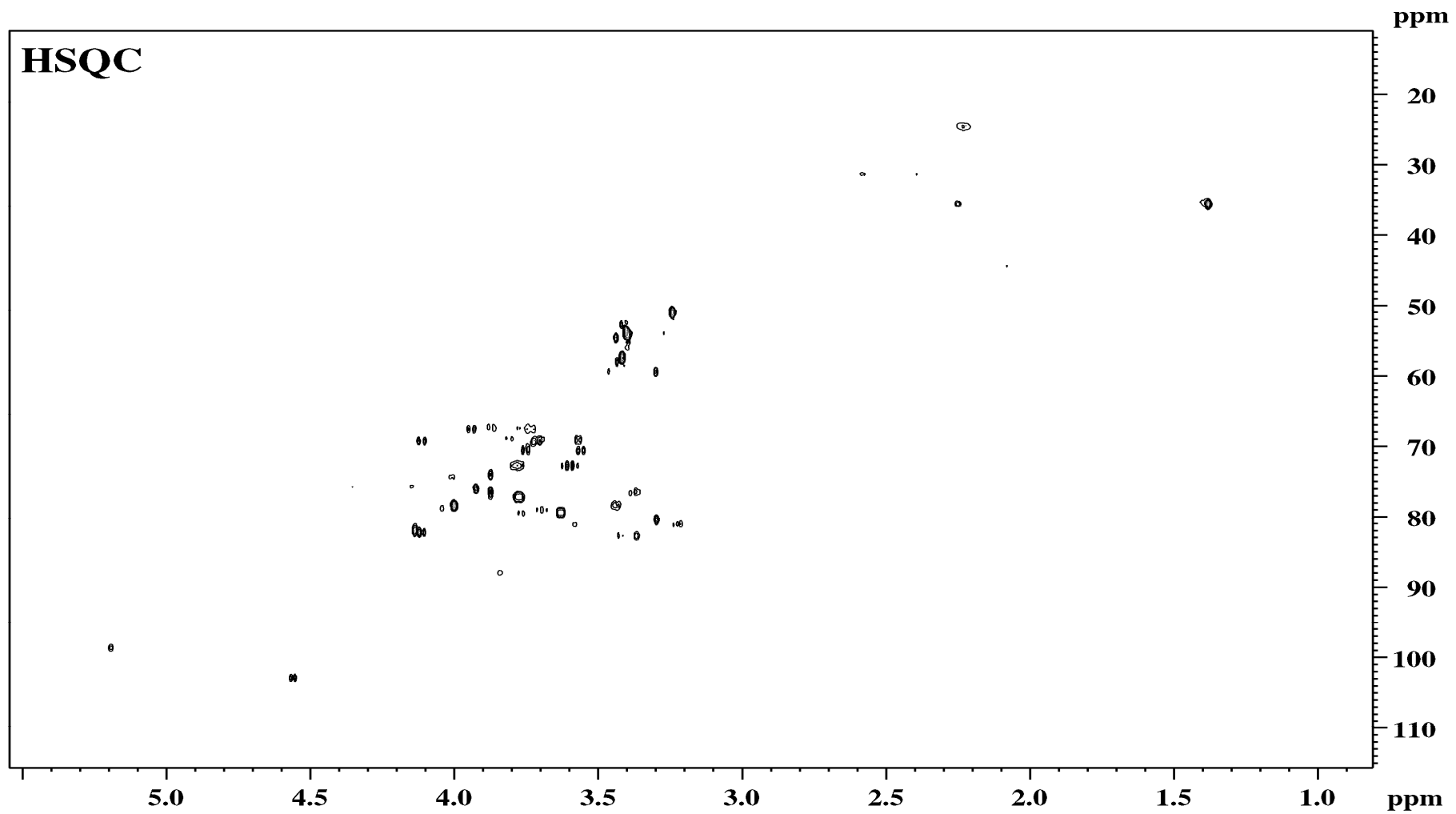


Figura 2. RMN de HSQC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  do honeydew de *Toxoptera citricidus*.



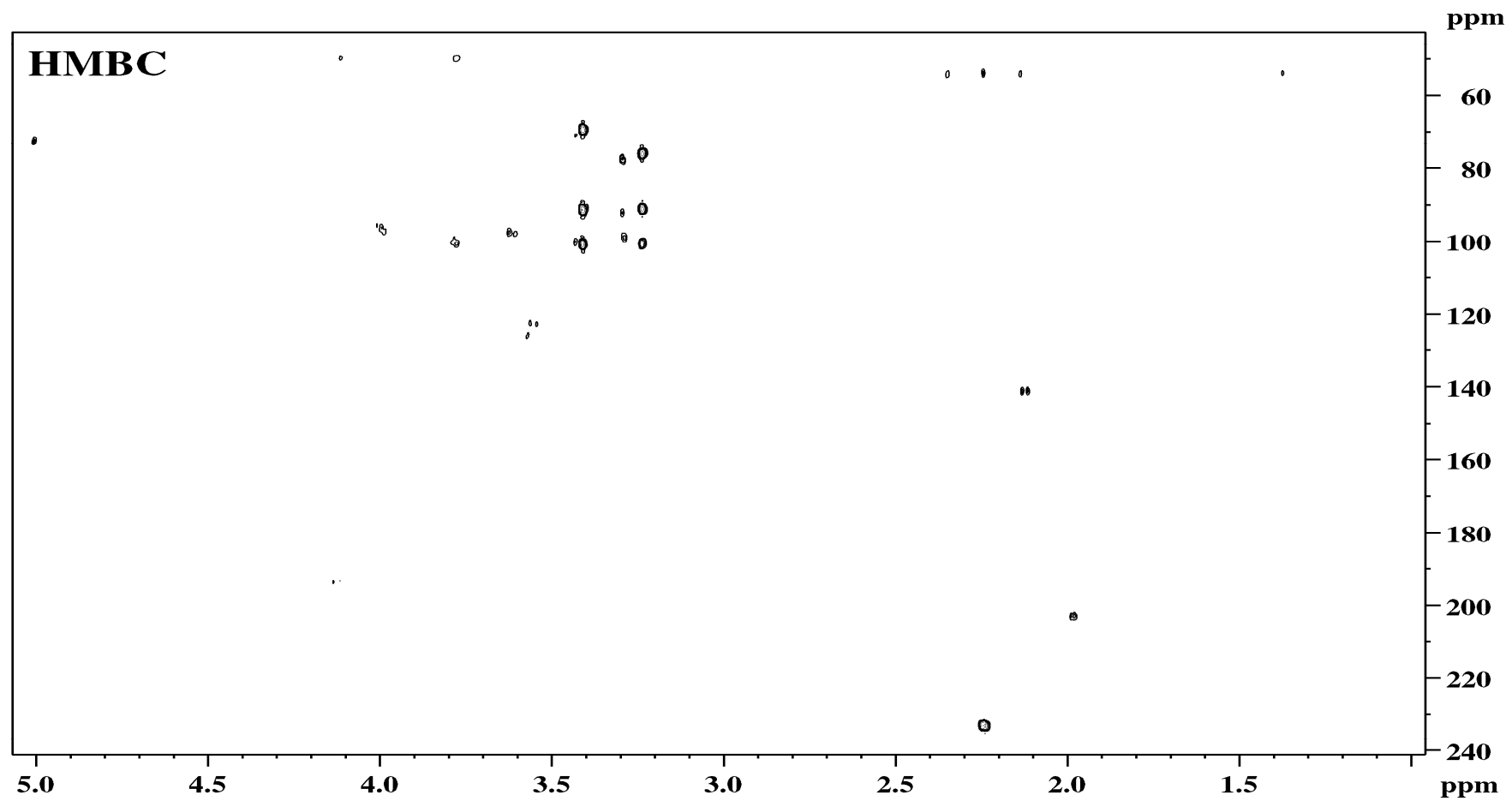


Figura 3. RMN de HMBC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  do honeydew de *Toxoptera citricidus*.