

Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ESPÉCIES
VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE ALELOQUÍMICOS**

Luiz Alberto da Silveira Mairesse

PPGA

Santa Maria, RS, Brasil

Janeiro - 2005

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ESPÉCIES
VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE ALELOQUÍMICOS**

Luiz Alberto da Silveira Mairesse

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção
Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para a obtenção do grau de

Doutor em Agronomia

PPGA

Santa Maria, RS, Brasil

Janeiro - 2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ESPÉCIES
VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE ALELOQUÍMICOS**

Elaborada por

Luiz Alberto da Silveira Mairesse

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof. Dr. Ervandil Corrêa Costa
(Presidente/Orientador)**

Prof^a Dra. Maria Helena Bodanesi Zanettini

Prof. Dr. Ricardo Silveiro Balardin

Prof. Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes

Prof. Dr. Antônio Carlos Ferreira da Silva

Santa Maria, 11 de janeiro de 2005

Dedico
Aos meus pais,
aos meus filhos
Patrícia,
Letícia,
Pablo
e Rafaela,
e ao meu neto Rafael

AGRADECIMENTOS

Muito especial ao Prof. Dr. Ervandil Corrêa Costa, pela sábia orientação e por ter sido quem me incentivou, convencendo-me a realizar este curso.

Ao prof. Dr. Ricardo Silveiro Balardin pelo apoio e ensinamentos durante o período de desenvolvimento do curso e deste trabalho, além da ajuda na elaboração dos resumos em inglês.

À colega Mônia de Almeida Schluter pela ajuda, através de seu pai, na elaboração dos resumos em inglês.

Em especial aos professores Dr. Dionísio Link, Dr. Fernando Nicoloso, Dr. Nelson Kruse e Dr. Jerson Carús Guedes, pelos ensinamentos, que muito contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito especial à laboratorista farmacêutica, M. Sc. Maria Neves Deconto Weber e ao estagiário acadêmico Daniel S. Herter, pelo auxílio durante a realização dos trabalhos de laboratório.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Ferreira da Silva, Dr. Osmar Santos, Dra. Sônia, Dr. Lindolfo Storck, Dr. Sidnei José Lopes e Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini pelo apoio e ensinamentos.

Ao professor Dr. Adelino Alvarez Filho, pela ajuda inestimável na identificação e confirmação das espécies vegetais utilizadas neste trabalho.

À Dra. Maria Mezzomo da Silva, pelas informações sobre a obtenção de extratos vegetais.

Especialíssimo aos funcionários (as) e colegas de curso.

Com saudade à minha sempre amiga Noêmia Carvalho dos Santos, que trabalhou ombro-a-ombro nesta pesquisa até o fim e que inesperadamente nos abandonou.

Enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, ao Brasil e aos brasileiros que financiaram esta pesquisa, aos quais procurarei retribuir com mais trabalho, até onde minhas forças permitirem.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. As pragas agrícolas e seu controle: histórico e antecedentes.....	11
2.2. Alternativas no controle de pragas.....	15
2.2.1. Controle alternativo no Manejo Ecológico de Pragas em conexão com o estudo de extratos vegetais.....	16
2.2.1.1. Inseticidas biológicos e virulíferos na interação com os extratos vegetais.....	16
2.2.1.2. Inseticidas fisiológicos ou reguladores de crescimento podem estar contidos nos extratos vegetais.....	18
2.2.1.3. Feromônios de origem vegetal.....	19
2.2.2. Alternativas através da agricultura orgânica e agroecologia.....	20
2.3. A retomada dos inseticidas de origem vegetal à luz dos novos conhecimentos.....	21
2.3.1. Os inseticidas de origem vegetal (extratos vegetais) e a busca por novos mecanismos de ação ou novos sítios-alvo.....	26
2.4. Metabólitos secundários das plantas como precursores de novas moléculas praguicidas.....	28
2.4.1. Principais classes de metabólitos secundários.....	30
2.4.1.1. Terpenos.....	30
2.4.1.2. Compostos fenólicos.....	34
2.4.1.3. Compostos nitrogenados.....	37
2.5. O papel dos fito-hormônios na resposta das plantas a estresses bióticos.....	39

2.5.1. Resposta das plantas ao ataque de pragas.....	42
2.5.2. Considerações sobre expressão gênica e transdução de sinal.....	44
2.5.3. Sinalização para resposta local e sistêmica de plantas ao ataque de patógenos e a fitófagos.....	50
2.5.4. Biossíntese do etileno e expressão de genes de resposta ao etileno.....	54
2.5.5. Ação do etileno na defesa das plantas contra pragas.....	64
2.5.6. Interações de respostas de fito-hormônios.....	69
2.6. Genes de resistência e de mecanismos de defesa das plantas: perspectivas com o advento da engenharia genética.....	74
2.6.1. O melhoramento genético à luz dos novos conhecimentos.....	76
2.6.2. Genes relacionados aos mecanismos de defesa das plantas.....	80
2.6.3. Plantas com ação inseticida e fungicida: novos genes de resistência.....	84
2.6.4. Plantas resistentes a herbicidas e plantas que produzem seus próprios herbicidas.....	94
2.7. A alelopatia e a contribuição à prospecção de novas moléculas bioativas e de genes de resistência a pragas.....	97
2.7.1. A alelopatia na agricultura no controle de ervas daninhas.....	99
2.7.2. A alelopatia e o fenômeno da hormese.....	101
2.7.3. Condições a serem observadas nos testes de alelopatia.....	104
3. PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	109
Resumo.....	109
Abstract.....	110
3.1. Introdução.....	111
3.2. Revisão de literatura.....	112
3.3. Material e métodos.....	115
3.4. Resultados e discussão.....	121

3.5. Conclusões.....	132
4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ALELOPÁTICA DE <i>Cymbopogon citratus</i> (Stapf.) DC.	133
Resumo.....	133
Abstract.....	134
4.1. Introdução.....	135
4.2. Revisão de literatura.....	136
4.3. Material e métodos.....	140
4.4. Resultados e discussão.....	143
4.5. Conclusões.....	165
5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE MARCELA, <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC	166
Resumo.....	166
Abstract.....	167
5.1. Introdução.....	168
5.2. Revisão de literatura.....	169
5.3. Material e métodos.....	174
5.4. Resultados e discussão.....	179
5.5. Conclusões.....	207
6. PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE COMPOSTOS INSETICIDAS.....	209
Resumo.....	209
Abstract.....	210
6.1. Introdução.....	211
6.2. Revisão de literatura.....	214
6.3. Material e métodos.....	219
6.3.1. Material entomológico.....	220
6.3.2. Criação de <i>S. frugiperda</i>	220
6.3.3. Manejo e criação de adultos de <i>S. frugiperda</i>	220
6.3.4. Manejo das lagartas de <i>S. frugiperda</i>	221
6.3.5. Adição dos extratos vegetais à dieta artificial.....	222

6.3.6. Coleta e estocagem do material vegetal e preparação de extratos vegetais.....	222
6.3.7. Obtenção de óleos essenciais e destilados.....	223
6.3.8. Condições dos experimentos, dados de observação coletados e análise estatística.....	224
6.4. Resultados e discussão.....	227
6.5. Conclusões.....	232
7. AVALIAÇÃO DA AÇÃO INSETICIDA DO EXTRATO DE <i>Meliah azedarach</i> L. VAR. UMBRACOLIFERA (KNOX) REHDER (MELIACEAE) EM LAGARTAS DE <i>Spodoptera Frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	234
Resumo.....	234
Abstract.....	235
7.1. Introdução.....	236
7.2. Revisão de literatura.....	238
7.3. Material e métodos.....	243
7.4. Resultados e discussão.....	246
7.5. Conclusões.....	252
8. AVALIAÇÃO DA AÇÃO INSETICIDA DE EXTRATOS DE <i>Rollinia silvatica</i> (St. Hil.) Mart. (ANONACEAE) NO CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	253
Resumo.....	253
Abstract.....	254
8.1. Introdução.....	254
8.2. Revisão de literatura.....	256
8.3. Material e métodos.....	259
8.3.1. Coleta, estocagem do material vegetal e preparação de extratos vegetais.....	259
8.3.2. Material reagente, manejo e aplicação dos tratamentos.....	260
8.3.3. Análise estatística.....	261

8.3.4. Biotestes.....	261
8.4. Resultados e discussão.....	262
8.5. Conclusões.....	268
9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE EXTRATOS DE <i>Rollinia silvatica</i> (St. Hil.) Mart. (ANNONACEAE) NO CONTROLE DE <i>Ascia monuste orseis</i> (Latr., 1819).....	269
Resumo.....	269
Abstract.....	270
9.1. Introdução.....	270
9.2. Revisão de literatura.....	271
9.3. Material e métodos.....	276
9.4. Resultados e discussão.....	277
9.5. Conclusões.....	280
10. CONCLUSÕES GERAIS.....	281
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	284

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE ESPÉCIES VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE ALELOQUÍMICOS

AUTOR: LUIZ ALBERTO DA SILVEIRA MAIRESSE

ORIENTADOR: ERVANDIL CORRÊA COSTA

Local e data da Defesa: Santa Maria, 11 de janeiro de 2005.

De tempos em tempos a humanidade se depara com novos desafios, diante do esgotamento do potencial científico e tecnológico, no limiar de um novo patamar de desenvolvimento. Na agricultura o novo desafio é produzir mais em áreas cada vez menores, com o mínimo de impacto ambiental e social. A necessidade de substituir os produtos químicos utilizados na agricultura, seja pela ineficiência cada vez maior no controle de pragas, seja pela busca por novas moléculas que atendam às necessidades atuais, impõe à ciência imensos esforços na construção de um novo paradigma ecológico. Visando prospectar espécies vegetais promissoras, como fontes de metabólitos secundários, testou-se, na Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS) diversos extratos de espécies nativas e exóticas da Região Sul do Brasil, em ensaios de alelopatia, em laboratório (fotofase 14, $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) com sementes e plântulas de *Lactuca sativa* (alface), *Bidens pilosa* (picão-preto) e *Triticum aestivum* (trigo-comum), e bioensaios com lagartas (fotofase natural, $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $65 \pm 10\%$) de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho-do-milho) e *Ascia monuste orseis* (lagarta-da-couve). Objetivando também desenvolver metodologia eficiente, o trabalho foi elaborado em diversas etapas. Os bioensaios básicos de alelopatia ou preliminares, onde participaram 56 espécies em seis experimentos, constaram na aplicação de extratos em dose única (1/3, p/v) em sementes e plântulas de *L. sativa*, visando selecionar extratos aparentemente mais promissores, ou seja, os de mais alto grau alelopático, seja inibindo, seja estimulando o crescimento e desenvolvimento. Dentre os extratos que causaram efeitos negativos mais drásticos, o da espécie *Cymbopogum citratus* (capim-cidrô) proporcionou, através de seu extrato aquoso, nove ensaios de dose-resposta, utilizando-se, como material reagente, sementes e plântulas de *L. sativa*, *B. pilosa* e *T. aestivum*. Por outro lado, dentre as espécies, cujos extratos apresentaram efeitos alelopáticos positivos, a espécie *Achyrocline satureioides* (marcela) destacou-se das demais, determinando a composição de dez bioensaios de dose resposta com *L.*

sativa, *B. pilosa* e *T. aestivum* e um experimento com *L. sativa*, sob hidroponia. Extratos vegetais supostamente mais promissores como inseticidas compuseram os experimentos de laboratório com lagartas de *S. frugiperda*, criadas artificialmente, e com lagartas de *A. monuste orseis*, oriundas do campo. Os testes com *S. frugiperda* se constituíram em experimentos básicos ou preliminares, totalizando 4 bioensaios, onde foram avaliados extratos de 21 espécies, aplicados sobre os insetos e em mistura com a dieta artificial. Em fase mais avançada, ensaios de dose-resposta de extratos de *Rollinia silvatica* (ariticum) foram conduzidos contra *S. frugiperda* e *A. monuste orseis*. Extratos (óleo essencial e extrato aquoso) de *R. silvatica* foram avaliados em *S. frugiperda*, através de quatro bioensaios e em *A. monuste orseis* por três experimentos de laboratório e testes preliminares de campo. O efeito de extratos de *Melia azedarach* (cinamomo), incorporados às dietas de *S. frugiperda*, foi avaliado em três experimentos. Os biotestes foram conduzidos em blocos ao acaso e os resultados permitiram concluir que a metodologia utilizada foi altamente eficiente na prospecção de espécies vegetais promissoras como fontes de agentes bioativos e os experimentos mais avançados permitiram avaliar a bioatividade, através de curvas de dose-resposta, resultando na obtenção de informações decisivas para seguir nos processos de identificação de moléculas biocidas e bioestimulantes. *C. citratus* mostrou ser um poderoso biocida, com características herbicidas, inclusive mostrando efeitos horméticos com doses sub letais. *R. silvatica*, através de seus extratos, demonstrou conter compostos inseticidas potentes, inclusive agentes com ação neurotóxica. *M. azedarach*, pelos extratos aquosos de suas folhas, mostrou ser um potente inseticida de ação por ingestão. Por outro lado, *A. satureioides*, através dos experimentos conduzidos, apresentou características que permitem concluir que seu extrato contém um ou mais produtos com ação inibidora, estimulante e protetora do crescimento e desenvolvimento. Enfim, os resultados obtidos com um número relativamente pequeno de espécies vegetais sugerem a existência de um potencial praticamente inesgotável nas espécies vegetais, na identificação e síntese de novas moléculas, tendo como meta uma agricultura mais sustentável.

ABSTRACT

Tesis Doctoral
Agronomy Post-Graduation Program
Federal University of Santa Maria, Brazil

BIOACTIVITY EVALUATION OF EXTRACTS FROM VEGETAL SPECIES AS SOURCE OF ALLELOCHEMICALS

AUTHOR: LUIZ ALBERTO DA SILVEIRA MAIRESSE

ADVISER: ERVANDIL CORRÊA COSTA

Place and Date of Examination: Santa Maria, January 11th, 2005.

ABSTRACT

Periodically humanity is challenged to discovering new ways to progress, since conventional technologies fatally lose their function at the frontier of a new age. In agriculture the new challenger is get more productivity in less area, with less environment and social impact. The necessity of discovering new efficient and socially acceptable biocide molecules is the main goal in the modern and sustainable agriculture. Aiming to screen plant species as source of secondary metabolic with allelopathic effects and potentially useful, bioassays of allelopathy were performed, during the period from November 2002 to April 2004, at Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil. Extracts from 56 species were tested at laboratory (fotofase14, $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) on seeds and seedlings of *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa* and *Triticum aestivum*.and from 21 were applied on *Spodoptera frugiperda* and *Ascia monuste orseis* (natural fotofase, $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $65 \pm 10\%$). Also aiming to develop efficient methodology, this work was organized by phases. In the six basic bioassays (screening) extracts of 56 species (dose 1/3, p/v) were tested on seeds and seedlings of *L. sativa*. The more promising extracts, with more drastic allelopathic effects (negative and positive) passed to new phase, where doses of extracts were applied on seeds and seedlings of *L. sativa*, *B. pilosa* and *T. aestivum*. On this way, extract of *Cymbopogum citratus*, that shows drastic inhibitory effects, resulted in nine bioassays of doses. Similarly, doses of extract of *Achyrocline satureioides*, that shows positives effects, were tested in 11 experiments. In Four basic bioassays, extracts of 21 species were tested for *S. frugiperda*. The more promising extracts composed specific experiments with *S. frugiperda* and *A. monuste orseis*. The extracts were applied on larvae of *S. frugiperda* and included on artificial diets. On *A. monuste orseis* the extracts were applied on larvae and leaves of *Brassica oleracea*. Therefore, three set of bioassays were carried out: *Rollinia silvatica* was tried in four and three assays to

S. frugiperda and *A. monuste orseis*, respectively. *Melia azedarach*, other promising source of insecticide, was tested on *S. frugiperda* in three experiments. The experimental design adopted was the randomized complete block, and the methodology used shows to be efficient to select promising species as source of bioactive agents. The advanced experiments permitted to study bioactivity by curves (equations) dose-responses and resulted on valuable information to go forward on procedures to identify molecules of biocide and stimulatory agents. *C. citrates* showed to be a powerful biocide, with herbicidal characteristics, including demonstrating occurrence of hormetic effects. *R. silvatica*, through their extracts, demonstrated to be source of powerful insecticides, including agents with neurotoxic action. *M. azedarach*, by extracts of leaves, showed to be an efficient insecticide by ingestion. On the other side, extract of *A. satureioides*, presented inhibitory, stimulatory and protective action on growing and development of reagent material. Finally, the results obtained with a relatively small number of vegetal species allow to conclude there is a practically inexhaustible potential in plants on research of new molecules for the central goal: a more sustainable agriculture.

1. INTRODUÇÃO

Há mais de 10 mil anos atrás, o homem descobriu que não precisava mais andar de um lado para outro, deslocando-se em busca de alimento. A criação de animais talvez tenha sido a primeira atividade organizada de nossos ancestrais. Cuidando de seus animais e cultivando suas plantas, os seres humanos descobriram também a diversificação dentro da mesma espécie e começou então o melhoramento genético animal e vegetal.

Apesar das evidências relativamente às primeiras atividades organizadas por nossos ancestrais, não é difícil de se imaginar que se perde no tempo a utilização das plantas aromáticas e medicinais. Observando a natureza e por experiência própria e direta, o homem veio lentamente separando as plantas tóxicas das úteis, descobrindo e aperfeiçoando a utilização de ambas. Esta sim, talvez tenha sido a primeira atividade organizada do homem, apesar de restrita a determinados indivíduos da comunidade. Entretanto, certamente o grande avanço nesta área só veio com o advento da agricultura, que permitiu ao *Homo sapiens*, além de cultivar suas plantas, entendê-las melhor e melhorá-las geneticamente. Ao mesmo tempo, começava aí a constância cíclica da solução de um problema, gerando outros problemas, obrigando a humanidade a avançar mais e mais no conhecimento.

As cultivares foram melhoradas e as lavouras tornavam-se mais sujeitas ao ataque de pragas, neste trabalho conceituadas, de acordo com NORRIS et al. (2003), como todos os organismos que alteram (ou potencialmente hábeis para alterar) o processo fisiológico normal de um cultivo, causando danos e perdas no rendimento. Seleccionavam-se linhagens menos tóxicas e mais palatáveis e se retiravam das plantas

suas defesas naturais, colocando o homem diante de problemas cada vez mais complexos.

Entretanto, até agora, apesar dos erros nas relações entre os homens e com a própria natureza, a humanidade tem sido relativamente vitoriosa: a partir dos novos conhecimentos gerados por novas descobertas, tem sido viável solucionar gradativamente os novos problemas gerados, tanto que foi possível até agora aumentar a população da Terra, de tal forma que se ainda há muita fome, esta não se deve a altas densidades demográficas, mas sim a outros fatores político-sócio-econômicos. Tanto, que é geralmente nos países mais densamente povoados que as condições de vida das populações são relativamente melhores.

A evolução da sociedade humana parece assemelhar-se ao movimento de um ponto em espiral ascendente, cuja projeção vai redesenhando uma circunferência. Há uma aparente repetitividade em função dessa projeção; entretanto a roda da história anda somente para frente em movimento recursivo gerando o novo, que não somente vai substituindo o velho, mas que também vai sendo gerado por ele.

Assim, os conhecimentos acumulados ao longo de nossa história devem ser empacotados, como o DNA nos cromossomos, e preservados, não somente para a pura e direta utilização, mas como moldes a novos projetos de avanços científicos e tecnológicos.

As tentativas de nossos antepassados, muitas vezes pouco eficientes na solução de problemas, podem ter hoje soluções viáveis, com a reciclagem à luz dos novos conhecimentos, utilizando-se as ferramentas (tecnologias) novas disponíveis. As tentativas no passado, nos ensina a história, têm sido soluções eficientes no futuro, sob novas condições.

Tão logo surgiram as pragas, com a domesticação das espécies, vieram as tentativas de controlá-las. Evidentemente, que conhecendo a toxidez de algumas espécies, o homem buscou nelas a proteção para seus cultivos.

A utilização de “plantas inseticidas” já vem de séculos, pelo que se pode averiguar. Utilizadas inicialmente na sua forma mais natural (pó e solução aquosa), com os avanços da química, foi possível extrair seus princípios ativos e utilizá-los no controle de pragas, principalmente insetos. Deixaram de ser utilizados, não tanto pela maior eficiência momentânea dos organossintéticos, mas principalmente pela maior economicidade destes, sob o prisma e condições da época.

Se possível fosse avaliar os danos (apesar dos benefícios incontestáveis) causados principalmente pelo advento dos inseticidas sintéticos, provavelmente a tecnologia anterior não fosse praticamente abandonada. Entretanto, só agora, à luz de novos conhecimentos, é possível reabsorvê-la e reciclá-la, pois sua viabilidade máxima se dará em novo patamar, o que não impede o sucesso relativo e limitado de sua utilização na forma tradicional junto aos pequenos produtores rurais, com o auxílio de novas metodologias de preparo simples. Acrescente-se ainda que o consumo de agrotóxicos, principalmente nos países periféricos tem aumentado significativamente. No Brasil, de 1992 a 1999, as vendas apresentaram um crescimento significativo, passando respectivamente de 947 milhões para 2,3 bilhões de dólares (TSUNECHIRO & FERREIRA, 2000), superando os 2,5 bilhões de dólares a partir do ano 2000. De acordo com os mesmos autores, a participação dos inseticidas passou de 20,5 % em 1992 para 25,6 % em 1999. O crescimento do consumo de fungicidas é também bastante evidente, provavelmente devido a dificuldades semelhantes ao que ocorre com o controle de insetos. No caso brasileiro há ainda uma particularidade muito importante: o surgimento da “ferrugem asiática” como praga limitante da cultura da soja nos últimos anos determinou, por si só, o deslocamento dos inseticidas da liderança no consumo de agrotóxicos no País. Em relação ao consumo de herbicidas a situação é semelhante, mas com algumas peculiaridades e perspectivas mais animadoras em curto prazo.

Por outro lado, apesar do consumo crescente de agrotóxicos, os prejuízos devidos às pragas têm aumentado mundialmente, de tal maneira que para um aumento de dez vezes no uso de defensivos agrícolas nos últimos 50 anos, correspondeu paradoxalmente a uma duplicação nas perdas por ataque de pragas, com agravante de uma maior intensidade de problemas de toxicidade, acúmulo de resíduos e resistência a pragas (CARVALHO, 1999). Não foi possível identificar se o autor levou em consideração a proporcionalidade relativa ao aumento da área cultivada, o que provavelmente não o fez. De qualquer forma, é evidente o crescente aumento das perdas por ataque de pragas, acompanhado da diminuição da eficiência dos produtos químicos. Isto se deve a que a indústria química não tem conseguido mais acompanhar a velocidade com que as populações de pragas têm se adaptado, tornando-se resistentes aos agroquímicos, através da seleção de mutantes pré-existentes nas populações, ou mesmo por processos de detoxificação, como pode ocorrer com artrópodes fitófagos. Além do esgotamento de fontes de resistência também a patógenos dentro da espécie, aumenta cada vez mais a quantidade de moléstias limitantes do rendimento para as principais culturas, obrigando os produtores a investirem mais em fungicidas. Acrescente-se também a maior facilidade de surgimento de resistência nas populações de microorganismos, tanto em relação à adaptação do patógeno à planta, quanto ao próprio produto químico.

Com o advento da engenharia genética, a resistência genética deverá substituir em muito o uso dos agrotóxicos convencionais, principalmente inseticidas e fungicidas. Paralelamente ao uso de cultivares resistentes, moléculas sintetizadas, derivadas de plantas e de outros organismos ou mesmo produzidas em organismos geneticamente modificados, conduzirão o conceito de agrotóxico a um novo patamar. Ganham em importância então os herbicidas, quando se generaliza em todo o mundo o uso da resistência de plantas a herbicidas não seletivos. É o caso da resistência ao glifosato e glufosinato de amônio, já utilizados em mais de

40 milhões de hectares em todo o mundo. Uma das maiores vantagens desta metodologia é a possibilidade de se utilizar cada vez mais produtos mais adequados às novas exigências da sociedade. Por sua vez, já se abrem perspectivas de substituição desta tecnologia pela utilização de plantas transgênicas alelopáticas, que produzem os seus próprios herbicidas.

Imaginando-se a necessidade de um aumento crescente na produção e produtividade dos cultivos agrícolas, devido ao aumento da população mundial e somando-se a possibilidade da realização de conquistas sociais oriundas de uma melhor distribuição de renda, que acarretaria uma demanda ainda maior por alimento, em quantidade e qualidade, tem-se que se não forem tomadas providências imediatas, a tendência é o estabelecimento do caos ambiental, inviabilizando a concretização de quaisquer aspirações da humanidade.

Segundo VENDRAMIN & CASTIGLIONI (2000) o ressurgimento do interesse pelos inseticidas de origem vegetal originou-se da necessidade de buscar novas substâncias no controle de pragas, sem os problemas ambientais, resíduos em alimentos, efeitos nocivos sobre predadores e outros organismos úteis, retardando o aparecimento de resistência a inseticidas, comuns na utilização dos agrotóxicos convencionais. Acrescentam ainda, os autores, que a diminuição na disponibilidade de moléculas sintéticas, com características inseticidas e questões econômicas envolvidas, reforçam o interesse em alternativas, como as representadas por ingredientes ativos tóxicos dos vegetais.

O importante, entretanto, é ressaltar que uma alternativa efetiva sempre é nova e a simples repetição de soluções do passado não são viáveis, pois não são sustentáveis. A retomada que a ciência pretende, dar-se-á em um novo patamar, à luz dos novos conhecimentos e de novas necessidades. O avanço da bioquímica, da biofísica, da genética molecular, da biotecnologia, da informática, enfim, das ciências, favorecem não a solução de continuidade das tecnologias ditas

convencionais, mas no aprimoramento das mesmas e nas relações mais equilibradas do homem com a natureza. E isto só é possível com o avanço da ciência e da tecnologia. BRUNHEROTTO (2000) considera que os avanços da pesquisa científica em todas as áreas e a revolução da biotecnologia moderna fizeram com que o estudo de extratos de espécies vegetais com potencial praguicida deixasse de ser uma estratégia puramente empírica, como o foi até então.

O país que não investir em pesquisa científica, especialmente na área agrícola (melhor seria dizer, área de produção de alimentos), que é a mais estratégica de todas, capaz inclusive de fortalecer as demais, pela extrema interdisciplinaridade que seu desenvolvimento exige, estará fadado a continuar, cada vez mais, dependente de que, pretensamente, outros países solucionem seus problemas. Tais soluções “alienígenas”, entretanto, jamais atenderão às reais necessidades de uma nação. Pelo contrário, gerarão ainda mais dependência... MONGE (2001) considera que nos países subdesenvolvidos existe uma tendência em se valorizar mais o produto natural com atividade biológica, do que o produto da síntese, esquecendo-se que os dois têm grande importância, pois atualmente a sociedade é muito mais dependente dos produtos bioativos de síntese do que dos produtos naturais, que normalmente servem de protótipos para a síntese de novos produtos.

O Brasil, país de vocação agrícola, possuidor do maior número de espécies vegetais do catálogo da diversidade florística mundial, tem sido chamado internacionalmente a responder pelo descaso com que tem tratado o ambiente, de maneira que temos sido classificados pela opinião pública mundial como predadores ambientais. Isto tem levado à formação de conceitos e sugestões perigosas à soberania nacional, como a internacionalização da Amazônia, idéia esta, que nada mais é do que a materialização dos erros na condução da política de conservação e exploração de nossos recursos. Tais reservas ou recursos são tão imensos e tão importantes que o desequilíbrio dos mesmos é capaz de

afetar regiões muito além de nossas fronteiras, o que justifica plenamente as pressões internacionais que o País tem sofrido. Como tais cobranças não ficam apenas no plano retórico, mas atingem diretamente todos os programas que dependem de financiamento ou apoio internacional, os prejuízos gerados aos brasileiros pelo descaso para com a natureza são incomensuráveis.

O pouco incentivo à pesquisa com plantas aromáticas e medicinais no país mais rico nessas espécies, faz com que existam mais estrangeiros aqui, trabalhando com as mesmas, com recursos dos seus países de origem, do que pesquisadores brasileiros, pela falta de apoio financeiro a nossas instituições de pesquisa. HOMMA, (1999) considera que nossa legislação é extremamente prejudicial aos interesses nacionais e cita como exemplo a Lei de Propriedade Industrial como sendo um verdadeiro convite à biopirataria de plantas medicinais e seus princípios ativos, pigmentos, essências diversas, inseticidas naturais e outros. Conclui ainda, afirmando que cresce assustadoramente o número de produtos de nossa flora, patenteados no exterior, de forma que se não houver uma mudança drástica na política governamental, brevemente não poderemos nem mais dispor de nossa própria vegetação sem que tenhamos que pagar pela utilização da mesma. Entretanto, parece que o problema principal não decorre da legislação brasileira, que é semelhante a de outros países, inclusive do Primeiro Mundo, mas reside quase que exclusivamente na falta de recursos destinados à pesquisa científica.

O Rio Grande do Sul é o estado onde, provavelmente, a devastação ambiental tenha sido a maior do País. A destruição de nossas florestas foi praticamente até às últimas conseqüências e com isto, uma quantidade imensa de espécies vegetais praticamente desapareceu de nosso cenário. Pouco resta hoje de nossa cobertura florestal nativa: dos aproximadamente 40 % de cobertura natural, ficaram apenas de 1,8 a 3% no máximo, os quais estão sendo gradativamente substituídos por cultivos homogêneos de espécies exóticas, cuja área reflorestada já alcança 1,7

% da área total do Estado (COSTA, 2000). Uma boa notícia foi a finalização, em 2002, do Inventário Florestal Contínuo do Estado, executado pela Universidade Federal de Santa Maria, que estimou em 17,53 % a cobertura vegetal nativa atual do Rio Grande do Sul, mesmo que a maior parte dessas áreas em recuperação seja constituída de árvores de cinco a oito metros de estatura, que comumente aparecem após o abandono dos campos (fase inicial de florestas secundárias).

Adicione-se ainda que nosso estado nas últimas décadas investiu recursos enormes na monocultura e desestimulou a diversidade de cultivo, dificultando ou até mesmo impedindo, por falta de financiamento, o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. Se acrescentarmos a isto tudo que nos últimos 50 anos o Rio Grande do Sul foi, proporcionalmente, o maior consumidor de agrotóxicos do País, a situação torna-se dramática para este estado, em termos de preservação ambiental. Todas estas assertivas obviamente se aplicam ao Brasil, que de uma maneira geral tem se destacado mundialmente pelo descaso com que se trata aqui a saúde da população e o ambiente em que se vive.

Pesquisas sobre a utilização de extratos de espécies vegetais no controle de pragas, como opção aos produtos convencionais, convergem plenamente com os objetivos da agroecologia e como todos os trabalhos científicos que visem a preservação e recuperação do meio, merece atenção governamental, pela estreita ligação com as questões ambientais e com a própria agroecologia como um todo. Existe certamente uma ligação inexorável da bioquímica e biotecnologia, ou mais apropriadamente, engenharia genética, com trabalhos de base, na busca de novas moléculas bioativas e na prospecção de genes de resistência a pragas. Assim, definitivamente, a primeira etapa desses estudos, e que se propõe a avaliar a bioatividade de extratos vegetais, coloca tal objetivo como central, dentro de um programa geral de busca de sustentabilidade, baseado nos avanços da ciência e da tecnologia, em todas as áreas do conhecimento humano.

O presente trabalho, desenvolvido no *Campus* da Universidade Federal de Santa Maria, teve como objetivo geral avaliar a bioatividade de extratos de espécies vegetais a partir de bioensaios de alelopatia e com insetos.

Teve a pretensão também de fornecer informações necessárias para que, principalmente pequenos produtores possam, em curto prazo, utilizar extratos vegetais diretamente no controle de certas pragas, a partir de posterior realização de experimentos a campo.

Em médio prazo, o objetivo do trabalho foi o de fornecer informações preliminares visando a interação com a área de química, no sentido de avançar no aprofundamento das avaliações da bioatividade de extratos vegetais, testando suas frações e identificando as moléculas bioativas. Em termos de indústria, se pode pensar no isolamento e identificação dessas substâncias, visando a síntese de novas moléculas mais aceitáveis socialmente.

A médio e longo prazo, importantes informações sobre espécies vegetais promissoras poderão ser úteis para a área de biologia molecular, no sentido de se estar prospectando genes implicados na resistência de plantas a pragas, ou seja, responsáveis pela produção de substâncias inibidoras do crescimento e desenvolvimento das mesmas. Este tipo de resistência pode proporcionar maior segurança, seja em termos de maior dificuldade no surgimento de resistência, seja nas questões alimentares e ambientais.

Como a avaliação da bioatividade de extratos vegetais pode implicar também na descoberta de alelopatia positiva, o presente trabalho visou também a prospecção de agentes bioestimulantes, contidos nos extratos de espécies vegetais.

Objetivou-se também, através desta pesquisa, desenvolver uma metodologia simples e eficiente, para facilitar a realização de biotestes *in loco*.

Para a consecução desses objetivos, montou-se uma estratégia que se revelou adequada.

Primeiramente, os extratos vegetais foram testados em ensaios básicos de alelopatia, na dose de 1/3 (p/v) , na espécie *Lactuca sativa*. Os resultados conduziram à seleção de extratos de espécies mais promissoras para a realização de bioensaios de dose-resposta em *L. sativa*, *Bidens pilosa* e *Triticum aestivum*, além de experimentos com insetos (*Spodoptera frugiperda* e *Ascia monuste orseis*, de forma análoga. De maneira inversa, extratos de espécies vegetais, já tidos como biocidas, foram também avaliados nos ensaios de base, na tentativa de confirmação da bioatividade dos mesmos, através da metodologia utilizada.

Assim, para facilitar a compreensão do trabalho, as diversas fases foram divididas em capítulos. Os experimentos básicos de alelopatia e os básicos de inseticida formaram capítulos diferentes. Da mesma forma, cada extrato vegetal selecionado para compor bioensaios de dose-resposta contra sementes e plântulas, bem como com insetos reagentes, constituíram capítulos específicos.

A integração iniciada, com este trabalho, com outros departamentos da Universidade Federal de Santa Maria, pretendeu incrementar a evolução do processo de cooperação e interconexão com outras áreas, como a bioquímica e a biologia molecular, visando a elaboração de um projeto mais amplo, a nível institucional, ou mesmo interinstitucional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As pragas agrícolas e seu controle: histórico e antecedentes

A história da botânica é, em grande parte, a luta do homem para adaptar-se à natureza, utilizando as plantas na medicina, indústria e agricultura. As defesas fitoquímicas contra pragas são conhecidas pela humanidade desde a antigüidade (GALLUN & KHUSH, 1984), apesar da aplicação dos conhecimentos estar ainda na sua infância científica (NORRIS & KOGAN, 1984).

A defesa contra pragas fitófagas tem sido inegavelmente o maior problema que a humanidade tem enfrentado na produção de alimentos (FRANKEL, 1977) e os insetos sempre foram os principais vilões, causando desde pequenas e grandes perdas localizadas, até enormes prejuízos em vastas extensões de terra (ALLARD, 1960; DAHMS, 1967; ELLIOT, 1967; BREWBACKER, 1969).

Os ancestrais selvagens das espécies cultivadas estavam em equilíbrio com o ambiente e as espécies fitofágas (e, certamente, com os microorganismos também), quando então a domesticação (melhoramento genético) levou a uma dispersão geográfica e diferenciação genética do hospedeiro e, presumivelmente, das espécies consumidoras (FRANKEL, 1977). A heterogeneidade genética deve ter sido a principal causa da estabilidade dos cultivares primitivos durante dez mil anos.

Por outro lado, a emigração de nossas plantas cultivadas de seus centros de origem foi influenciada principalmente pelas glaciações, inundações, alterações climatológicas e pelas atividades humanas (Wulff,

1950), estas últimas, com tendência de serem sempre muito limitadas pelas exigências de habitat de cada espécie (ELLIOT, 1967).

O estudo da resistência de plantas a insetos data dos primeiros dias da entomologia aplicada e a literatura mais antiga contém vários exemplos significativos das diferentes respostas dos cultivares, diante do ataque dos insetos (ORTMAN & PETERS, 1984).

Mesmo antes de se conhecer as bases genéticas da resistência, a metodologia empírica trouxe muitos benefícios à humanidade, como por exemplo, no caso da filoxera da videira (*Daktulosphaira vitifoliae*), cujo problema foi resolvido no século XIX com a enxertia das variedades européias suscetíveis sobre cavalos americanos resistentes a esse pulgão (GALLO et al., 1988). O processo só não foi expandido para outras situações e outras culturas porque faltavam os conhecimentos básicos sobre genética mendeliana, mutações e outros.

É bastante conhecido o estudo genético clássico feito com *Phytophaga destructor*, a mosca hessiana do trigo. A resistência poligênica inicialmente encontrada em *Triticum durum* L. (tetraploide) foi transferida para diversas variedades de trigo comum (*T. aestivum* L.) desde 1942 (AUSEMUS et al. 1967; BREWBAKER, 1969). Extratos aquosos de plantas resistentes são capazes de inibir o crescimento de larvas da mosca de Hesse. Entretanto, a variedade Dawson de trigo, primeira a ser estudada (Califórnia, EUA), mostrou-se suscetível à praga na Índia, devido à diferenciação genética dos insetos nas duas localidades, demonstrando a capacidade de adaptação via seleção de mutantes existentes na população (ALLARD, 1960).

O moderno conceito das relações hospedeiro-consumidor tem sua origem nos estudos de Benedict Prevost, em 1807, que descobriu que a cárie do trigo (*Tilletia caries* e *T. foetida*) era provocada por um fungo (ALLARD, 1960).

Apesar da similaridade dos mecanismos de resistência a microorganismos patogênicos e insetos-pragas, houve um avanço muito

mais significativo no melhoramento genético em relação aos primeiros. As dificuldades em se estabelecer metodologias (bioensaios) adequadas para o estudo da resistência a insetos (SMITH et al., 1994) deve ter sido a causa desse relativo descompasso. Assim, apenas em 1936 surgiu um dos mais importantes trabalhos sobre resistência a fitófagos, sob controle genético, publicado por Cartwright e Wiebe; e somente após a Segunda Guerra Mundial é que houve realmente interesse no assunto por parte dos geneticistas (AUSEMUS et. al., 1967).

Mesmo que sejam relativamente poucos e recentes os trabalhos de transferência de resistência intervarietal a espécies herbívoras, é intrigante que tão rapidamente tenha se esgotado a variabilidade genética para resistência a insetos, como se referiu DAHMS (1967); o que é sugerido por ELLIOT (1967), como sendo facilitado pela atuação da seleção natural. Entretanto, não se pode excluir que a avaliação da variabilidade, realizada até aqui, contenha equívocos, e que à luz de novos conhecimentos, se possa dispor ainda de muita variabilidade extremamente útil.

Grande parte dessa situação se deve às dificuldades em se conhecer as bases químicas da resistência, o que somente na última década é que começou a ser incrementada, em função do avanço da bioquímica e da biotecnologia. O próprio uso de produtos de origem vegetal a partir de plantas defensivas teve sua utilização freada por falta de conhecimentos nessas áreas, resultando na sua inviabilização econômica.

Provavelmente, às dificuldades em se estabelecer técnicas de avaliação da resistência a insetos, somou-se a eficiência inicial dos inseticidas no controle de pragas. Entretanto, o que se viu nos anos seguintes foi a incrível adaptação dos insetos aos inseticidas sintéticos, de tal forma que o desenvolvimento da resistência a estes desbancou famosas fórmulas como a do DDT. Para ilustrar, concentrações de DDT, abaixo de 100 ppm serviam no início para matar moscas domésticas; entretanto, BREWBAKER (1969) já se referia há décadas atrás que

muitas linhagens não eram mais afetadas pelo inseticida, até mesmo na forma pura.

Até o advento de moléculas biocidas sintéticas (agrotóxicos), o uso de substâncias inseticidas extraídas de plantas, como o sulfato de nicotina, alcalóides da sabadilha, a rotenona e a piretrina era muito comum, principalmente nos países de clima tropical (LAGUNES & RODRIGUES, 1989). Mesmo atualmente, apesar do sucesso do controle biológico e do melhoramento genético para resistência a pragas, inclusive através da engenharia genética, ainda é relativamente rara a superação dos métodos convencionais de controle, através de agrotóxicos (OLSON et al. 1996; SACHS et al 1996).

Entretanto, se é bem verdade que a utilização de inseticidas tem até aumentado muito significativamente (TSUNECHIRO & FERREIRA, 2000), também não pode ser ignorado que as perdas na produção devidas ao ataque de pragas têm subido assustadoramente (CARVALHO, 1999), impondo à pesquisa alternativas com a máxima urgência.

As vantagens da homogeneidade genética chegaram com seus perigos e a vulnerabilidade genética, mais que uma possibilidade, passou a ser um sério problema desde a década de 1970 (FRANKEL, 1977). Os insetos, os fungos fitopatogênicos e as pragas em geral têm desenvolvido resistência aos produtos sintéticos bem mais rápido do que as indústrias descobrem novas moléculas para controlá-los.

A ciência se obriga então a responder sob diversas formas (FRANKEL, 1977), que vão desde a aplicação dos métodos convencionais à luz dos novos conhecimentos, até a utilização de novas ferramentas, como as modernas química e biotecnologia.

2.2. Alternativas no controle de pragas

Desde o advento da agricultura os seres humanos vêm entendendo, cada vez com mais profundidade, o que representam e o que significam as pragas (ervas daninhas, insetos, ácaros, nematóides, fungos, bactérias, vírus e outras), principalmente os insetos. Isto ocorre não só em relação aos prejuízos às culturas, ameaçando as populações com a fome, mas, especialmente nos dias de hoje, de forma indireta, em termos de ameaça à saúde e ao ambiente, pelo potencial que representam os produtos químicos utilizados para o controle das pragas.

Entretanto, esta preocupação crescente com o efeito na saúde humana e no ambiente, apesar de relativamente recente, tem sido acompanhada, felizmente, pelo surgimento de estratégias cada vez mais adequadas, com advento de novas tecnologias e novos avanços na compreensão dos eventos ecológicos envolvidos nas relações planta-fator de estresse (hospedeiro-consumidor, no caso de insetos) e na biologia de ambos os partícipes da relação.

Por outro lado, é necessário, mais que entender que isto não foi sempre assim, compreender o significado desta mudança no comportamento humano. A tendência em se buscar produtos mais adequados socialmente e ambientalmente (CASIDA & QUISTAD, 1998), parece coincidir com toda uma tendência de mudança no contexto da civilização humana e na busca por um novo paradigma ecológico e que, como não poderia deixar de ser, envolve o uso dos biocidas.

Na busca de novas moléculas no controle de pragas, a preocupação principal nos dias de hoje é com os aspectos socio-ambientais como conseqüência do uso das mesmas. Nos primórdios do uso de biocidas, no caso, defensivos agrícolas, um produto aceitável era medido pela sua maior eficiência no controle das pragas, combinado com o aspecto econômico. Posteriormente, a eficiência técnica e econômica do produto passaram a ter como contraponto os aspectos relacionados à saúde e ao

ambiente. Numa terceira etapa, a atual, há uma evidente inversão, de tal forma, que antes de se referir a um composto com propriedades citotóxicas e com potencial inseticida, fungicida, herbicida e outros, é necessário analisar as propriedades da molécula quanto a seus mecanismos de ação, especificidade, degradação no ambiente e, conseqüentemente, quanto ao grau de segurança à saúde e ao ambiente (SALAZAR, 1997).

2.2.1. Controle alternativo no Manejo Ecológico de pragas em conexão com o estudo de extratos vegetais

2.2.1.1. Inseticidas biológicos e virulíferos na interação com os extratos vegetais

O uso de inseticidas convencionais leva fatalmente a desequilíbrios biológicos, pela morte de insetos úteis, como os polinizadores e os controladores naturais de pragas; e com isto a situação em relação aos insetos-praga da agricultura em geral é agravada em anos subseqüentes ao uso desse produtos (AZEVEDO, 1998), além das implicações resultantes da toxicidade dos mesmos aos peixes, aves e mamíferos em geral, inclusive ao homem.

Os inseticidas e fungicidas biológicos (principalmente bactérias, fungos e vírus) geralmente não afetam o ambiente e a saúde do homem e animais, nem mesmo de outras espécies, que não seja o inseto-alvo (SALAZAR, 1997). Infelizmente as alternativas ainda são poucas, mas as perspectivas são extremamente otimistas, principalmente com os avanços da biologia molecular. É praticamente impossível enumerar as aplicações da engenharia genética na agricultura, tamanha a amplitude da tecnologia do DNA recombinante (SERAFINI et al., 2001). O controle biológico de pragas (insetos, nematóides, fungos e bactérias, principalmente) é uma

das áreas mais promissoras, com o advento da biotecnologia na agricultura. Sem a atuação da engenharia genética, melhorando (modificando geneticamente) esses agentes de controle, as perspectivas para o controle biológico estariam limitadíssimas.

O exemplo atual mais importante sobre a interação da engenharia genética com o controle biológico é, inegavelmente, a tecnologia do gene Bt. As proteínas inseticidas codificadas por este gene de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que tem sido transferido para diversas espécies cultivadas, têm sido eficientes no controle de um número muito grande de insetos-praga, com pouquíssimo ou nenhum efeito deletério para a maioria dos organismos, inclusive humano, vida selvagem e mesmo outros insetos (TABASHNIK, 1994; SACHS et al., 1996; TABASHNIK, 1997; EPA, 2000). Apesar do otimismo em relação às perspectivas do uso desta tecnologia, com a seleção de subespécies mais eficientes de *B. thuringiensis* (CASIDA & QUISTAD, 1998; COSTA, 2001), o sistema Bt não está imune ao desenvolvimento de resistência por parte dos insetos-praga (SACHS et al., 1996; TABASHNIK, 1997; GOULD, 1998).

Diante do potencial da engenharia genética e das necessidades atuais na agricultura, pode-se dizer que todas estas tecnologias ainda estão na sua infância, pois há muito que fazer, já que a agricultura depende ainda quase que exclusivamente dos agrotóxicos tradicionais. Estes, além de nocivos à saúde e altamente agressivos ao ambiente, podem dificultar ou mesmo inviabilizar as próprias práticas de controle biológico.

As espécies vegetais se constituem, provavelmente, numa fonte praticamente inesgotável para se pesquisar moléculas tóxicas que possam ser utilizadas no Manejo Ecológico de Pragas e que não interfiram antagonicamente em relação aos outros fatores, como o controle biológico, altamente sensível na presença dos agrotóxicos convencionais.

O Brasil representa a maior biodiversidade de genes, de espécies e de ecossistemas (COSTA, 2001), o que coloca o brasileiro no topo do

mundo, em termos de potencial para o desenvolvimento de técnicas de controle biológico e na prospecção de moléculas e genes de defesa das plantas, com o advento da biotecnologia. Cabe, no entanto, investir em pesquisa, para que mais uma vez não se perca a oportunidade de caminhar rumo ao desenvolvimento e independência tecnológica e econômica.

2.2.1.2. Inseticidas fisiológicos ou reguladores de crescimento podem estar contidos nos extratos vegetais

De acordo com a definição de Beckage (2000) os verdadeiros reguladores de crescimento são inseticidas que simulam a ação de hormônios no crescimento e desenvolvimento dos insetos, não cobrindo necessariamente, por exemplo, os antigos inseticidas sintéticos que atuam na síntese de quitina (NAUEN & BRETSCHEIDER, 2002).

Os reguladores de crescimento de insetos foram considerados, no seu tempo, como a terceira geração de inseticidas, após inorgânicos e sintéticos, com grande potencial na agricultura (CASIDA & QUISTAD, 1998). Muitos são conhecidos particularmente por intervir na ecdise larval (processo de rompimento da cutícula, quando a larva muda de um ínstar para outro), subsequente deposição de quitina e metamorfose (NAUEN & BRETSCHEIDER, 2002). São principalmente os hormônios conhecidos como ecdisteróides, que incluem principalmente a hidroxiecdisona (20E), e a ecdisona (E), que é o precursor de 20E, mas que tem, por si só, funções na morfogênese (GILBERT et al., 2002).

Os vegetais são fontes de reguladores de crescimento ou inseticidas fisiológicos. A azadiractina é o mais importante conhecido limonóide do nim (*Azadirachta indica*), com propriedades deterrentes e de bloqueio da muda (FOSTER & HARRIS et al., 1997; CASIDA & QUISTAD, 1998).

O reino vegetal, pela natureza de adaptação planta-fator biótico, deve se constituir numa fonte importante na busca e desenvolvimento de moléculas com mecanismo de ação que interfiram na regulação do crescimento e desenvolvimento de insetos e outras pragas. Se grupos de pragas são relativamente específicos a respectivos hospedeiros, é porque estes respondem às demais, através de metabólitos secundários de defesa, inclusive aqueles com efeitos na fisiologia, impedindo o ataque.

2.2.1.3. Feromônios de origem vegetal

O controle do comportamento das pragas, visando proteger as culturas, apesar de já ser utilizado há mais de sete séculos, somente nos últimos 30 anos é que a pesquisa realmente mostrou interesse em investigar o assunto, a partir das novas exigências da sociedade, em relação à segurança alimentar e ambiental (FOSTER & HARRIS, 1997).

Os feromônios e outros atraentes têm um decisivo papel no monitoramento das populações de pragas e no controle do comportamento dos insetos a níveis extremamente baixos, sem deixar resíduos tóxicos, sendo importantes componentes nos programas de controle de pragas, que usualmente também requerem o uso de inseticidas químicos (CASIDA & QUISTAD, 1998). Os repelentes também aumentam em importância neste contexto, que busca o controle de insetos com o mínimo de impacto ambiental.

Karlson e Luscher, em 1959, foram quem, pela primeira vez, propuseram o termo “feromonas” para conceituar um grupo de substâncias ativas “excretadas para o exterior por um indivíduo e recebidas por outro da mesma espécie, no qual provocam uma reação específica, um dado comportamento ou processo de desenvolvimento” (PAIVA & PEDROSA-MACEDO, 1985). Sabe-se hoje, entretanto, que

esta especificidade não é rígida, já que várias espécies próximas ou não, podem utilizar a mesma substância com o mesmo fim.

A maioria dos metabólitos secundários freqüentemente são deterrentes, mas podem ser, ao mesmo tempo, fagoestimulantes, se servem como sinais de estímulo por parte do hospedeiro, ou mesmo se são seqüestrados para a defesa ou para serem usados como precursores de feromônios de consumidores herbívoros (HARTMANN et al., 1997; CHAPMAN, 2003). Esta integração entre plantas e fitófagos inclui os feromônios sexuais, como estratégia dos insetos para otimizar o acasalamento e a reprodução (LANDOLT, 1997). Nos extratos vegetais devem existir compostos modelos para novas moléculas sintéticas (feromônios) importantes; ou, de forma mais abrangente, substâncias atrativas, repelentes, estimulantes, deterrentes e outras (FOSTER & HARRIS, 1997), com potencial para compor, com outros métodos de controle de pragas, um sistema mais ecológico de manejo destas. Um exemplo é a combinação de iscas atrativas com hormônios sexuais, que, conjuntamente, são bem mais eficientes do que utilizados de forma separada.

Não é necessário afirmar que tais produtos poderiam satisfazer plenamente as atuais exigências da sociedade por alimentos mais saudáveis e pela preservação ambiental.

Entretanto, também não pode ser esquecido que esses métodos podem ter efeitos também sobre os inimigos naturais (FOSTER & HARRIS, 1997).

2.2.2. Alternativas através da agricultura orgânica e agroecologia

Produtos muito utilizados nessas agriculturas chamadas de alternativas são os sais de metais pesados como inseticidas e fungicidas e como fertilizantes, considerados “naturais”. O sulfato de cobre tem sido por

excelência o produto carro-chefe e misturas deste com outros sais têm sido utilizados em todo o mundo. No Brasil, o chamado “Supermagro”, considerado como “defensivo natural” e “biofertilizante” (BURG & MAYER, 1998) contém, dentre outros materiais, diversos sais de metais pesados, (sais de zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, boro, molibdênio e outros) “fermentados” em um meio orgânico (esterco de gado, fígado, soro, leite, sangue, melado de cana e restos de peixe), na tentativa de “quelatizá-los” para aplicação foliar nas plantas.

Quando utilizados como inseticidas, tais produtos devem atuar de forma semelhante aos inseticidas inorgânicos, causando disfunção da membrana e interferindo no sistema nervoso dos insetos. São estomacais, atuando, portanto, por ingestão. Pelo seu mecanismo de ação e por conterem metais pesados, passíveis de bioacumulação e biomagnificação (CANELLAS et al., 1999; CALEFFI, 2000; FERREIRA et al., 2000; MASUTTI et al., 2000), não são nada recomendáveis tais produtos, sob o ponto de vista da saúde e do ambiente.

Tais técnicas não se constituem, portanto, como alternativa viável em termos de sustentabilidade e de preservação ambiental e da saúde humana.

Por outro lado o uso direto de extratos vegetais, preconizado pela concepção orgânica e agroecológica, é extremamente limitado pelo alto custo em energia e grande consumo das partes vegetais para a preparação dos mesmos, não tendo portanto características de sustentabilidade. Em adição, como todas as espécies têm suas pragas, o cultivo de plantas visando obtenção de extratos, levaria à busca de extratos de outras espécies para controlar as pragas das primeiras.

2.3. A retomada dos inseticidas de origem vegetal à luz dos novos conhecimentos

Os problemas de toxicidade dos inseticidas, contaminação ambiental e resistência dos insetos fizeram com que na década de 60 renascesse o

interesse pela nicotina, rotenona e piretrina e seus derivados. Piretrina age no eixo nervoso, nicotina na sinapse do sistema nervoso central, e rotenona na cadeia respiratória dos tecidos, incluindo nervos e músculos. Os diferentes mecanismos de ação e sítios onde atuam esses inseticidas de origem vegetal estimulam estudos visando desenvolvimento de compostos a partir dessas moléculas naturais (YAMAMOTO).

A rotenona ($C_{23}H_{22}O_6$), ingrediente ativo de diversas plantas, atua como eficientíssimo inseticida de contato e por ingestão (BLAS, 1951). O descobrimento teve origem no conhecimento que se tinha desde 1665 de que os povos da África, América e Índia empregavam extratos de várias leguminosas, como veneno para matar peixes e que na China, em 1848 se empregava a raiz de *Derris spp.*, tanto para envenenar as águas, quanto como inseticida.

A rotenona e os rotenóides derivados, têm ação fortemente letal sobre insetos e peixes. Causa diminuição da respiração nos insetos, inibindo a respiração em substratos ligados a NADH da mitocôndria (YAMAMOTO, 1970). A paralisia ocorre nos estágios iniciais de intoxicação, por agir sobre o sistema nervoso imediatamente (SALAZAR, 1998) e estes sintomas diferem bastante daqueles causados por piretrinas, nicotinas, DDT, organofosforados e outros (YAMAMOTO, 1970).

A nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$), alcalóide do tabaco, que foi sintetizado em 1904 por Pictet e Rotschy (BLAS, 1951), é um inseticida fortemente de contato, veneno respiratório e tóxico por ingestão, sendo empregado preferencialmente em horticultura e jardicultura. É tóxico para vários insetos, mas é mais eficiente contra afídeos e cochonilhas.

Os compostos neuroativos dominaram por mais de 50 anos e parece que a tendência não é modificar este rumo (CASIDA & QUISTAD, 1998), já que cada vez mais novas substâncias, incluindo os neo-nicotinóides e outras novas moléculas oriundas de estudos de metabólitos secundários de plantas, fungos, bactérias e vida marinha em geral (McCURDY et al., 2000; SAYED et al., 2000), que podem vir a ser precursores de

inseticidas, têm, em grande parte, a característica de atuarem sobre o sistema nervoso.

A transmissão do sistema nervoso central nos insetos é colinérgica, a qual é o alvo da nicotina e anticolinesterase, mas é protegida contra a penetração de íons, o que faz com que a nicotina, uma substância ionizável, seja ineficiente contra a maioria das espécies de insetos, com exceção dos afídeos (YAMAMOTO). Os nicotinóides mais recentes atuam no mesmo sítio da nicotina, mas com mais efetividade e mais segurança (CASIDA & QUISTAD, 1998). Todos os neo-nicotinóides são agonistas do receptor nicotínico da acetilcolinesterase (nAChR) do sistema nervoso central (NAUEN & BRETSCHEIDER, 2002; TOMIZAWA & CASIDA, 2003).

Os nicotinóides, que atuam principalmente no canal de cloro mediado pelo gama-aminobutirato (GABA) têm tido uma importância especial, com o lançamento de novos produtos comerciais (CASIDA & QUISTAD, 1998). O GABA, derivado do glutamato por descarboxilação, é um importante neurotransmissor (LEHNINGER et al., 1995). Os produtos que atuam sob este mecanismo, agem no receptor de GABA, que é uma proteína que contém um canal integral de cloro, modulado por vários compostos, incluindo benzodiazepinas, barbituratos, esteróides e inseticidas (LUMMIS et al., 1990).

Neonicotinóides e nicotinóides diferem apenas pela ionização em determinado pH e na especificidade do sítio alvo entre insetos e mamíferos, isto é, os neonicotinóides não são ionizados e seletivos para nAChR em insetos e os nicotinóides são ionizados e seletivos para nAChR dos mamíferos (TOMIZAWA & CASIDA, 2003).

A primeira geração de inseticidas neuroativos, que atuam também no canal de cloro, apresentou rapidamente problemas com o desenvolvimento de resistência (CASIDA & QUISTAD, 1998), o que obrigou os pesquisadores a procurarem por novos produtos neurotóxicos que atuassem em sítios diferentes. O primeiro sucesso foi obtido com o

inseticida abamectina e análogos, que atuam como agonistas do receptor de GABA num sítio novo da proteína integral de membrana (canal de cloro) e o segundo foi o cloronicotínil, ou nicotínóides sintéticos, que atuam sobre o receptor nicotínico da acetilcolinesterase (nAChR). A acetilcolina é o maior neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) de insetos e em contraste com os vertebrados, insetos têm um número muito maior de receptores nicotínicos do que receptores muscarínicos no SNC (LUMMIS et al., 1990;).

Outra classe de ligantes do receptor de GABA descoberto são as avermectinas e derivados, como a emamectina benzoato, mais eficiente contra lepidópteros do que a abamectina (NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002). As avermectinas, além de agonistas do receptor de GABA, atuam nos canais de cloro regulados por glutamato no sistema nervoso dos insetos, sendo eficientes como inseticida, acaricida, possuindo ainda propriedades anti-hermínticas. O glutamato é também um neurotransmissor em insetos, sendo conhecidos pelo menos três subtipos de receptores de glutamato diferenciados por sua seletividade para os respectivos agonistas (LUMMIS et al., 1990). Receptores para outros aminoácidos e hormônios têm sido estudados em insetos e prometem aumentar ainda mais rol de produtos com novos mecanismos de ação.

Outros compostos têm sido descobertos, a partir de plantas, fungos, bactérias, vida marinha em geral, o que tem tornado esta área de pesquisa simplesmente fascinante, pelas possibilidades praticamente inesgotáveis (SAYED et al., 2000) na natureza. O sistêmico pimetozina e a flonicamida, que parecem agir por um novo mecanismo de ação sobre o sistema nervoso, ainda desconhecido; as espinosinas (algumas já comercializadas) formam um grupo de inseticidas produzidos pelo acinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*, que induz persistente ativação alostérica da nAChR e prolongada resposta da acetilcolina; e as pirazolininas e seus análogos dihidrooxadiazina, antagonistas da ativação

do canal de sódio (CASIDA & QUISTAD, 1998; WEDGE & CAMPER, 2000; NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002).

Diversos gêneros da família das anonáceas são conhecidos, inclusive no Brasil, por apresentarem espécies popularmente usadas como plantas medicinais e pelos frutos comestíveis, muito apreciados principalmente pelas populações rurais (LORENZI, 1998; JOHNSON et al., 2000; PIMENTA et al, 2003). Até hoje já foram isolados perto de 400 compostos dessa família, considerados entre os mais potentes conhecidos inibidores do Complexo I (NADH: ubiquinona oxireductase), nos sistemas de transporte de elétrons da mitocôndria e da NADH:oxidase da membrana plasmática, que induzem apoptose (morte programada da célula), talvez como consequência da privação de ATP, tendo, portanto, um ótimo potencial na aplicação como praguicida ou antitumoral (JOHNSON et al., 2000). Os referidos autores citam a asimicina o bulatacim e o trilobacim (dentre mais de 40) como acetogeninas altamente bioativas e os gêneros Uvária, Asimina, Annona, Goniothallamus, Rollinia e Xylopia como os mais promissores para a pesquisa. Entretanto, apesar dos esforços dedicados à síntese de inibidores do Complexo I, problemas toxicológicos devido ao mecanismo de ação, com respeito a mamíferos e peixes, ainda não puderam ser superados, impedindo até agora que tais inseticidas pudessem ser introduzidos no mercado (NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002).

Inibidores do Complexo III (citocromo e redutase) da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, foram desenvolvidos comercialmente primeiro como fungicidas (estrobilurina) e depois como acaricidas (fluacipirim), mas até o momento os potentes compostos inseticidas descobertos, com este mecanismo de ação, não puderam ser desenvolvidos comercialmente, pelo alto grau de toxicidade aos mamíferos, semelhantemente aos inibidores do Complexo I (NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002).

Outros compostos que estão ganhando importância relativa são os desacopladores, ácidos hidrofóbicos fracos, que agem transportando prótons através da membrana mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons e desacoplando a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa, criando um curto-circuito elétrico através da membrana mitocondrial (LEHNINGER et al., 1995). Como este mecanismo de ação é praticamente inespecífico, a seletividade desses produtos até agora tem sido muito baixa, representados pelos antigos dinitrofenóis (NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002); mas novos sintéticos, baseados em produtos naturais, como a dioxapirrolomicina, levaram ao interessante grupo inseticida dos 2-aril-pirróis, representado pelo clorfenapir, introduzido no mercado em 1995.

Como se pode observar, os novos produtos sintéticos que estão surgindo são principalmente derivados de produtos naturais de plantas, animais, microorganismos e outros, de vida terrestre e marinha, resultados da biodiversidade existente no Planeta. Isto torna o potencial que se apresenta ao homem, como inesgotável, se souber utilizar adequadamente tais recursos da natureza.

2.3.1. Os inseticidas de origem vegetal (extratos vegetais) e a busca por novos mecanismos de ação ou novos sítios-alvo

Não há nenhuma forma previsível para encontrar um novo mecanismo de ação; e informações sobre o uso popular de extratos vegetais usualmente são mais importantes que os dados advindos da utilização racional dos mesmos (CASIDA & QUISTAD, 1998). O sucesso da busca por produtos de origem natural, com novos mecanismos de ação, vai depender da disponibilidade das espécies (biodiversidade) e de todo conjunto de um programa que envolva a detecção dos produtos bioativos, a síntese química dos ingredientes ativos, a otimização da atividade pela

síntese de análogos mais eficientes e finalmente a elucidação do sítio-alvo da molécula inseticida.

Até hoje já foram identificadas mais de 2.000 espécies vegetais de interesse fitossanitário (SALAZAR, 1997), além de mais de 800 espécies de pragas controladas por produtos de origem botânica (GRAINGE & AHMED, 1988), dentre estes, vários, inclusive com ação sobre moléstias e parasitas de animais. Entretanto, os antigos agrotóxicos de origem vegetal, como o piretro, a rotenona, a nicotina, a sabadilha e alcalóides extraídos de *Schoenocaulon officinale* (Liliaceae) ainda são os mais utilizados e com relativa freqüência (LANUNES & RODRIGUES, 1989).

De uma maneira geral, os metabólitos secundários de defesa da planta podem atuar sobre os insetos de diversas formas, podendo penetrar no organismo por ingestão, através do aparelho digestivo, por contato, atravessando o tegumento e através das vias respiratórias (GALLO et al., 1988). Evidentemente que uma molécula inseticida que chegue a um organismo via ingestão, não apresenta efeitos imediatos, pois fica dependente dos processos digestivos para incorporação e ação nos sistemas vitais da praga. Por outro lado, é na ação por contato e na absorção pelas vias respiratórias que um produto tem ação mais rápida e por onde geralmente atuam os inseticidas neurotóxicos.

As razões pelas quais, mesmo que sejam aos milhares as espécies vegetais com potencial inseticida, fungicida e bactericida, não tenha havido utilização direta dos extratos vegetais desses materiais, prende-se a que a sua utilização dar-se-á num novo patamar, à luz dos novos conhecimentos. A utilização direta dos extratos vegetais não é sustentável, na maioria das vezes, sob o ponto de vista econômico e ambiental, pois além de extremamente caro, o processo exigiria o plantio de espécies vegetais para terem seus extratos retirados. Estas, por sua vez, ocupando grandes áreas, em plantios intensivos, inexoravelmente estariam expostas as suas próprias pragas e moléstias, que deveriam ser controladas também.

Assim, os avanços no conhecimento das potencialidades das espécies vegetais e seus metabólitos de defesa, levam à ciência a tentar desvendar as estruturas químicas de tais moléculas, visando sintetizá-las, para produzir novos análogos mais eficientes e mais específicos. Através da engenharia genética é possível não só melhorar a produção e metabólitos pelas “plantas defensivas”, como também produzir proteínas e peptídeos praguicidas, transferindo genes para microorganismos produtores ou mesmo para sistemas bacterianos, baculovirais e plantas (CASIDA & QUISTAD, 1998).

2.4. Metabólitos secundários das plantas como precursores de novas moléculas praguicidas

No habitat natural as plantas estão sempre cercadas por um número enorme de inimigos e competidores, que fazem parte do ecossistema, como bactérias, vírus, fungos, nematóides, insetos, mamíferos, outros herbívoros e inclusive outras plantas. Como os vegetais não podem evitar seus inimigos movendo-se de um lugar para outro, as plantas desenvolveram outros meios de proteção diferentes dos animais. Além das alterações morfológicas criando barreiras físicas e químicas, as plantas montaram uma maquinaria genética para produzir substâncias de defesa, conhecidas como metabólitos secundários, contra uma grande variedade de herbívoros, microorganismos patogênicos e vírus.

Por muitos anos a significância adaptativa da maioria dos metabólitos secundários ficou desconhecida, tendo-se principalmente como substância sem função, resultado de sobras do metabolismo da planta. Foi o interesse pela busca de novas substâncias que chamou a atenção dos cientistas, sugerindo que tais compostos pudessem ter função de

defesa das plantas contra estresses bióticos, inclusive na competição com outras plantas e mesmo na atração de agentes responsáveis pela polinização, dispersão de sementes e outras importantes funções ecológicas.

Muitos produtos de defesa das plantas, que aumentavam a adaptação reprodutiva, podiam ser também indesejáveis aos humanos como alimento. A seleção artificial feita pelo homem, se por um lado resultou em plantas mais palatáveis e menos tóxicas, por outro, diminuindo relativamente a produção desses compostos, provavelmente tornou-as mais suscetíveis às pragas.

A defesa das plantas pode ter surgido a partir da seleção de mutações herdáveis. Mutações ao acaso em rotas básicas do metabolismo levaram ao aparecimento de novos compostos que resultaram tóxicos aos herbívoros e microorganismos, e até mesmo a outras plantas competidoras. Uma vez que tais produtos não fossem tóxicos às próprias plantas e não significassem um custo de produção muito alto, poderiam determinar uma maior adaptação, proporcionando a que pudessem deixar uma maior descendência, passando com mais eficiência tais caracteres de defesa para as próximas gerações. Em adição, os vegetais desenvolveram a capacidade de armazenar produtos tóxicos, inclusive às suas próprias células, depositando-os nos vacúolos ou mesmo conjugando-os como compostos sem atividade, aptos a entrar em ação, tão logo se faça necessário.

A elucidação da estrutura química de tais compostos de defesa pode significar a síntese de novos produtos socialmente mais aceitáveis e a identificação, seqüenciamento e clonagem de genes mais promissores podem tornar viável a transferência de resistência a cultivos agrícolas, dispensando o uso de agrotóxicos. Entretanto, há necessidade de basicamente identificar o fenômeno alelopático ou bioativo, através de biotestes com extratos vegetais, que poderão indicar espécies de plantas

mais promissoras na prospecção de genes de defesa contra estresses bióticos.

2.4.1. Principais classes de metabólitos secundários

Os microorganismos e as plantas sintetizam uma imensa variedade de metabólitos que são geralmente classificados em dois maiores grupos, baseado em suas funções (BODE & MÜLLER, 2003). Os metabólitos primários são essenciais ao crescimento e desenvolvimento e utilizados universalmente, enquanto que os metabólitos secundários são extremamente diversos e variáveis, desempenhando o papel de garantir a sobrevivência do organismo no habitat natural. De acordo com o dicionário de Chapman & Hall, de produtos naturais, são aproximadamente 170 mil metabólitos secundários conhecidos atualmente (<http://www.chemnetbase.com/scripts/dnpweb.exe>). Estes metabólitos podem ser sintetizados constitutivamente em órgãos específicos ou em específicos estádios de desenvolvimento, ou sua produção pode ser induzida por ataque de herbívoros ou de patógenos (GERSHENZON et al., 2000).

Os terpenos, compostos fenólicos e os compostos nitrogenados formam as três principais classes de metabólitos secundários das plantas, utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ & ZEIGER, 1998).

2.4.1.1. Terpenos

Os terpenos ou terpenóides, ou ainda isoprenóides, se constituem na maior classe de produtos secundários, caracterizados principalmente como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos em muitas

plantas (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002; TAIZ & ZEIGER, 1998) e na atração de polinizadores, na dispersão de sementes por animais e como aleloquímicos, que influenciam a competição entre espécies de plantas (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002). São lipídios sintetizados a partir de acetilCoA ou de intermediários da glicólise, que se pode separar em cinco subclasses mais importantes: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e politerpenos. As enzimas terpeno-sintases (TPSs) catalisam a formação de esqueletos de carbono do terpeno básico de intermediários acíclicos fosforilados, convertendo geranyl difosfato (10 C), farnesil difosfato (15 C) e geranylgeranyl difosfato (20 C), respectivamente, em monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (LU et al., 2002; MARTIN, et al., 2003).

Os **monoterpenos** (com 10 carbonos) são sintetizados nos plastídios. Os monoterpenos emitidos pelas plantas constituem na maior fonte de compostos orgânicos voláteis (VOC) na atmosfera, participando com importante parcela da química atmosférica (NIINEMETS et al., 2002). Entretanto o mais conhecido dos monoterpenos não compõe o grupo dos VOC. São os piretróides, que ocorrem em folhas e flores de várias espécies de *Chrysanthemum*, com forte ação inseticida (TAIZ & ZEIGER 1998). Nas coníferas são bem conhecidos os monoterpenos alfa –pineno, limoneno e mirceno, tóxicos a numerosos insetos. Muitas coníferas respondem a infestações produzindo quantidade adicional de monoterpenos (MARTIN et al., 2003). Bastante conhecidos são, por exemplo, os terpenos pineno, limoneno e terpineno de *Citrus limon*, cujos genes que codificam as três enzimas respectivas monoterpeno sintetases foram transferidos para o tabaco (cultivar Petit Havana) com sucesso (LUCKER et al., 2004). Sob o ponto de vista econômico, a espécie mais importante na produção de monoterpeno é a *Mentha piperita*, da família Lamiaceae, que produz altos teores de monoterpenos p-mentana.

Muitas plantas contêm misturas voláteis de monoterpenos e sesquiterpenos, chamadas de óleos essenciais. Geralmente têm ação

repelente sobre herbívoros e podem servir como atraentes de inimigos naturais de fitófagos (TAIZ & ZEIGER, 1998; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002). Em milho (*Zea mays*), imediatamente após o ataque de *Spodoptera littoralis*, há a emissão de mono e sesquiterpenos voláteis, alguns já identificados, que são utilizados por vespas parasitas para localizar as larvas do lepidóptero, que são seus hospedeiros naturais (SCHNEE et al., 2002).

Os **sesquiterpenos** (isoprenóides de 15 carbonos derivados de três unidades de isopreno), que são encontrados nos óleos essenciais, podem atuar como fitoalexinas antimicrobianas e como anti-herbívoros (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002). O gossipol, encontrado no algodão, além de ser responsável por significativa resistência a insetos, tem ação fungicida e bactericida, juntamente com outros sesquiterpenos (TAIZ & ZEIGER, 1998). Observa-se, portanto, que alguns compostos podem ter múltipla função, um tipo de economia biológica.

Os **diterpenos** (C20) incluem a cadeia lateral de clorofila, filoquinonas e tocoferol, giberelinas, fitoalexinas e taxol (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002). Diterpenos como, por exemplo, as resinas, têm demonstrado ser tóxicos e deterrentes alimentar aos herbívoros (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Os **triterpenos** (C30) como os fitosteróis, brassinosteróides e algumas fitoalexinas, toxinas e graxas, resultam geralmente da união de duas cadeias de 15 carbonos (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002). Os esteróides são os mais importantes desta subclasse (TAIZ & ZEIGER, 1998). Por exemplo, as fitoecdisonas formam um grupo de esteróides de plantas com a mesma estrutura básica dos hormônios de insetos e quando ingerido pelos mesmos, interfere nos processos de desenvolvimento com conseqüências letais. Outro grupo de triterpeno anti-herbívoro é o dos limonóides. Talvez o mais poderoso deterrente de insetos conhecido deste grupo é a azadiractina, com ação em doses tão

baixas como 50 ppb, além de outros efeitos tóxicos. Cardenolides e saponinas são tóxicos a muitas espécies de animais, inclusive aos mamíferos.

Dentre as mais promissoras moléculas deste grupo estão as acetogeninas, exclusiva da família das anonáceas, ácidos graxos constituídos de 32 ou 34 carbonos, com mais de 400 compostos já identificados e com potencial inseticida (JOHNSON et al., 2000).

Os tetraterpenos, com 40 carbonos, que tem como principal representante o grupo dos carotenóides, e os politerpenos que incluem ubiquinona e plastiquinona (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002), não parecem ter grande importância como metabólitos de defesa das plantas.

É nas coníferas que os terpenos ou terpenóides têm sido mais bem estudados, tendo sido já identificados diversos terpenos de produção constitutiva e induzíveis pelo sistema de defesa das plantas (McKAY et al., 2003; MARTIN et al., 2003).

Os terpenos de expressão constitutiva se compõem na estratégia de defesa prévia das plantas contra estresses bióticos e abióticos e se, por um lado, significam um gasto a mais de energia, por outro, devem ter um significado evolutivo compensador, favorecendo a seleção desses tipos de mutantes. Entretanto, a defesa induzida, biologicamente, mais econômica, para que tenha valor adaptativo, deve ser extremamente eficiente, desde a rapidez da resposta e quantidade de metabólito produzido, até a eficiência da molécula de defesa. Com isto, ganha em importância o estudo dos metabólitos secundários induzidos pelo sistema de defesa.

Em *Picea abies* ferimentos induzem acúmulo de terpenos. Entretanto foi possível dobrar a produção de monoterpenos e sesquiterpenos nas acículas desta espécie, pela aplicação exógena de metil-jasmonato (sem necessidade de dano mecânico) e quintuplicar a emissão destes metabólitos pelas partes aéreas (MARTIN et al., 2003). Dentre as

moléculas induzidas por metil-jasmonato, linalool e (E)-farnesene foram os mais característicos e mais importantes produtos e que são quase que completamente ausentes na resina das acículas de *P. abies*.

McKAY et al. (2003) compararam, em *Sitka spruce* (*Picea sitchensis*), os níveis de transcritos de monoterpenos sob o ataque de *Pissodes strobi* (Curculionidae) e em simulação do ataque do inseto por dano mecânico. Em ambos os casos houve aumento dos níveis de m-RNA, mas a expressão gênica foi induzida mais rapidamente pelo ataque dos insetos. Foi identificada uma pineno-sintase relacionada a dois pinenos conhecidos como constituintes da resina do tronco de *S. spruce* e que aumentam muito com o ataque do herbívoro.

Muitos compostos comercialmente importantes, dentre os quais, os agroquímicos, são originados de terpenóides e embora a engenharia genética pareça ser uma poderosa ferramenta para dirigir a produção de metabólitos primários e secundários nas plantas, somente uma parcela relativamente pequena de rotas envolvidas na biossíntese de seus precursores estava disponível até muito recentemente (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002).

2.4.1.2. Compostos fenólicos

São produtos secundários muito importantes na defesa contra herbívoros e patógenos e que contêm o grupo fenol, a maioria derivada da fenilalanina, que por sua vez depende da rota do ácido chiquímico, intermediária da síntese da maioria dos compostos fenólicos nas plantas (LEHNINGER, 1995; TAIZ & ZEIGER, 1998).

A fenilalanina amônia liase (PAL), talvez a enzima mais estudada no metabolismo secundário das plantas, cataliza a desaminação da fenilalanina para formar o ácido cinâmico (BODE & MÜLLER, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que a atividade de PAL é aumentada por vários fatores ambientais, como o baixo nível de nutrientes, luz e infecções fúngicas. A invasão de um patógeno, por exemplo, determina (liga) a transcrição do RNA mensageiro que codifica PAL, aumentando a quantidade desta enzima na planta, estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 1998).

A regulação da atividade de PAL é muito complexa, pela existência de múltiplos genes que codificam esta enzima, alguns dos quais são expressados somente em tecidos específicos ou apenas sob certas condições ambientais (LOGEMANN et al. 1995).

O produto de PAL, o ácido *trans*-cinâmico, é convertido em ácido *para*-cumárico. Os produtos derivados destes ácidos são compostos fenólicos simples, chamados fenilpropanóides, por conterem um anel benzênico (TAIZ & ZEIGER, 1998). Plantas que contêm altas concentrações de compostos de defesa na classe dos fenilpropenos (eugenol, chavicol e seus derivados) já são conhecidas desde a antiguidade como temperos para consumo humano (GANG et al., 2001) de alto valor comercial (*Ocimum basilicum*, por exemplo, com eugenol e metilchavicol). O eugenol é encontrado em grande quantidade nas mirtáceas, significativamente em canela-de-cheiro e em menor quantidade em diversos temperos e pimentas conhecidos há séculos.

Lignina é uma macromolécula fenólica altamente complexa, também derivada da fenilalanina (BODE & MÜLLER, 2003). Além do suporte mecânico, tem importante função de proteção às plantas, pois a durabilidade química da lignina a torna relativamente indigerível aos herbívoros, diminuindo a digestibilidade da celulose e proteínas, ligando-se a elas (TAIZ & ZEIGER, 1998). A lignificação bloqueia o crescimento de patógenos e é uma resposta freqüente a infecção ou ferimento.

Os flavonóides, umas das maiores classes de metabólitos secundários em plantas, envolvem um grupo de compostos polifenólicos complexos, que apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis

aromáticos (A e B) e um anel heterociclo oxigenado (C), formando uma família de mais de 4.000 diferentes compostos já descritos, incluindo os subgrupos flavanóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas e flavonóis (WILHELM FILHO, 2001). Os polifenóis são normalmente encontrados na natureza na forma glicosídica. Os flavonóides realizam diferentes funções nas plantas, incluindo pigmentação e defesa (TAIZ & ZEIGER, 1998). As antocianinas têm a função de atrair animais para polinização e dispersão de sementes.

Os isoflavonóides (isoflavonas) são um grupo de flavonóides nos quais a posição de um anel aromático (anel B) é alterada. São encontrados principalmente nas leguminosas e possuem muitas atividades biológicas diferentes (TAIZ & ZEIGER, 1998). A eficiência do inibidor da tripsina (gene CPTi), originado do feijão caupi (GRAHAM et al., 1995), cujo gene tem sido transferido para diversas culturas, é um exemplo muito animador. Alguns, como os rotenóides (ex., rotenona) têm ação fortemente inseticida, e outros ainda podem funcionar como fitoalexinas, compostos antimicrobianos sintetizados em resposta a infecções por fungos e bactérias (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Nas gramíneas são muito comuns compostos fenólicos que atuam inibindo o crescimento de ervas daninhas e dentre estes, o mais conhecido é o ácido 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazim-3-1 (DIMBOA), um potente herbicida contra diversas ervas daninhas (WU et al., 1999), mas que também tem ação deterrente (dissuasivo alimentar) contra insetos (VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2000).

Os taninos, compostos formados pela polimerização de unidades de flavonóides são dissuasivos (deterrentes) de alimentação por herbívoros e atuam também como antimicrobianos (TAIZ & ZEIGER, 1998). As propriedades defensivas dos taninos são geralmente atribuídas a sua habilidade em se ligar às proteínas, como outros fenólicos, dificultando a digestão nos insetos. A limitação da disponibilidade de proteínas também

deve ser fator de inibição do crescimento e desenvolvimento de patógenos.

Os compostos fenólicos, portanto, formam uma das maiores classes de metabólitos secundários encontrados em plantas e muita atenção deve ser dada a seu potencial como função na ecologia vegetal e nos estudos sobre alelopatia (DALTON, 1999).

2.4.1.3. Compostos nitrogenados

Nesta categoria estão os bem conhecidos anti-herbívoros como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos, muito tóxicos ao homem e com propriedades medicinais, encontrados em mais de 20% das plantas superiores (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Também nesta classe de metabólitos a enzima PAL tem participação importante (BODE & MÜLLER, 2003) sendo a primeira enzima na conversão de fenilalanina em ácido benzóico, um importante elemento estrutural de uma variedade de produtos, inclusive muitos compostos nitrogenados (ex.: cocaína).

Acredita-se que a maioria dos alcalóides tem função de defesa. Dentre o arsenal utilizado pelas plantas, são bem conhecidos os glicosídeos cianogênicos (que produzem ácido cianídrico), os glicosinolatos, que resultam em toxinas voláteis e os aminoácidos não protéicos (TAIZ & ZEIGER, 1998), estes últimos geralmente funcionando como defesa contra herbívoros (ex.: canavanina).

Muitas proteínas de plantas inibem a digestão de herbívoros. Algumas leguminosas sintetizam inibidores de alfa-amilase e outras espécies produzem lectinas, proteínas defensivas que se ligam a carboidratos ou proteínas contendo carboidratos. As proteínas antidigestivas mais conhecidas são os inibidores de proteinase, encontradas em legumes, tomates e outras plantas, e que bloqueiam a ação de enzimas

proteolíticas de herbívoros, como a tripsina e quimotripsina (GATEHOUSE et al., 1991; XU et al., 1996; TAIZ & ZEIGER, 1998). Outras, como a macieira silvestre (*Malus brevipes*), podem produzir uma proteína inibidora da acetilcolinesterase (STOEWSAND et al., 1994).

Inibidores de proteinase e outras substâncias de defesa geralmente não estão continuamente presentes nas plantas, mas são sintetizadas somente após o ataque do herbívoro ou patógeno. A produção sistêmica de inibidores de proteinase em plantas jovens de tomate é acionada por uma complexa seqüência de eventos. Inicialmente, folhas de tomate produzem um polipeptídeo de 18 aminoácidos chamado de sistemina, o primeiro (se não o único) polipeptídeo hormonal descoberto em plantas (PEARCE et al, 1991; SCHALLER & OECKING, 1999). A sistemina é lançada de células danificadas para dentro do apoplasto e é transportada para fora da folha danificada (ferida) via floema.

Nas células alvo, a sistemina parece se ligar a um sítio na membrana plasmática e se inicia a síntese de ácido jasmônico, a partir do ácido linolênico. O jasmonato eventualmente ativa a expressão de genes que codificam inibidores de proteinases. Outros sinais como ácido abscísico, ácido salicílico e fragmentos de pectina de paredes celulares danificadas parecem também participar dessa cascata de sinais por ferimento (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Defesas induzidas somente após o ataque inicial do herbívoro ou patógeno teoricamente requerem menor investimento do que aquelas sempre presentes nas plantas, mas devem ser ativadas rapidamente para que sejam eficientes.

2.5. O papel dos fito-hormônios na resposta das plantas a estresses bióticos

Os animais geralmente respondem a estresses bióticos e até mesmo abióticos, através da produção de anticorpos. Estes, são resultados das respostas a receptores de sinais no organismo a antígenos específicos dos fatores externos. Tais anticorpos são proteínas (enzimas inibidoras) específicas que se ligam ao patógeno, anulando seu poder de agressão ou virulência. As vacinas consistem em fazer com que o organismo entre em contato com o patógeno inativado (não virulento), resultando na formação apenas de anticorpos, pela interação com o antígeno. Nas vacinas produzidas pela engenharia genética a seqüência responsável pela codificação do antígeno, depois de seqüenciada, é isolada, clonada e transferida a um outro organismo (uma planta, por exemplo), de maneira que a vacina passa a ser quase que exclusivamente composta apenas pelo antígeno.

Nas plantas não se tem nenhuma indicação de que ocorra este processo. O que se tem chamado de “vacina” consiste em infectar a planta com um organismo menos virulento, ou transferindo genes deste para a planta, evitando, por competição alelopática, que o patógeno alvo se instale ou se desenvolva. Outra possibilidade surgida recentemente é a transferência da seqüência responsável pela capa protéica de um vírus-alvo para o genoma da planta hospedeira, estimulando a planta a responder através de sua maquinaria de defesa. De forma semelhante aos mecanismos de produção de anticorpos, os organismos vegetais reagem a fatores bióticos e abióticos, através de receptores específicos ou não, resultando na formação de metabólitos secundários de defesa. Tais substâncias de defesa podem ser sintetizadas imediatamente após a ocorrência do estresse, através do desencadeamento de uma cascata de sinais, que levam à expressão gênica, ou mesmo podem ser permanentes

na planta, pela ação constitutiva dos genes de defesa. Neste caso é evidente a necessidade de um gasto muito maior em energia, só explicável através de fatores relacionados a eventos evolutivos, que significaram maiores vantagens adaptativas nesta forma de resistência, em determinados casos. Exemplos disto são as plantas com altos teores constitutivos de metabólitos secundários, que extraídos das mesmas, têm efeito citotóxico proeminente. Desta forma, a reação da planta a um patógeno pode se dar de forma altamente específica, como na resistência genética (gene-a-gene); ou pode ser não específica (mecanismo de defesa), pela mediação de receptores a diversos sinais externos, levando à síntese de um mesmo metabólito secundário, como resposta a diversos fatores externos. Na resistência genética, genes específicos codificam receptores (proteínas) que reconhecem e se ligam a moléculas específicas (elicitors) originadas dos patógenos, alertando a planta para a presença do invasor. Há ainda a possibilidade da resposta à infecção aumentar a resistência a futuros ataques do patógeno, na chamada resistência sistêmica adquirida (SAR), de alta eficiência e de extremo interesse para a pesquisa. Indutores voláteis da SAR, como o ácido salicílico, que transmitem o sinal para outras partes da planta e inclusive para as plantas vizinhas, têm sido intensamente estudados.

Se pela resistência genética se obtém reação específica a um determinado fator biótico, os mecanismos de defesa são bem mais abrangentes, gerando metabólitos capazes de proteger o organismo de vários agressores ao mesmo tempo, tanto pelo espectro de ação de certos metabólitos, quanto pela biossíntese de diversas substâncias de defesa.

A relativa pequena especificidade de diversos metabólitos de defesa tem uma importância muito grande na construção de estratégias de proteção de plantas, principalmente à luz dos novos conhecimentos da bioquímica, genética e biologia molecular, desde o desenvolvimento de

técnicas de ativação da defesa das plantas, até mesmo a transferência de genes envolvidos nesses mecanismos.

O estudo dos metabólitos secundários das plantas tem inestimável interesse prático, na busca de novas moléculas inseticidas, fungicidas, bactericidas, drogas medicinais em geral, ou mesmo para outros fins, como na área industrial, na fabricação de diversos produtos de usos mais variados. Com os avanços da biologia molecular, genes que codificam metabólitos de defesa podem ser transferidos para espécies cultivadas ou mesmo superativados nelas, para aumentar os níveis dos compostos de defesa. Uma possibilidade excitante e que começa a ganhar espaço nos projetos de pesquisa em todo o mundo é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, alelopáticas às ervas daninhas, dispensando o uso dos herbicidas sintéticos, como são substituídos os fungicidas e inseticidas, quando se opta pela resistência genética.

É a partir do conhecimento de como funcionam os mecanismos de defesa das plantas que será possível traçar objetivos mais audaciosos, e para chegar até a essência dos mesmos, ou seja, para compreender as causas, há que primeiramente entender tais fenômenos.

Estudos relativamente recentes têm demonstrado que os mecanismos de defesa envolvem a recepção de sinais e o conseqüente desencadeamento de cascatas de sinais em que quinases fosforiladas em vários níveis (cascatas MAPKs) resultam na fosforilação e ativação de fatores de transcrição de genes que envolvem os mecanismos de defesa das plantas. Fito-hormônios, principalmente etileno (ET), ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), participam sob diversas formas: são produzidos nas reações a sinais; interagem entre si, sinérgica ou antagonicamente; e ainda atuam como agentes indutores endógenos.

Ganha cada vez mais em importância o estudo da participação do etileno nesses eventos. Entretanto, quanto mais se avança nas investigações, mais fica evidente a interação entre ET, SA e JA, de

maneira que é praticamente impossível referir-se a um sem que haja necessidade de explicar a participação de outro.

2.5.1. Resposta das plantas ao ataque de pragas

A resposta a estresses ambientais, por partes dos seres vivos, parece ter origem comum, dadas certas similaridades entre seqüências encontradas até hoje em diferentes espécies.

O que caracteriza os genes chamados de homeóticos é a condição de um ou pouco genes serem responsáveis por alterações drásticas no desenvolvimento de um organismo e por serem conservados (genes homeobox) milhões de anos, de forma que peixes, mamíferos, insetos e outros, possam compartilhar seqüências de DNA similares (TAIZ & ZEIGER, 1998). Certamente a seleção natural tem atuado drasticamente sobre as mutações nesses genes, já que, como se tem demonstrado na prática, mutantes desses genes são geralmente letais ou deletérios. A anantepedia é um exemplo do que pode acontecer, quando ocorre mutação num simples gene, determinando o desenvolvimento de pernas no lugar de antenas, em drosófila.

Em razão da natureza e função dos genes que as espécies compartilham entre si, não deve ser surpresa que possa haver similaridades também com relação a genes relacionados com respostas ao ambiente. A conservação desses genes se deve, provavelmente e basicamente, a que a resposta inicial a um estresse ambiental se dá ao nível celular, desencadeando outras reações, que vão se diferenciando ao longo da cadeia, para resultar em respostas específicas, aí sim, em nível de espécie, ou mesmo de indivíduo. Por exemplo, a maioria das relações entre plantas e fungos é governada por interações complementares entre os produtos dos genes do patógeno (avr-avirulência) e os correspondentes alelos dos loci de resistência (R). Pois alguns desses

genes R recentemente clonados têm significativa similaridade com os genes envolvidos na cascata de sinais, durante o desenvolvimento em *Drosophila* e humanos (DANGL & JONES, 2001). Em plantas, a defesa por sinalização foi tão conservada que atravessou a barreira entre as espécies, ao nível de elementos (seqüências) atuadores *Cis*, que muitos promotores têm funcionado perfeitamente, independentemente da espécie em que seja inserido (RUSHTON et al., 2002).

O crescimento depende basicamente de divisão celular, que todos os seres vivos “aprenderam” com as bactérias; e divisão celular, uma revolução na evolução, é uma invenção dos primeiros seres pluricelulares, que até hoje não encontrou substituição, como “técnica” de diferenciação e desenvolvimento, durante a evolução. Os genes envolvidos nesses processos devem ter sido relativamente conservados por bilhões de anos, já que mutações drásticas neles foram e continuam sendo inviáveis.

A resposta a estresses bióticos e abióticos, ocorrendo em nível celular, não deve ter seguido outro caminho, que não seja ter sido preservada de maneira similar, através da conservação de seqüências de DNA, similares entre espécies tão divergentes como insetos, mamíferos, fungos e plantas. A existência de seqüências sem função nos animais, que guardam similaridades com genes de plantas relacionados a algumas dessas respostas, podem ser muito importantes no melhoramento animal, no sentido de se obter genótipos mais adaptados a estresses ambientais, pela reativação de tais genes, recolocando seqüências perdidas em processos de mutação.

A defesa das plantas pode ter surgido a partir da seleção de mutações herdáveis. Mutações ao acaso em rotas básicas do metabolismo levaram ao aparecimento de novos compostos que resultaram tóxicos aos herbívoros e microorganismos. Uma vez que tais produtos não fossem tóxicos às próprias plantas e não significassem um custo de produção muito alto, poderia determinar uma maior adaptação reprodutiva, relativamente às plantas sem defesa, proporcionando a que pudessem

deixar uma maior descendência, passando com mais eficiência tais caracteres de defesa para as próximas gerações. Em adição, as plantas desenvolveram a capacidade de armazenar produtos tóxicos, inclusive às suas próprias células, depositando-se nos vacúolos ou mesmo conjugando-os como compostos sem atividade, aptos a entrar em ação, tão logo se faça necessário.

2.5.2. Considerações sobre expressão gênica e transdução de sinal

Como as plantas não se movem, devem se adaptar às condições adversas do ambiente, ajustando seu metabolismo. Portanto é importante saber como as plantas respondem inicialmente aos estresses ambientais e como estes estímulos são convertidos em sinais endógenos, que levam eventualmente à adaptação fisiológica.

As plantas utilizam uma grande amplitude de mecanismos para resistirem ao ataque de outros organismos, desde um conjunto de barreiras mecânicas e químicas presentes na epiderme, até uma segunda bateria de defesas mais internas, que envolvem não só interações gene-específicas, entre resistência e avirulência, mas também múltiplos processos de defesa relativamente inespecíficos, ainda pouco conhecidos (DANGL & JONES, 2001).

A ativação da defesa das plantas, como resultado do reconhecimento do agente agressor envolve uma complexa maquinaria de sinais, integrados entre si e com a participação, igualmente integrada em todos os sentidos, de fito-hormônios e outras moléculas, todos atuando de forma a amplificar e repassar sinais, com a finalidade de ativar fatores de transcrição de genes de defesa (SUSUKI et al., 2003). O estudo dessas complexidades, que envolve mutantes com perda-de-função e ganho-de-função, atualmente está sendo facilitado com o uso da tecnologia do DNA

recombinante (TAIZ & ZEIGER, 1998), ou seja, com as chamadas plantas transgênicas.

A integração dos sinais ambientais durante as várias fases do ciclo de vida da planta se dá pela ação coordenada e simultânea de vários hormônios, uma vez que as mutações na via de síntese de um hormônio alteram, em muitos casos, a síntese de outro. A obtenção de plantas transgênicas alteradas nas vias de síntese de hormônios é de grande interesse econômico e tem sido alvo de intensa pesquisa. Os sinais ambientais (Figura 1) podem ser ferimentos, peptídeos, produtos derivados de microorganismos e patógenos, além de outros agentes do meio ambiente como luz, gravidade, temperatura, vento, água, nutrientes e minerais do solo (SOUZA & SILVA, 2001).

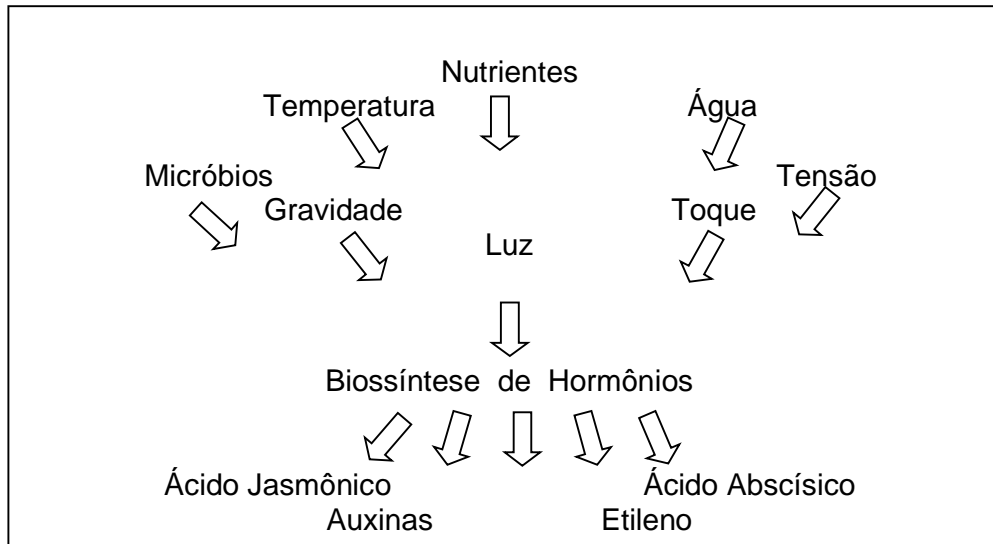


FIGURA 1. Síntese de hormônios em resposta a fatores ambientais (SOUZA & SILVA, 2001).

Recentes estudos têm demonstrado que cascatas MAPKs desempenham importantes funções na resposta das plantas a múltiplos estresses (ZHANG & KLESSIG, 2001; YOSHIOKA et al., 2003). Embora membros de diversas subfamílias MAPKs têm sido relatados em plantas, as exatas funções ainda não estão esclarecidas. Evidências sugerem que

há um conjunto de respostas compartilhadas para estresses bióticos e abióticos, como a geração da reação de estresse oxidativo (ROS) e ativação precoce de genes de defesa. As MAPKs parecem ser um dos pontos de convergência do complexo de sinalização de defesa.

Cascatas de proteínas quinases ativadas mitogenicamente são os maiores componentes situados *downstream* de receptores ou sensores que transduzem estímulos extracelulares em respostas intracelulares em fungos e animais. O conjunto básico de uma cascata MAPK é um módulo de tripla-quinase conservada em todas os eucariotos. MAPK é a última quinase ativada por dupla fosforilação nos resíduos de tirosina e treonina num peptídeo motivo, localizado na alça de ativação entre os subdomínios VII e VII do domínio catalítico da quinase. A fosforilação é mediada pela quinase MAPKKK, que ativa MAPKK, que finalmente ativa MAPK (ZHANG & KLESSIG, 2001). Ver Figura 2 (SOUZA & SILVA, 2001).

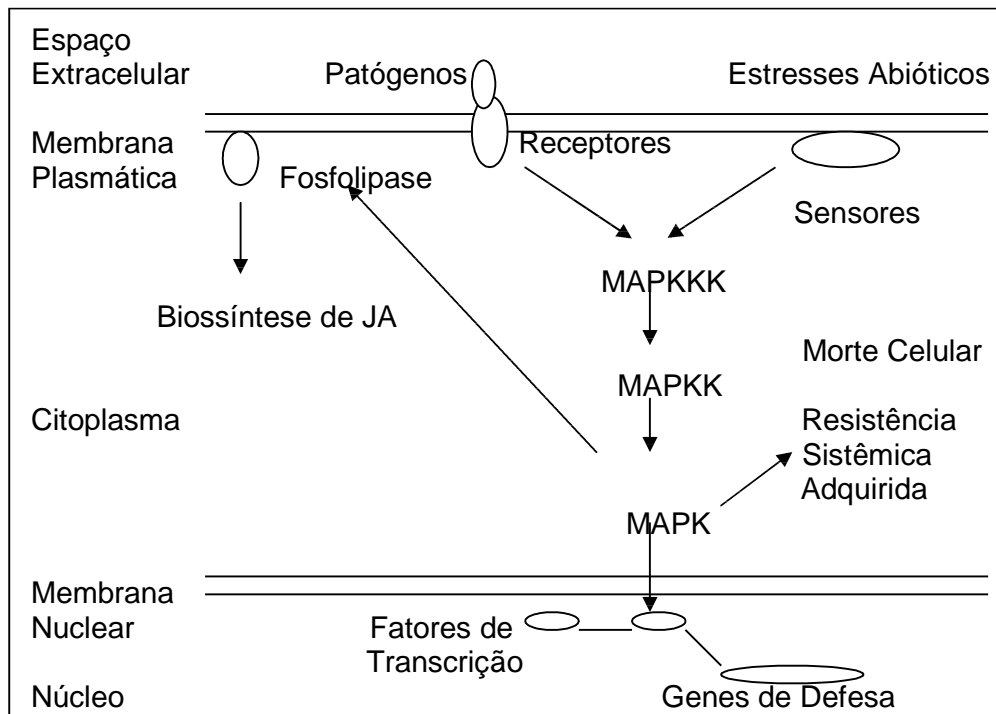


FIGURA 2. Ativação da resposta de defesa através da cascata da MAP quinase (MAPK)- SOUZA & SILVA, 2001.

De forma sucinta, a expressão gênica e a transdução de sinais se dá, de uma maneira geral, nas diversas etapas a seguir como na Figura 3, modificada, a partir de figuras de ZAHA (1996) e TAIZ & ZEIGER (1998).

1. Para que a transcrição possa ocorrer, a RNAPol II deve se acoplar à região TATA Box do promotor. Entretanto, há necessidade de que os fatores gerais de transcrição (7 principais conhecidos) se juntem à RNAPol II, formando um complexo. A montagem e funcionamento do complexo dependem ainda de outros fatores e regulação coordenada.

2. Fatores de transcrição específicos, que se ligam a seqüências atuadoras *Cis*, são chamados de fatores atuadores *Trans*, pois os genes que os codificam estão em qualquer parte do genoma.

3. As seqüências atuadores *Cis* (CAAT Box e GC Box) são sítios de ligação dos fatores de transcrição. São seqüências proximais (até -100 bp *upstream* do início da transcrição).

4. Outras seqüências atuadoras *Cis*, *upstream* das seqüências proximais, podem exercer controle positivo ou negativo sobre o promotor. Estas seqüências atuadoras *Cis* (*upstream*) são chamadas de seqüências reguladoras distais, localizadas -1000 bp do sítio inicial de transcrição. Podem ser ativadoras ou repressoras da transcrição.

5. As seqüências atuadoras *Cis*, envolvidas na regulação por hormônios ou outros sinais são chamadas de elementos de resposta.

6. Situados a dezenas de milhares de bp, *upstream* ou *dowstream* do promotor, os *enhancers* são elementos de controle, que ativam genes.

7. Os fatores de transcrição (específicos) , ou fatores atuadores *trans*, são proteínas regulatórias, que contém homeodomínio, atuam sobre as seqüências reguladoras proximais e distais, sobre os *enhancers* e inclusive na montagem do complexo RNAPol II + Fatores Gerais de Transcrição.

8. Os fatores de transcrição (compostos de diversas sub unidades), inclusive os fatores gerais de transcrição contêm motivos estruturais específicos (sub unidades), que são capazes de fazer a ligação dos fatores de transcrição com a dupla hélice do DNA. São denominados hélice-volta-hélice, dedo-de-zinco, hélice-alça-hélice, zíper-de-leucina e zíper-básico.

9. Há ainda uma região controladora de locus (LCR) (*upstream*), definida como a região que controla a expressão de um transgene, independentemente do sitio de interação no genoma. O LCR tem papel fundamental na competição entre diferentes genes de um mesmo locus.

10. Os hormônios e outros sinais podem ter, como resultado final, a ativação de fatores de transcrição que agem sobre as seqüências regulatórias distais, chamadas de elementos de resposta.

11. Os hormônios esteróides interagem nesta região (elementos de resposta, de -100 a -1000 bp *upstream*) com fatores de transcrição, chamados de receptores de hormônios esteróides ou diretamente nos *enhancers*, agindo neste caso como se fossem fatores de transcrição.

12. Os esteróides por serem lipofílicos agem no citoplasma ou mesmo no núcleo, ligando-se muitas vezes diretamente a fatores de transcrição, dispensando intermediários, como no caso dos hormônios hidrofílicos, que precisam de receptores de membrana e amplificação de sinal.

13. Os hormônios hidrofílicos ou outros sinais são reconhecidos por receptores de membranas, a partir dos quais se estabelece uma cascata de fosforilações até os fatores de transcrição, a partir dos quais os sinais são finalmente traduzidos em efeitos fisiológicos.

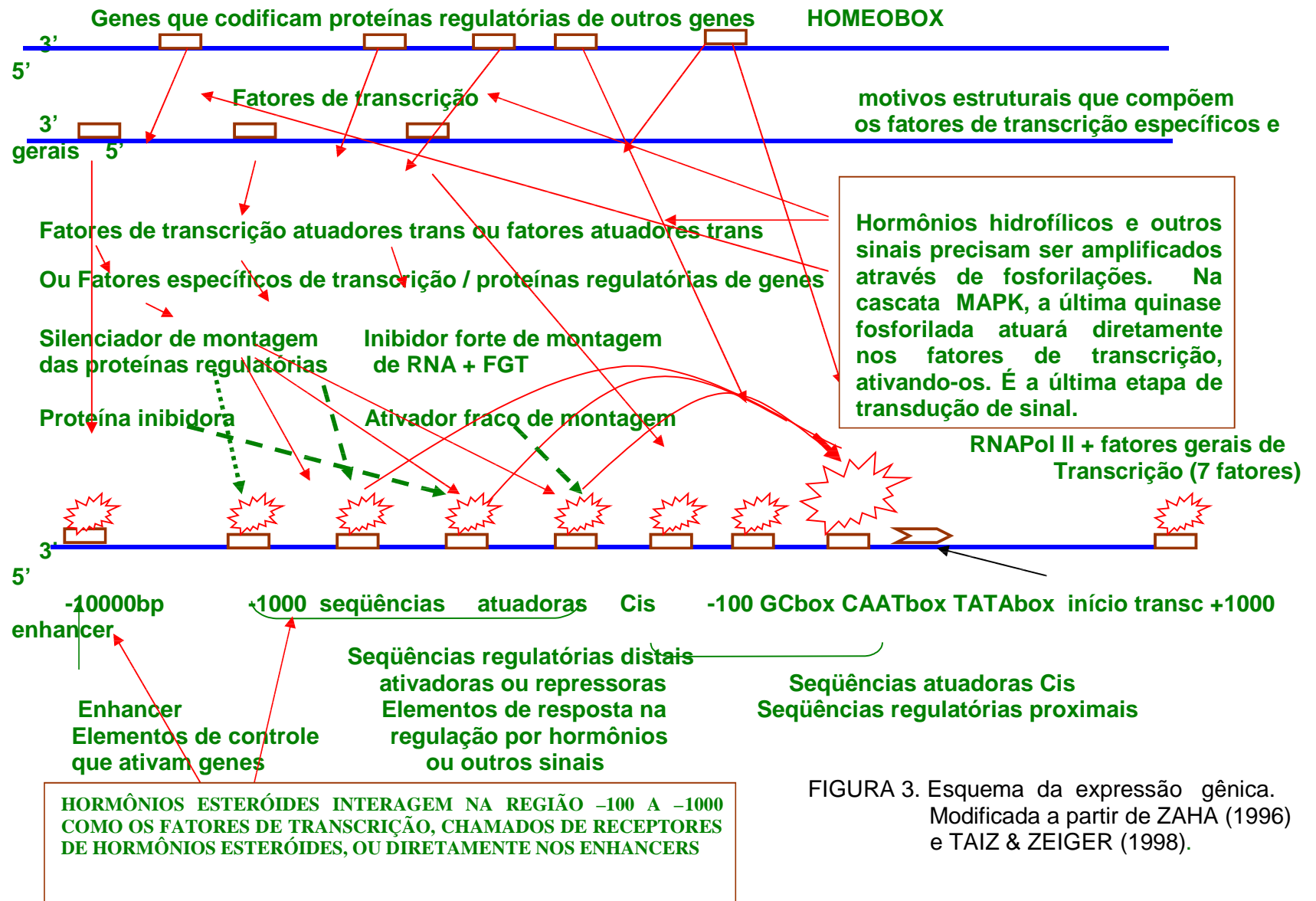


FIGURA 3. Esquema da expressão gênica. Modificada a partir de ZAHA (1996) e TAIZ & ZEIGER (1998).

2.5.3. Sinalização para resposta local e sistêmica de plantas ao ataque de patógenos e a fitófagos.

As plantas respondem a infecções por patógenos e a ferimentos por herbívoros, produzindo metabólitos de defesa de baixo peso molecular, como etileno, ácido jasmônico, ácido salicílico, óxido nítrico, poliaminas e reação oxidativa (ROS), que induz à expressão de uma série de genes que codificam compostos de defesa como as proteínas relacionadas à patogênese (PR), que estão envolvidas na resistência a moléstias e cicatrização de ferimentos (CUI et al., 2002; SEO et al., 2003; YOSHIOKA et al., 2003). A ativação de diversos genes R (relacionados à patogênese) pode ainda, sob condições normais, além de melhorar a resistência a patógenos, promover tolerância a estresse osmótico (PARK et al., 2001).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) é o fenômeno pelo qual a inoculação de uma folha de uma planta provoca a resistência de hipersensibilidade local, seguida da geração de um sistema de sinais que levam à transdução da resposta de resistência a outras partes da planta, prevenindo o organismo para futuras infecções (RYALS et al., 1996; MALECKA et al., 2002 ; YOSHIOKA et al., 2003). A SAR é induzida como resposta da planta à infecção por um patógeno necrogênico e pela própria resposta de hipersensibilidade (LAWTON et al., 1995; MALECKA et al., 2002). Na planta induzida, a SAR promove a proteção não só contra o patógeno indutor, mas também contra muitos outros microorganismos não correlacionados (LAWTON et al., 1995) e até mesmo contra insetos (CUI et al., 2002). A SAR compartilha muitos eventos com a resistência local, inclusive o envolvimento do ácido salicílico (SA), componente necessário para a completa ativação da resposta de genes de defesa e da ruptura oxidativa (do inglês *oxidative burst*, MUR et al., 1996). A produção desse estresse oxidativo ou ROS (do inglês *reactive oxygen species*) é uma das respostas mais precoces em plantas, na resistência a infecções por

patógenos. O ROS também implica na ativação de respostas adaptativas sob estresses abióticos, incluindo lesão, exposição a ozônio, radiação ultravioleta-B e choque osmótico. Todos estes estresses ativam MAPK em ação que precede ou é paralela à produção de peróxido de hidrogênio (ZHANG & KLESSIG, 2001; ; YOSHIOKA et al., 2003). A produção de peróxido, ou ainda, a lesão provocada pelo mesmo, pode alimentar a rota de MAPK, formando uma espécie de retroalimentação (*feedback*) positiva.

Estudos bioquímicos e genéticos demonstram que a SAR está associada com a acumulação de ácido salicílico e que a geração da reação oxidativa intermedeia a chamada reação de hipersensibilidade (HR). Em *Arabidopsis* a proteína NPR1 é essencial na regulação da expressão de genes dependentes de ácido salicílico, durante a resistência sistêmica adquirida (DESPRÈS et al., 2003). NPR1 interage de forma variada com membros da classe TGA de fatores de transcrição de domínio básico/zíper de leucina e regula a atividade de ligação destes fatores com o DNA. Tratamento com ácido salicílico também induz a interação entre estas proteínas em folhas de *Arabidopsis*, fortalecendo o argumento de que SA é um modulador redox do resíduo de cisteína da proteína TGA1, exercendo seu efeito, pelo menos em parte, através dos fatores TGA. As propriedades de TGA1, entretanto, dependem da interação com o cofator NPR1. Também em *Arabidopsis*, foi identificado o gene HLM1, um componente *downstream* na rota de sinalização da HR (BALAGUÉ et al., 2003). HLM1 codifica para CNGC4, um nucleotídeo cíclico mediador de canal de íons, permeável a K⁺ e Na⁺, ativado por cGMP e cAMP. Ainda em *Arabidopsis*, LU et al. (2003) clonaram e caracterizaram o gene ACD6, que codifica uma proteína transmembrana responsável pelo aumento da resposta à sinalização por ácido salicílico. Os níveis de mRNA de ACD6 aumentaram em tecidos não infectados de plantas infectadas por *Pseudomonas syringae*, assim como em plantas tratadas com benztiazol (agonista de SA).

Em plantas de tabaco infectadas por patógenos ou lesionadas, a ativação de uma proteína quinase induzida por ferimentos (WIPK), ou seja, uma proteína quinase mitogenicamente ativada em tabaco, tem sido comumente implicada na resposta de defesa; entretanto, o sinal endógeno responsável pela ativação somente agora foi identificado (SEO et al., 2003). A substância ativadora de WIPK foi isolada de folhas de tabaco pelos referidos autores acima, identificada como (11E,13E)-labda-11,13-diene-8 β ,15-diol e designada como WAF-1. Aplicada em concentrações nanomolares nas folhas, WAF-1 natural ou sintética ativou WIPK e promoveu o acúmulo de transcritos (mRNA) de genes relacionados à defesa e induzíveis por patógenos ou ferimentos. Além do mais, plantas tratadas com WAF-1 foram mais resistentes ao vírus do mosaico do tabaco (TMV), sugerindo que este composto é um sinal endógeno na mediação de respostas de plantas de tabaco ao TMV e ferimentos. Como WIPK é ativada durante a resposta de hipersensibilidade ao TMV em cultivares de tabaco resistentes, que contêm o gene N (SEO et al., 2001), fica evidente a participação de WAF-1 como sinal endógeno central, responsável pelo desencadeamento da resposta de defesa.

Semelhante a peptídeos transdutores de sinais em mamíferos, foi identificado em tomateiro e tabaco um peptídeo de 18 aminoácidos (sistemina), produzido logo após um dano físico (ferimento ou injúria) nas folhas das plantas (PEARCE et al., 1991), resultando na ligação a um receptor, que leva à transdução do sinal através de uma cascata análoga à sinalização nos animais (SCHALLER & OECKING, 1999), com os ácidos fitodienóico e jasmônico de intermediários (BERGEY et al., 1996). O possível mecanismo de ação da sistemina envolve o fluxo de prótons através da membrana plasmática e a modulação da atividade do canal H⁺-ATPase (SCHALLER & OECKING, 1999).

Uma nova família de metiltransferases foi identificada em *Arabidopsis*, onde alguns membros foram caracterizados como catalizadores na

formação de pequenas moléculas de metil ésteres precursores na formação de SA e JA (ZUBIETA et al., 2003). Outros membros também foram identificados como catalizadores de precursores de cafeína e ácido indolacético, que também podem estar envolvidos em respostas de defesa.

WANG et al. (2003) evidenciaram que uma adenosina quinase desempenha importante papel na defesa contra ataques virais. HAO et al. (2003) encontraram uma quinase SNF1, com função na regulação do metabolismo dos carboidratos, também associada com a defesa contra viroses.

TALER et al. (2004) descreveram outra forma de “resistência enzimática a moléstias” associada com a expressão de glioxalato aminotransferases sintetizadas nos peroxissomos, em *Cucumis melo*, que confere resistência contra o míldio, causado por *Pseudoperonospora cubensis*. Glicolato oxidase cataliza a oxidação do ácido glicólico para produzir glioxalato e H₂O₂, que teria um papel fundamental na resposta de hipersensibilidade, que levaria à resposta de resistência ao míldio.

ECKARDT (2004), comentando a edição de Plant Cell, volume 15, argumenta que, em função de diversos trabalhos nos últimos anos, aumentam as evidências de que, pelo menos em alguns casos, genes expressados constitutivamente e que codificam enzimas do metabolismo normal das plantas, também desempenham papel importante na indução da defesa contra patógenos.

Os avanços no conhecimento dos mecanismos da SAR permitem prever o incremento no desenvolvimento de plantas que expressam a resistência constitutivamente, pela expressão ectópica da resposta de defesa (SUSUKI et al., 2004). Plantas transgênicas de tabaco, por exemplo, apresentaram genes de defesa PR expressados constitutivamente, mostrando resistência a diversas infecções virais e fúngicas. Dois genes bacterianos que convertem corismato em ácido salicílico foram transferidos para os cloroplastos, promovendo um

aumento no acúmulo de ácido salicílico de 500 a 1000 vezes em comparação com o controle (VERBENE et al., 2000).

Experimentos com plantas transgênicas (LAWTON et al., 1995) de *Arabidopsis* que expressam o gene nahG bacteriano, que codifica a enzima salicilato hidroxilase, que metaboliza o ácido salicílico, demonstram a função crucial que o SA desempenha na SAR, pois a expressão deste gene foi capaz de impedir a acumulação de ácido salicílico induzida por patógeno e até mesmo a ativação da SAR por aplicação de SA endógeno.

2.5.4. Biossíntese do etileno e expressão de genes de resposta ao etileno

Por regular muitos processos no desenvolvimento de plantas, o etileno tem sido o hormônio vegetal mais largamente utilizado na agricultura. Auxina e ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) que podem desencadear a síntese natural do etileno, são também recomendados em várias práticas agrícolas (TAIZ & ZEIGER, 1998). Por ser um gás o etileno não é aplicado diretamente: O etefom (ácido 2-cloroetilfosfônico) tem sido o composto mais largamente empregado na agricultura. Pulverizado sobre as plantas em solução aquosa, é prontamente absorvido, transportado dentro da planta e lentamente convertido em etileno (e ânion cloro), permitindo que o fito-hormônio exerça seus efeitos.

Em geral, as regiões meristemáticas e nodais são as mais ativas na síntese de etileno. Além da produção de etileno aumentar durante a ocorrência de diversos eventos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (abscisão, senescência, maturação e outros), qualquer tipo de ferimento pode induzir a biossíntese de etileno, como também estresses fisiológicos tais como calor, frio, seca,

inundação, geadas e ataque de moléstias (TAIZ & ZEIGER, 1998; WINZ & BALDWIN, 2001).

O etileno tem efeitos profundos em muitos eventos no desenvolvimento e em respostas ambientais. A produção endógena deste hormônio aumenta durante certos estágios do crescimento e desenvolvimento, como a germinação, maturação, senescência e abscisão de flores e folhas, e em resposta à seca, encharcamento, geada, ferimentos, infecções por patógenos e substâncias químicas (TAIZ & ZEIGER, 1998; LIU et al., 1999; WANG et al., 2002). TAIZ & ZEIGER (1998) acrescentam ainda o próprio etileno (autocatálise), metais pesados, luz ultravioleta, auxina e condições físicas do solo, como indutores da produção de etileno.

A sensibilidade ao etileno é mediada por um receptor, que ativa uma cascata de sinais (RAZ & FLUHR, 1993). Os referidos autores estudaram os efeitos da aplicação do etileno, observando a ocorrência de fosforilação de proteínas em folhas de tabaco. Na presença de inibidores de quinases a fosforilação foi bloqueada, ao mesmo tempo em que estes inibidores bloquearam a resposta induzida por um elicitador dependente de etileno. Reciprocamente, inibidores de fosfatases favoreceram a fosforilação dessas proteínas quinases. Os resultados sugerem que a responsividade ao etileno em folhas de tabaco é transduzida via fosforilação, regulada por específicas quinases e fosfatases.

Em *arabidopsis* foram caracterizados dois dos genes que compõem as vias de resposta ao etileno (KIEBER, 1997). Esses dois genes isolados envolvem uma cascata de proteínas quinases, como resposta ao etileno: um deles codifica para uma proteína similar aos genes da família Raf de proteínas quinases Ser/Thr; um segundo gene codifica um receptor de etileno. Em tomateiro, foi demonstrado que cascatas de proteínas quinases (MAP) ativadas mitogenicamente, são prontamente ativadas durante a resposta das plantas a patógenos avirulentos ou elicitores derivados de patógenos (MAYROSE et al., 2004). A MAP quinase

LeMPK3 de tomateiro é especificamente induzida em nível de mRNA durante a elicitação da resposta hipersensível em plantas resistentes infectadas por linhas avirulentas da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, bem como logo após o tratamento com o elicitor de fungo xilanase, dependente de indução por etileno. A autofosforilação de LeMPK3 mostrou dependência de Mn^{++} e sugere que esta quinase representa um ponto de convergência na rota de sinais que ativam resposta de defesa em tomateiro.

O etileno promove a transcrição de muitos genes relacionados com a maturação, inclusive aqueles envolvidos com a degradação da parede celular e biossíntese de carotenóides. As lipoxigenases (LOX) catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados, contendo uma estrutura cis, cis-pentadieno, e parecem estar envolvidas em respostas a estresses, ferimentos, ataque de patógenos e produção do aroma (GRIFFITH et al, 1999). Os principais substratos das LOX em tomate são os ácidos linoleico e linolênico, resultando na produção de aldeídos de 6 carbonos, produzindo o aroma típico do tomate fresco. Existem diversas isoformas de LOX individuais, que parecem ser reguladas diferentemente e com distintas funções no amadurecimento do tomate.

São inúmeros os trabalhos que relacionam diversos processos no desenvolvimento e crescimento, em resposta à presença de etileno e regulação das respostas a partir da regulação da expressão gênica. Um outro aspecto da questão que tem sido intensamente investigado, é a regulação da biossíntese de etileno, que envolve outros complexos processos regulatórios e bastante relacionados com o balanço hormonal. Apesar da diversidade de efeitos do etileno no desenvolvimento, as etapas primárias de sua ação são similares em todos os casos: Todas envolvem ligação a um receptor, seguida por ativação de uma ou mais rotas de transdução de sinais, levando à resposta celular. Recentemente muito se tem aprendido sobre o mecanismo de ação do etileno através da

análise da resposta ao etileno de mutantes em *Arabidopsis* (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Nas plantas superiores o etileno é sintetizado a partir da metionina, numa via bem definida, onde o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintase e ACC oxidase (enzimas citosólicas) catalisam as reações de S-adenosilmetionina para ACC e ACC para etileno, respectivamente (KENDE, 1993). Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, clones de genes e de cDNA para ambas enzimas têm sido isolados para várias espécies de plantas, sugerindo serem codificadas por famílias multigênicas. Usando os clones de cDNA tem sido possível caracterizar a expressão individual de diversos membros em diferentes tecidos e em resposta a estímulos específicos conhecidos como indutores da síntese de etileno (LIU et al., 1999).

As frutas são classificadas como climatéricas e não climatéricas, com base em seus padrões de respiração e produção de etileno durante a maturação. Em frutas climatéricas é aceito que o etileno tem um importante papel na maturação e que a produção em grande quantidade deste hormônio começa com a entrada no período climatérico respiratório, sendo que a aplicação de etileno exógeno induz a maturação e a produção endógena do gás (TAIZ & ZEIGER, 1998). Neste período, a ACC sintase e ACC oxidase são induzidas e contribuem na regulação da biossíntese do etileno. A expressão dos genes da ACC sintase e ACC oxidase tem sido investigada em muitas frutas (maçã, tomate, melão, pêra, banana, quivi e outras).

A banana, uma das frutas climatéricas mais características e de importância comercial muito grande, é amadurecida através de etileno exógeno. Na maioria das frutas climatéricas a produção de etileno aumenta com a entrada no período climatérico, chega a um limite superior e depois decresce, paralelamente a alterações na respiração climatérica no decorrer de todo o estágio da maturação (LIU et al., 1999). Nas frutas não climatéricas tais respostas não ocorrem, já que a maturação não é

afetada pela presença de etileno. Entretanto se sabe que as plantas podem responder a estresses bióticos e abióticos com a produção de etileno, que por sua vez, desencadeia reações que podem levar a produção de metabólitos secundários, inclusive de defesa. Se as plantas (frutas) climatéricas respondem à aplicação de etileno, apressando a maturação, pela síntese e degradação de diversos compostos, é de se supor que os vegetais em geral poderiam responder a aplicações exógenas de etileno, produzindo metabólitos de defesa, prevenindo o ataque de moléstias, por exemplo. Assim, é necessário compreender o que ocorre nos diversos níveis relacionados à produção de etileno e interações com outros fito-hormônios. Desta forma, trabalhos que envolvem estudos da produção de etileno no desenvolvimento das plantas são imprescindíveis também para que se avance na compreensão dos mecanismos que envolvem a produção de etileno, seu envolvimento na produção de substâncias de defesa das plantas e interação com outros fatores.

Em nível molecular, diversos trabalhos demonstram que o padrão de mudanças na taxa de produção de etileno é correlacionado com os padrões de mudanças nos níveis de transcrição dos genes da ACC sintase e ACC oxidase. Entretanto, diferentemente da maioria das frutas estudadas, em banana ocorre uma grande elevação e depois uma queda na taxa de produção de etileno no começo da respiração climatérica. Assim, é importante analisar aos níveis molecular e bioquímico, os possíveis mecanismos envolvidos no pico de produção de etileno no estágio climatérico precoce em banana. LIU et al. (1999) isolaram três diferentes cDNAs para ACC sintase e um para ACC oxidase de banana, analisando também a expressão destes genes durante a maturação. Foi demonstrado existir um possível mecanismo regulador do abrupto pico na produção de etileno no período inicial do avanço no climatérico, mostrando um possível envolvimento de um nítido decréscimo na atividade da ACC oxidase dependente da disponibilidade de seus co-

fatores (ascorbato e ferro). Observe-se que se ascorbato e ferro são cofatores da ACC oxidase, a deficiência deles em qualquer planta poderia restringir a produção de etileno e, portanto, a própria resposta a estresses bióticos e abióticos.

BARTH et al. (2004), trabalhando com mutantes deficientes na produção de ascorbato, avaliaram as respostas destas plantas a estresses bióticos (patógenos virulentos) e em relação à senescência. Os genótipos mutantes mostraram maior resistência a *Pseudomonas syringae* e *Peronospora parasitica* do que o genótipo selvagem, pela indução da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR), além de senescência prematura e aumento nos níveis de ácido salicílico. Assim, neste caso, se ascorbato é limitante de etileno, não o é para ácido salicílico, que seria estimulado pela deficiência do mesmo. Entretanto a resposta a esses fatores vai depender do genótipo em questão, pois provavelmente uma linhagem com pouca sensibilidade ao ácido salicílico, com reduzida disponibilidade de ascorbato, não teriam seus níveis de SA aumentados, nem tampouco de etileno, resultando provavelmente em aumento da suscetibilidade a patógenos.

Por outro lado, trabalhando com as mesmas linhagens mutantes de *Arabidopsis*, PASTORI et al. (2003) observaram que apesar da superprodução constitutiva das proteínas PR e de enzimas defensivas, não houve alteração nos níveis de fenilalanina-amônia-liase (PAL), requerida para a produção de fitoalexinas e ácido salicílico, sugerindo que a ativação da defesa neste caso é independente de SA. A super produção de ácido abscísico (ABA) detectada foi então considerada como o principal fator que determinou, nos mutantes *vtc1*, crescimento lento, retardamento na maturação e aceleração da senescência, além de intermediar a indução de proteínas PR. BARTH et al. (2004), apesar de detectarem também aumento nos níveis de ABA, creditam aos acréscimos nos níveis de SA detectados, a ativação dos genes PR e

sugerem outras rotas, que não a dependente de PAL, na biossíntese de ácido salicílico.

Os fito-hormônios são fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas e a resistência a pragas de uma maneira geral está relacionada com os estádios de desenvolvimento durante o ciclo da espécie vegetal. A resistência relacionada à idade da planta (ARR) tem sido observada em muitas espécies (KUS et al., 2002). Os mecanismos químicos e moleculares envolvidos neste tipo de resposta ainda são pouco conhecidos. Em *Arabidopsis*, as plantas tornam-se menos sensíveis a *Pseudomonas syringae*, conforme avançam no ciclo, mostrando aumento do acúmulo de ácido salicílico. Entretanto etileno, ácido jasmônico, ácido abscísico e outros devem ter também papel importante nesses eventos, agindo sinergisticamente ou antagonicamente entre si.

Para se ter uma idéia de como são importantes tais estudos, LIU et al. (1999) incluíram nas suas análises a resposta a estresses físicos, no caso, ferimentos. Foram sintetizados cDNAs a partir de RNAs isolados de banana em maturação, com ferimento e tratadas com etileno, que serviram como moldes para a transcriptase reversa, a partir de *primers* para a ACC sintase, ACC oxidase e actina. O mRNA foi isolado de bananas em maturação, tratadas com etileno e com ferimento. Foram identificadas duas seqüências entre ACC sintases codificadas por uma família multigênica, relacionadas com a maturação e com ferimentos. Estresses ambientais bióticos e abióticos determinam um aumento na produção de etileno e em todos os casos o etileno é sintetizado pela rota usual; os resultados têm demonstrado, pelo menos em parte, que estes incrementos têm sido devidos ao aumento da transcrição de mRNA ACC sintetase (TAIZ & ZEIGER, 1998),

O etileno, além de ser produto da regulação gênica, têm o efeito endógeno de regular a expressão gênica em outros eventos. Um dos efeitos primários do etileno é aumentar a expressão de vários genes

alvos, promovendo o incremento nos níveis de transcrição de mRNA de genes como aqueles que codificam celulase, quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase, chalcone sintase (enzima chave na biossíntese de flavonóides), e proteínas relacionadas à patogênese (PR), bem como de outros genes relacionados à maturação e da própria biossíntese do etileno. Sequências regulatórias *cis*, chamadas de elementos de resposta ao etileno (EREs), que conferem responsividade ao etileno para um promotor mínimo, têm sido identificadas em genes PR, regulados por etileno e um motivo GCCGCC repetitivo já foi também identificado, usando genes repórteres, ambos necessários e suficientes para a regulação do gene (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Quatro proteínas que se ligam a seqüências ERE (elementos de resposta ao etileno) foram identificadas em tabaco. Tais proteínas são chamadas de proteínas ligantes a ERE (EREBPs). Os genes que codificam EREBPs parecem representar a resposta primária ao etileno de genes, cujos produtos podem regular a expressão de genes de resposta secundária, como os genes PR. Os domínios de ligação dessas EREBPs têm sido localizados para uma região de 59 aminoácidos que mostra similaridade com a proteína nuclear AP2, envolvida no desenvolvimento das flores em *Arabidopsis*. Os níveis destas EREBPs aumentam drasticamente após a aplicação de etileno (TAIZ & ZEIGER, 1998). Em tomateiro foram identificadas três proteínas que interagem com uma proteína serina-treonina quinase, produto do gene Pto de resistência (GU et al., 2002), que pertencem à família do fator de resposta ao etileno (ERF) de fatores de transcrição única, que especificamente se ligam ao elemento *cis* GCC-box, presente nos promotores de diversos genes de proteínas relacionadas à patogênese. Fatores ERF, induzidos por linhas virulentas e não virulentas de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* também foram identificados em *Arabidopsis* (OÑATE-SÁNCHEZ, L & SINGH, 2002).

Estudos em tomateiro têm demonstrado que a expressão gênica relacionada ao etileno é regulada pelo menos por duas rotas independentes: uma onde a transcrição é regulada por etileno, inclusive envolvendo ACC e outra etileno-independente, envolvendo ACC oxidase, mas cuja tradução parece ser regulada por etileno (TAIZ & ZEIGER, 1998).

A partir da identificação de mutantes para resposta ao etileno tem sido possível desvendar diversos componentes da rota de transdução de sinal do etileno; com isto, o receptor de etileno é presentemente o receptor de fito-hormônio melhor caracterizado a ponto de ter sido modelo para outras rotas de sinalização em células vegetais (TAIZ & ZEIGER, 1998; WANG et al., 2002). Foram identificados mutantes que não respondem a etileno exógeno (mutantes insensíveis ao etileno) e mutantes que permanentemente apresentam a resposta tripla mesmo na ausência de etileno (mutantes constitutivos).

Há grandes evidências de que ETR1 é o receptor do etileno (TAIZ & ZEIGER, 1998; WANG et al., 2002). O gene ETR1, que codifica o fator (proteína) ETR1, receptor do etileno, foi clonado e seqüenciado, mostrando haver similaridade ao receptor bacteriano de dois componentes histidina quinases. A porção amino terminal de ETR1 contém três domínios que mostram ser o sítio de ligação do etileno. ETR1 funciona com um dímero, consistindo de duas proteínas transmembranas unidas por pontes de dissulfeto, similares aos receptores químio-sensores bacterianos. Como ETR1 está presente como uma pequena família em *Arabidopsis*, deve haver múltiplos receptores para etileno em plantas.

O mutante *etr1* codifica uma proteína *etr1* incapaz de iniciar o processo de sinalização. O mutante *ein* (insensível ao etileno) também bloqueia a resposta ao etileno, mas bem mais adiante, codificando uma proteína incapaz de agir como canal ou poro ou mesmo como fator de transcrição (TAIZ & ZEIGER, 1998; WANG et al., 2002).

Entre os mutantes constitutivos, *ctr1* (tripla resposta constitutiva 1 = tripla resposta na ausência de etileno) resulta na ativação constitutiva da resposta ao etileno. Isto sugere que a proteína do tipo-selvagem age como regulador negativo da rota de resposta (KIEBER ET AL 1993; WANG et al., 2002). CTR1 mostra similaridade à família Raf de proteínas quinases serina/treonina. Raf é parte de uma cascata de proteínas quinases envolvidas na transdução de vários sinais externos regulatórios e desenvolvimento de rotas de sinais, desde leveduras a humanos.

A ordem de ação dos genes ETR1, EIN2, EIN3 E CTR1 tem sido demonstrada por análises das relações epistáticas entre as várias mutações, ou seja, como as mutações interagem uma com as outras (KIEBER et al., 1993). O etileno se liga ao receptor ETR1, que é uma proteína de membrana integral, resultando na inativação do regulador negativo CTR1. A inativação de CTR1 torna ativa a proteína transmembrana EIN2, que pode agir como poro ou canal. A seguir, um alvo *downstream* é EIN3, que age como fator de transcrição na regulação de expressão gênica (AVERY & WASSERMAN, 1992; WANG et al., 2002).

O modelo está ainda incompleto, mas já permite, pela primeira vez, começar a desvendar a base molecular da percepção e transdução de sinais de fito-hormônios. Genes similares em *Arabidopsis* têm sido encontrados em outras plantas, inclusive mostrando alta similaridade ao ETR1. Estes e outros estudos têm mostrado que os componentes dessas proteínas relacionadas podem representar a descoberta de mediadores gerais na sinalização ao etileno em plantas (TAIZ & ZEIGER, 1998).

2.5.5. Ação do etileno na defesa das plantas contra pragas

Os sofisticados sistemas de detecção e defesa das plantas contra o ataque de pragas têm o etileno como um importante participante em diversas rotas de biossíntese de metabólitos secundários. Entretanto, dependendo do tipo de patógeno e espécies de plantas, as funções do etileno podem ser completamente diferentes. Plantas com deficiência na sinalização do etileno podem ter aumentada ou diminuída sua resistência (WANG et al., 2002). Mutantes de soja com reduzida sensibilidade ao etileno se mostram mais resistentes ao ataque de linhagens virulentas de *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* e *Phytophthora sojae*, ao mesmo tempo em que se apresentam bem mais suscetíveis à infecção por *Rhizoctonia solani* (HOFFMAN et al., 1999).

O etileno também está presente na regulação da morte celular programada (apoptose) em *Arabidopsis*, podendo tanto inibir o desenvolvimento dos sintomas necrotróficos causados pela infecção de um patógeno, quanto acelerar o processo, dependendo do agente invasor (THOMMA et al., 2000). Este tipo de defesa, também chamada de hipersensibilidade, é um dos mais importantes mecanismos das plantas para se protegerem do ataque de patógenos biotróficos (TAIZ & ZEIGER, 1998; ECKARDT et al., 2001; ZHANG & KLESSIG, 2001). O etileno parece participar tanto na regulação da resposta oxidativa, produzindo peróxido de hidrogênio, com papel central na morte celular, quanto posteriormente, na percepção do sinal proporcionado pelo próprio ferimento oriundo da reação de hipersensibilidade, contribuindo fundamentalmente para o desenvolvimento da resistência sistêmica (WANG et al., 2002). Entretanto, LAWTON et al. (1995), a partir de experimentos realizados em mutantes insensíveis ao etileno, sugeriram que este hormônio não é imprescindível para a ativação da SAR, já que tais linhagens de mutantes desenvolveram a reação sistêmica adquirida, pela ativação do acúmulo de ácido salicílico induzido por *P. syringae*. Por

outro lado, mesmo que haja consistência nesses dados, isto não significa que o etileno não tenha participação na SAR. As plantas devem contar com uma ampla e diversificada estratégia de defesa contra estresses bióticos e abióticos.

Plantas resistentes são aquelas que respondem mais rapidamente e mais vigorosamente ao ataque de pragas do que as suscetíveis. Numerosos genes de resistência (R-genes) têm sido identificados, que codificam receptores (proteínas) que reconhecem e se ligam a moléculas específicas, originadas dos patógenos, alertando a planta para a presença do mesmo. A molécula do patógeno reconhecida é chamada de elicitor (TAIZ & ZEIGER, 1998). Enzimas hidrolíticas, que pertencem a um grupo de proteínas estão relacionadas intimamente com a infecção do patógeno, conhecidas como proteínas PR (relacionadas à patogênese), produtos dos R-genes (WANG et al., 2002).

Assim, o sucesso da resistência requer o elicitor, um produto do gene *avr* (avirulência) do patógeno, para ser rapidamente reconhecido por um receptor do hospedeiro, o produto do gene R (TAIZ & ZEIGER, 1998). A interação *avr/R* é chamada de resistência gene-a-gene, que inclui também a resposta de hipersensibilidade (WANG et al., 2002), um mecanismo de defesa extremamente eficiente, como tem sido demonstrado em tomate, tabaco e outras plantas. Em tomateiro (GU et al., 2000), o fator de transcrição *Pti4* (do gene R) revelou grande similaridade com a seqüência de aminoácidos de proteínas ligantes de elementos de resposta ao etileno (EREBPs), sendo capaz de especificamente se ligar ao elemento *cis* GCC-box, presente no promotor de muitos genes relacionados a patógenos regulados por etileno (PR). A expressão do gene *Pti4* em folhas de tomate é rapidamente induzida por etileno, e esta indução precede a ativação das seqüências GCC box dos genes PR. Tais resultados demonstram que a resposta ao etileno está ligada à resistência gene-a-gene em tomateiro.

Paralelamente à resistência sistêmica adquirida, uma outra forma de resistência, com interferência do etileno, é a resistência sistêmica induzida (PIETERSE et al., 1998). Como o etileno pode ativar a resistência sistêmica induzida (ISR) em mutantes *jar1*, provavelmente os componentes da resposta ao etileno atuam downstream do ácido jasmônico (JA) na sinalização de ISR. Resistência sistêmica adquirida (SAR) e ISR podem ainda ser ativadas ao mesmo tempo, resultando num melhor nível de proteção ao patógeno, como foi constatado para *Pseudomonas syringae* (Van WEES et al., 2000). Em *Arabidopsis*, mutantes insensíveis ao etileno foram mais suscetíveis a *P. syringae* (TON et al., 2001). O locus *isr1* (não desenvolve ISR) co-segrega com o mutante insensível ao etileno, sugerindo que o locus ISR1 está envolvido na resposta ao etileno. Resultados inversos foram obtidos por LAWTON et al. (1995), quando mutantes insensíveis ao etileno desenvolveram a SAR, pelo acúmulo de SA, quando infectados por *P. syringae*. Os autores concluíram que o etileno não é requerido para o desenvolvimento da SAR. Entretanto, isto não deve significar que o etileno não tenha participação no evento.

O estabelecimento da resistência adquirida a patógenos pode ser induzido por alterações fisiológicas ou próprias do desenvolvimento durante o ciclo das plantas (KUS et al., 2002; HUGOT et al., 2004). A ocorrência de transição da suscetibilidade para a resistência a patógenos, durante o desenvolvimento, é um fenômeno que tem sido relatado em diversos estudos em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Este fenômeno é conhecido como resistência relacionada à idade (ARR) e parece ser coordenado pela expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na defesa e nas modificações da parede celular durante o desenvolvimento, sem estímulo patogênico. Tais estudos em fisiopatologia revelam que as proteínas de defesa podem estar envolvidas não somente na ação antimicrobiana, como também na fisiologia e no desenvolvimento das plantas.

O etileno, com papel central na fisiologia e no desenvolvimento vegetal, poderia ser também referência principal na resistência relacionada à idade (ARR).

Quando uma planta resistente (gene R) é infectada por um patógeno tem início uma série de mecanismos bioquímicos e estruturais de defesa, incluindo a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR), maior rigidez da parede celular, apoptose (hipersensibilidade) e resistência sistêmica adquirida (DANGL & JONES, 2000). Da mesma forma que nas plantas resistentes, as suscetíveis, mesmo não possuindo o gene R, também apresentam aumentos nos níveis de ácido salicílico, ácido jasmônico, auxina e etileno (O'DONNELL et al. 2001; O'DONNELL et al. 2003). Plantas de *Arabidopsis* suscetíveis a *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* e *Peronospora parasitica* apresentaram evidências de que têm seu desenvolvimento reprodutivo acelerado e sua arquitetura alterada, em resposta ao ataque de patógenos (KORVES & BERGELSON, 2003). Entretanto, há evidências de que tais modificações se constituem numa resposta geral das plantas ao ataque de patógenos, podendo ocorrer também em plantas tolerantes e resistentes, cujo grau pode ser maior ou menor, dependendo da intensidade da infecção. As plantas, em geral, reduzem o ciclo em resposta a estresses ambientais como sombreamento, alta densidade, deficiência de nutrientes, seca, excesso de calor e outros (LEVY & DEAN, 1998). Devido à similaridade entre respostas a infecções por patógenos e estresses ambientais, é bem possível que as plantas acelerem a reprodução em resposta a estresses bióticos, embora o assunto não tenha sido ainda explorado (KORVES & BERGELSON, 2003).

Mais uma vez aparece indícios da participação do etileno como papel central no desenvolvimento das plantas, tanto pela sua síntese em função de estresses ambientais, quanto pela produção em resposta ao ataque de patógenos. Se os autores acima consideram que o assunto ainda precisa

ser explorado, não resta dúvida que plantas atacadas por patógenos e pragas em geral encurtam o ciclo, antecipando a reprodução, como comumente é observado em lavouras e experimentos, mesmo que não tenham sido executados para este fim.

A aplicação exógena de etileno também tem sido estudada, visando demonstrar a participação deste fito-hormônio na sinalização da resposta das plantas às infecções por patógenos. Plantas de tomateiro, pré-tratadas com etileno, foram mais resistentes a *Botrytis cinerea*, enquanto plantas que receberam pré-tratamento com 1-metilciclopropano (MCP), um inibidor da percepção a etileno, se mostraram significativamente mais suscetíveis (DÍAZ et al., 2002). O tratamento com etileno induziu a expressão de diversos genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR), antes da infecção de *B. cinerea*, confirmando a importância da resposta ao etileno na resistência do tomateiro ao patógeno. A aplicação exógena de etileno têm sido estudada por diversos autores, mostrando que pode haver tanto indução de resistência, como de suscetibilidade, bem como não haver efeitos, em função da interação planta-patógeno avaliada.

A expressão de LeMPK3, em tomateiro, uma quinase central nas diferentes rotas de transdução de sinais induzidos pela resposta a estresses bióticos, não foi afetada pela aplicação exógena de etileno e ácido jasmônico (MAYROSE et al., 2004). Os dados sugerem que o etileno age downstream de LeMPK3, durante a resposta de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, já que, de uma maneira geral, a acumulação deste fito-hormônio durante a ativação de cascata de quinases, tem sido relatada em diversos trabalhos.

Por outro lado, a aplicação exógena de WAF-1 natural e sintético, recentemente identificado como sinal endógeno responsável pela ativação de WIPK em tabaco (SEO et al., 2003), promoveu acumulação do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACCO), envolvido na

síntese do etileno, induzido na resposta de hipersensibilidade ao TMV e por ferimento.

2.5.6. Interações de respostas de fito-hormônios

Além da ação independente do etileno, provavelmente, na maioria das vezes, outros fito-hormônios interagem, principalmente o ácido salicílico e o ácido jasmônico, aumentando a complexidade do processo, de forma coordenada, ligando e desligando genes, na luta das plantas por um estado mais otimizado nas relações com o ambiente.

A ativação da resposta oxidativa, com formação de peróxido de hidrogênio e aceleração da apoptose de células em torno da área da infecção, com conseqüente inativação do patógeno biotrófico, resulta em algo similar a um ferimento, que por sua vez pode ativar outro processo de resposta, envolvendo, em ambos os casos o etileno e outros fito-hormônios. Assim, a ativação da hipersensibilidade pode gerar, como conseqüência, a resposta conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), protegendo as plantas contra futuras infecções (WANG et al., 2002). Em muitos casos, a SAR é caracterizada por um aumento endógeno dos níveis de ácido salicílico e a expressão dos genes PR (TAIZ & ZEIGER, 1998). Entretanto, alguns patógenos podem ativar rotas de transdução de sinal para o etileno e ácido jasmônico, o que tem sido evidenciado em *Arabidopsis*, em experimentos com mutantes defectivos para a percepção destes fito-hormônios, que resultam mais suscetíveis a certos patógenos (PENNINCKX et al., 1998). Em alguns casos a indução requer ambos fito-hormônios e noutros casos a indução da resposta se dá de forma específica para etileno ou ácido jasmônico. Isto demonstra que as rotas do etileno e do ácido jasmônico podem ter diferentes funções na resistência a moléstias (BRADER et al., 2001).

Rotas dependentes de ácido jasmônico/etileno e dependentes de ácido salicílico induzem a expressão de diferentes grupos de genes PR em *Arabidopsis*, resultando na resistência a diversos patógenos e sugerindo a existência de interações entre essas duas rotas na resistência sistêmica adquirida (WANG et al., 2001), bem como o funcionamento de uma maquinaria de regulação e coordenação da defesa das plantas em função desses fito-hormônios. Estudos também indicam que o ácido salicílico tem efeito inibidor na síntese ou sinalização do ácido jasmônico e etileno. Ao mesmo tempo, a rota de ácido jasmônico/etileno pode reprimir a expressão de genes ativados por ácido salicílico, inibindo a acumulação do SA (PETERSEN et al., 2000). Deficiência de ascorbato, cofator da ACC oxidase restringe a produção de etileno (LIU et al., 1999), mas estimula a produção de ácido salicílico (BARTH et al., 2004), ou ácido abscísico (PASTORI et al., 2003), ativando genes de defesa induzidos por estes fito-hormônios, demonstrando que tais antagonismos fazem parte da estratégia das plantas na proteção contra estresses.

Rotas de etileno e ácido jasmônico interagem, mediando a produção de uma fitoalexina, a β -tujaplicim, em cultura de células de *Cupressus lusitanica* (ZHAO et al., 2004). Uma levedura comercial elicitora (YE) foi utilizada no experimento e metil jasmonato e etileno induziram a produção de β -tujaplicim. O elicitor foi ainda capaz de induzir a acumulação de JA e ET, antes mesmo da indução do acúmulo da fitoalexina, demonstrando que estes fito-hormônios são partes integrais na transdução de sinal do elicitor, na indução de metabólito de defesa β -tujaplicim. Tratamento com metil jasmonato induz a produção de etileno, enquanto que este não interfere na biossíntese daquele. A acumulação de fitoalexina por metil jasmonato pode ser parcialmente bloqueada por inibidores da biossíntese de etileno e sinalização, enquanto que bloqueadores da síntese de metil-jasmonato inibem quase todo o processo de acumulação de β -tujaplicim induzido por etileno. Tais resultados indicam que as rotas de ET e JA interagem mediando a produção de fitoalexina, com a rota do ácido

jasmonico sendo o principal controle e a rota do etileno funcionando como um modulador fino do composto de defesa.

As rotas de Etileno e jasmonato convergem na ativação da transcrição do fator1 de resposta ao etileno (ERF1) em *Arabidopsis*, que codifica a proteína fator de transcrição, que regula a expressão de genes de resposta a patógenos, que previnem a progressão da moléstia (ELLIS & TURNER, 2001; OÑATE-SÁNCHEZ & SINGH, 2002; LORENZO et al., 2003). A expressão de ERF1 pode ser ativada rapidamente tanto por ET, quanto por JA, ou de forma sinérgica por ambos. Provavelmente ERF1 age *downstream* da intersecção entre as rotas de etileno e ácido jasmônico, sugerindo que este fator de transcrição é um elemento chave na integração dos dois sinais na regulação de genes de resposta a ataque de patógenos e herbívoros. O ácido salicílico mostrou antagonismo para alguns desses genes, relativamente as ET e JA, pela ação de alguns genes ERF *upstream* da acumulação e SA (OÑATE-SÁNCHEZ & SINGH, 2002). Em tomateiro ácido salicílico e etileno podem atuar sinérgicamente na expressão de genes de defesa, mas antagonicamente na resistência (DÍAZ et al., 2002).

Um outro fator de transcrição foi recentemente identificado em *Arabidopsis* (WRKY70) como um componente comum em rotas de sinais mediadas por SA e JA (LI et al., 2004). A expressão de WRKY70 é ativada por SA e reprimida por JA. Análises de epistasia sugerem que este fator de transcrição está *downstream* do gene NPR1 numa rota de sinal dependente de SA. A superexpressão constitutiva de WRKY70 aumentou a resistência a patógenos e resultou na expressão constitutiva de genes relacionados à patogênese induzidos por SA. Contrariamente, a supressão de WRKY70, por ativação da seqüência anti-senso, ativa os genes dependentes do fator COI1, responsivo a jasmonato, sugerindo que o fator WRKY70 age como um ativador de genes induzidos por SA e como um repressor de genes responsivos a JA. Um ácido graxo de plastídio, identificado em *Arabidopsis* (S-ACP-DES), requerido para certas

respostas mediadas por JA, como na resistência ao patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*, atua na repressão à rota de sinalização do SA e é mais um exemplo de antagonismo entre SA e JA, e provavelmente etileno (KACHROO et al., 2003; NANDIA et al., 2003). *Botrytis cinerea* induz a expressão do gene BOS1, que por sua vez provavelmente interage com o gene COI1 da rota de sinal do jasmonato. BOS1 codifica o fator de transcrição R2R3MYB, possivelmente mediando sinais de agentes de estresses bióticos e abióticos (MENGISTE et al., 2003).

Inúmeros exemplos estão disponíveis na literatura sobre o antagonismo entre rotas dependentes do etileno/jasmonato e do ácido salicílico. Entretanto, existe um número significativo de estudos que têm mostrado que as rotas desses hormônios podem agir cooperativamente em algumas respostas de defesa das plantas. Em tomateiro, uma linhagem transgênica com baixa produção de etileno e um mutante insensível ao etileno apresentam igualmente baixa acumulação de ácido salicílico (O'DONNELL et al., 2001). Em *Arabidopsis* as rotas de transdução de sinais do etileno e do ácido salicílico interagem na resposta contra *Plectosphaerella cucumerina* (BERROCAL-LOBO et al., 2002). Em tomateiro, três proteínas (Pti4, Pti5 e Pti6) identificadas e pertencentes à família ERF (fator de resposta ao etileno), de transcrição única, atuam *in vivo* como ativadoras da transcrição que regula a expressão de genes PR, junto à GCC-box. A expressão dessas proteínas em *Arabidopsis* ativou a expressão dos genes PR1 e PR2, regulados pelo ácido salicílico. A expressão dos genes PR regulados por etileno e ácido jasmônico (PDF1.2, Thi2.1, PR3 e PR4) foram afetadas diferentemente por cada um desses três ERFs, com plantas Pti4 apresentando altos níveis de transcritos de PDF1.2. Aplicações exógenas de ácido salicílico em plantas Pti4 diminuíram a expressão de PDF1.2, mas estimularam a expressão de PR1, mostrando o quanto são complexas essas interações.

Visando avaliar possíveis efeitos de WAF-1 exógeno (um diterpeno ativador endógeno de WIPK em tabaco) na presença de transcritos de

genes PR (genes PR-1, PR-2 e PI-II), SEO et al., (2003) demonstraram a ocorrência de acúmulo de ACCO e conseqüente acumulação de etileno, mostrando o envolvimento deste fito-hormônio na expressão dos referidos genes. Entretanto, as quantidades de ácido jasmônico em folhas tratadas ou não com WAF-1 não diferiram significativamente. Mesmo para o ácido salicílico, conhecido como ativador na indução de resistência em tabaco, não houve alteração nos níveis basais em folhas tratadas com WAF-1.

De uma maneira geral, com base nos resultados obtidos por diversos autores, pode-se inferir que etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico podem interagir negativamente ou positivamente, dependendo do tipo de patógeno ou da resposta específica de defesa (WANG et al., 2002). Ou mesmo independentemente (SEO et al. 2003), em função dos genes R ativados. O desafio será a caracterização de como é determinada a interação positiva ou negativa sob diferentes condições para o etileno e outras rotas de sinalização, especialmente do ácido jasmônico e ácido salicílico, em infecções patogênicas e estresses ambientais (WANG et al., 2002).

Entretanto, outros fito-hormônios, apesar de pouco estudados ainda, em relação às respostas das plantas a ferimentos e ao ataque de patógenos, devem interagir com o etileno, JA e SA, interferindo diferencialmente na indução da sinalização e no acúmulo de metabólitos secundários de defesa.

A auxina tem a habilidade de promover a síntese de etileno, aumentando a conversão de AdoMet (SAM) a ACC. Assim, certas respostas antes atribuídas à auxina podem ser devidas ao etileno, em resposta à auxina. Inibidores da síntese de proteínas bloqueiam a síntese de ACC e a síntese de etileno induzida por auxina, demonstrando a importância da auxina na síntese de etileno. A aplicação de AIA exógeno aumenta os níveis de mRNA que codifica para ACC sintase (TAIZ & ZEIGER, 1998). Em tomateiro há ao menos 9 genes para ACC sintase induzidos por auxina ou ferimento.

Plantas de *Galium aparine*, tratadas com ácido indolacético, mostraram aumentos nos níveis de etileno, ACC e ácido abscísico (HANSEN & GROSSMANN, 2000). Inibidores da síntese de etileno determinaram decréscimo na acumulação de ácido abscísico (ABA) e a aplicação de etileno exógeno promoveu a síntese de ABA. Apesar deste estudo não envolver respostas a estresses, tais interações devem ser importantes durante a indução da resistência.

Futuros estudos para caracterizar melhor e mais detalhadamente as interações entre etileno e outras rotas de resposta na defesa das plantas, podem ser muito úteis para a compreensão da complexidade das interações das plantas com o ambiente (WANG et al., 2002). O desafio imediato será a caracterização do que faz uma interação ser positiva ou negativa sob diferentes condições para o etileno e outras rotas de sinais, especialmente JA e SA, em resposta ao ataque de pragas e sob estresse ambiental.

2.6. Genes de resistência e de mecanismos de defesa das plantas: perspectivas com o advento da engenharia genética

Já há vários anos existe um consenso entre os melhoristas de que a variabilidade genética dentro da espécie não é mais suficiente para proporcionar ganhos genéticos significativos, relativamente aos caracteres mais importantes. BRASILEIRO & CARNEIRO (1998) preferem definir esta condição como redução do *pool* gênico para grande parte das espécies vegetais domesticadas.

Dentre os caracteres mais importantes, a resistência genética a pragas (ervas daninhas, insetos, ácaros, nematóides, fungos, bactérias e vírus, principalmente) têm uma importância fundamental, já que os agrotóxicos têm sido considerados como grandes vilões da contaminação ambiental,

apesar do surgimento nos últimos anos de moléculas menos tóxicas e menos agressivas ao ambiente.

O problema crucial resulta de que a velocidade de elaboração de moléculas eficientes tem sido menor do que a velocidade com que as pragas têm se adaptado, através do desenvolvimento da resistência genética aos produtos químicos (VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2000). Paralelamente, o esgotamento das fontes de resistência tem agravado o problema. A resistência genética, em maior ou menor grau, é fator de complementação no manejo integrado de pragas (SACHS et al., 1996) e sem ela as dificuldades em diminuir a quantidade de agrotóxico nas culturas são maiores.

O maior obstáculo que o melhoramento genético tem enfrentado tem sido relativamente ao caráter resistência a insetos, pela falta de fontes dentro da espécie. Para agravar ainda mais a situação, além do esgotamento do potencial do melhoramento genético convencional (via reprodução sexual), está havendo um decréscimo na concretização de objetivos, de tal forma que as dificuldades em selecionar plantas resistentes a insetos-praga são somadas à resistência cada vez maior destas aos agrotóxicos (TABASHNIK, 1997).

Não resta dúvida de que o grande desafio atual do melhoramento genético e da engenharia genética está no desenvolvimento de plantas resistentes a fitófagos (insetos, ácaros, nematóides) e moléstias (fungos, bactérias, vírus), principalmente em relação às primeiras, já que principalmente os insetos têm causado os maiores prejuízos (ALLARD, 1960; DAHMS, 1967; ELLIOT, 1967; BREWBACKER, 1969) e os inseticidas são normalmente os mais tóxicos aos seres vivos e mais agressivos ao ambiente, dentre os defensivos agrícolas.

Por outro lado, praticamente inexitem fontes de resistência a bactérias e vírus dentro da espécie (e muitas vezes nem fora da espécie), cada vez mais ganhando em importância como fatores limitantes do rendimento em diversas culturas. Nesses casos a solução via engenharia genética é o

único caminho, já que nem mesmo existem produtos químicos eficientes, principalmente para o controle de vírus. Na maioria das vezes a estratégia vai bem além da simples transferência de genes. Se nesses casos a construção da resistência é bem mais difícil, a inexistência de soluções via aplicação de defensivos agrícolas significa também que o ambiente não está sendo ameaçado pelos agrotóxicos. Assim, estes aspectos não serão tratados aqui, dando-se preferência a situações onde haja potencial de substituição ou diminuição do uso de agrotóxicos, principalmente inseticidas, fungicidas e até mesmo herbicidas. Entretanto, não se pode perder de vista que o avanço das moléstias bacterianas e das viroses, ameaçando inclusive diversos cultivos, tornando-os inviáveis economicamente, pode significar o aumento da área cultivada com lavouras altamente poluidoras, se restar como opção principal o desenvolvimento de produtos químicos (agrotóxicos) para seu controle.

A biotecnologia, em especial a engenharia genética, constitui-se então em ferramenta básica, na transferência de genes de resistência genética de uma espécie vegetal para outra, ou mesmo de um microorganismo ou animal (BRASILEIRO & DUSI, 1999). Além dos já conhecidos genes de resistência a insetos utilizados atualmente, ganham importância estudos de plantas com características inseticidas ou insetistáticas (VENDRAMIN & CASTIGLIONI, 2000), repelentes e mesmo atraentes, que podem significar novos genes a serem utilizados no melhoramento genético para resistência. Uma vez transferido para uma espécie, um gene pode ser trabalhado como fonte de resistência comum, podendo, muitas vezes, ser transferido a outras cultivares, via reprodução sexual, em programas convencionais de melhoramento genético.

2.6.1. O melhoramento genético à luz dos novos conhecimentos

Apesar do melhoramento genético para resistência a insetos, via reprodução sexual, ser relativamente recente, chega a ser surpreendente

que na literatura já se comente há algum tempo sobre o esgotamento da variabilidade genética. Provavelmente isto se explique pela assertiva de ELLIOT (1967), que credita pouca importância à influência do homem na distribuição das plantas e pela própria seleção natural que, independentemente do homem, tem utilizado a variabilidade genética nas interações entre hospedeiro e consumidor, restando pouco a fazer pelos geneticistas, em termos de transferência de resistência dentro da espécie. Certamente que o mesmo se poderia afirmar em se tratando da resistência a fungos, bactérias e vírus.

O esgotamento da variabilidade genética ou até mesmo as dificuldades de encontrar fontes de resistência a insetos já vem de longe (DAHMS, 1967), o que, somado a que os insetos têm provocado as maiores perdas nas culturas, não surpreende o grande avanço na indústria de produtos químicos destinado ao controle dos mesmos. A ciência tem respondido então com uma série de alternativas, que vão desde a busca de fontes de resistência, seja oligogênica, poligênica ou mesmo pela criação de variabilidade genética através dos mais variados métodos (FRANKEL, 1977), inclusive por indução de mutações. Atualmente a resposta por parte da ciência vem, particularmente, através da engenharia genética.

A resistência transferida de uma espécie para outra, via engenharia genética, dificulta mais a adaptação da praga à planta, mas não por muito tempo (TABASHNIK, 1997). Portanto, a busca constante por fontes de resistência continuará sendo uma necessidade do melhoramento genético, mas pelo menos toda a diversidade genética do planeta estará à disposição dos melhoristas.

Em todas as situações, seja visando a transferência de genes entre espécies (engenharia genética), ou vislumbrando a síntese de novas moléculas biocidas, tendo como objetivo básico o estudo de plantas alelopáticas, há a fundamental necessidade de se aprofundar o conhecimento das bases bioquímicas da resistência.

NORRIS & KOGAN (1984) já inferiam que as evidências experimentais sugerem a existência de algo como “mensageiros químicos”, que atuam, pelo menos como “agentes duplos”, isto é, atraem certas espécies e repelem outras. A hipótese da existência de um código submolecular sugere que na interação entre planta e praga, entre si e o próprio ambiente, trás como resultante uma relação de aceitação (caimônica) ou de repulsão (alomônica). Assim, a transferência interespecífica de genes tende a resolver com maior eficiência os problemas de resistência a insetos, pela maior estabilidade da defesa química proveniente da engenharia genética.

As plantas “sabem” diferenciar um ferimento mecânico de um ferimento causado por um inseto. Mais ainda, conseguem identificar o próprio inseto consumidor e outros, respondendo diferentemente em função das secreções orais e dos componentes da regurgitação, altamente específicos (MAFFEI et al., 2004).

Quando uma planta resistente (gene R) é infectada por um patógeno tem início uma série de mecanismos de defesa bioquímicos e estruturais, incluindo a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR), maior rigidez da parede celular, apoptose (hipersensibilidade) e resistência sistêmica adquirida (DANGL & JONES, 2001). Da mesma forma que nas plantas resistentes, as suscetíveis, mesmo não possuindo o gene R, também apresentam aumentos nos níveis de ácido salicílico, ácido jasmônico, auxina e etileno (O'DONNELL et al. 2001; O'DONNELL et al. 2003), porém não suficientemente para caracterizar a resistência.

Em resposta ao ataque de patógenos e a ferimentos causados por herbívoros, as plantas respondem através da produção de metabólitos, que induzem à expressão de diversos genes que codificam compostos de defesa como as proteínas relacionadas à patogênese (PR), envolvidas na resistência a moléstias e cicatrização de ferimentos (CUI et al., 2002; SEO et al., 2003; ; YOSHIOKA et al., 2003). Assim, como reação a estresses

bióticos e abióticos, as plantas respondem produzindo metabólitos secundários com potencial inseticida, nematicida, fungicida, bactericida e outros, inclusive relacionados à fisiologia da própria planta, como fitohormônios que interferem no seu crescimento e desenvolvimento (KUS et al., 2002). A amplitude dessas respostas ao ataque de pragas em geral é muito grande, envolvendo interações relativamente conhecidas como as gene-específicas e outros processos múltiplos relativamente menos específicos (DANGL & JONES, 2001).

O desenvolvimento de plantas que expressam a resistência sistêmica adquirida (SAR) constitutivamente já é plenamente viável, com os avanços no conhecimento de seus mecanismos (SUSUKI et al., 2004). Por exemplo, dois genes bacterianos que convertem corismato em ácido salicílico foram transferidos para os cloroplastos de tabaco, promovendo um aumento no acúmulo de ácido salicílico de 500 a 1000 vezes em comparação com o controle (VERBENE et al., 2000), conferindo resistência a diversas infecções virais e fúngicas.

Observa-se, portanto, que tanto os compostos derivados das plantas, produzidos constitutivamente, quanto os ativados pela expressão de genes induzidos por estresses bióticos e abióticos, são importantes para a identificação de novas moléculas citotóxicas e genes a elas relacionados. Tanto é possível objetivar a inserção de um gene de expressão constitutiva numa espécie vegetal de interesse econômico, quanto de expressão ativada, bem como ainda transferir genes de ação indireta (constitutiva ou não) que venham a interferir na regulação de outros genes de defesa. Desta forma, além da imensa relação de plantas promissoras, como fontes de genes de resistência a pragas (ervas daninhas, insetos, ácaros, nematóides, fungos, bactérias, vírus e outras), há ainda aquelas espécies (onde se incluem as plantas domesticadas) que só produzem metabólitos de defesa imediatamente após a ocorrência do estresse. Em biotestes com extratos vegetais, portanto, deve-se levar em conta estas condições, procurando trabalhar em separado com

plantas intactas, plantas atacadas e com simulação de ataque, mesmo que, via de regra, as plantas tenham a capacidade de diferenciar ferimentos mecânicos de lesões causadas por organismos vivos (MAFFEI et al., 2004).

Entretanto, é preciso levar em consideração que os resultados finais vão depender das complexas interações entre fito-hormônios, principalmente etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, especialmente no caso da resistência ativada somente após o ataque do patógeno ou do inseto, por exemplo. Dependendo da praga, bem como do genótipo da planta e das relações epistáticas entre os genes envolvidos na resistência, pode haver sinergismo ou antagonismo nas respostas aos agentes bióticos invasores.

2.6.2. Genes relacionados aos mecanismos de defesa das plantas

Toda planta verde possui certa resistência contra alguns herbívoros e esta resistência, em seu sentido amplo, vai desde os mecanismos de escape temporal, resultantes de assincronismos fenológicos, até à biossíntese de moléculas complexas laterais, os chamados metabólitos secundários (NORRIS & KOGON, 1984). Esta resistência deve ser bastante comum na natureza (BREWBACKER, 1969), pois a maioria dos insetos morre se tiver que ficar sobre plantas que não sejam específicas de determinados grupos. Como as plantas não podem se mover para evitar o perigo, desenvolveram mecanismos especiais de defesa, dentre eles, a produção de aleloquímicos, provavelmente a mais importante estratégia de defesa das plantas (KINGSTON et al., 2000; WEDGE & CAMPER, 2000).

Insetos usam enzimas proteolíticas ou hidrolíticas na digestão dos alimentos. Assim, inibidores de α -amilase e proteinases derivados de plantas têm interesse particular porque tais bloqueadores são parte do

sistema de defesa natural contra insetos (XU et al., 1996). Em adição, a maioria dos inibidores de enzimas digestivas de insetos parece ser bastante segura aos mamíferos, inclusive ao homem, pois são altamente dependentes de pH. Como o pH ótimo das enzimas do aparelho digestivo dos insetos pode variar amplamente de espécie para espécie, algo como entre pH 3 a pH 12 (REECK et al., 1999), os inibidores podem ser relativamente específicos. Entretanto, dada esta amplitude de variação existente, os inibidores de enzimas digestivas devem ser estudados caso a caso.

É bastante conhecido em *Vigna ulguiculata* (feijão-caupi) o gene que codifica um inibidor da tripsina, que confere resistência a insetos. XU et al. (1996) testaram extratos contendo proteína de plantas de arroz transgênico (com o gene CpTi de resistência do caupi) contra a tripsina bovina, observando forte inibição da mesma. *In vivo*, houve um aumento significativo na resistência a duas espécies de brocas do colmo do arroz.

A eficiência do inibidor (composto fenólico) da tripsina, originado do feijão caupi, foi também estudada por GRAHAM et al. (1995) a partir de linhagens transgênicas de moranguinho. Extratos de plantas geneticamente modificadas chegaram a provocar 92% de inibição da enzima. De acordo com Hilder et al. (1987), citados pelos autores acima, este inibidor mostrou ser muito eficiente contra *Heliothis*, *Spodoptera*, *Diabrotica* e *Tribolium*, quando este composto fenólico foi incorporado na dieta destes insetos.

STOEWSAND et al. (1994) avaliaram em ratos o efeito de um inibidor natural da colinesterase, encontrado em clones de macieira resistentes (*Malus brevipes*) a larvas de *Rhagoletis pomonella*. Houve um efeito significativo *in vitro* (testes em amostras de sangue), na inibição da colinesterase dos roedores; entretanto, a atividade da enzima foi a mesma para todos os tratamentos, no experimento *in vivo* (animais alimentados com ração com e sem casca de maçã), denotando, como era esperado, que o inibidor natural é degradado na digestão dos mamíferos. O inibidor

tem efeito diretamente no sangue, demonstrando sua atividade sobre a acetilcolinesterase, mas quando consumido na alimentação é completamente inócuo e, portanto, seguro para a alimentação humana. Já os insetos não conseguem degradar o bloqueador durante a digestão, ou pelos menos têm mais dificuldades.

Sementes maduras de *Psophocarpus tetragonolobus* (feijão-de-corda, consumido há séculos por milhões de pessoas) são tóxicas às larvas e adultos de insetos da família Bruchidae. GATEHOUSE et al., 1991 testaram o efeito das diversas frações da proteína dessa planta sobre *Callasobruchus maculatus*, detectando lectinas e inibidores de tripsina (WBTI) no grão maduro, de alto poder inseticida contra essa praga de grãos armazenados.

DOWD (1994) estudou variedades de milho resistentes a lagartas e ao fungo *Fusarium monilliforme*, que correspondiam ao material com mais altos teores de ácidos fenólicos e com mais alta atividade da peroxidase. Como adicional vantagem, observou que plantas resistentes a insetos e fungos, contêm altas concentrações de ácido ferrúlico, conhecido inibidor de aflotoxina, produzido pelo *Aspergillus flavus* Link. Outro aspecto interessante é que foi constatado nos Estados Unidos que o milho Bt apresentou uma quantidade de aflotoxinas sete vezes menor que o chamado produto orgânico (USDA, 2000). Tem sido muito comum na literatura mundial se encontrar este tipo de abrangência de substâncias bioativas de uma planta, capazes de atuar, por exemplo, como inseticida e fungicida, ao mesmo tempo. O ácido salicílico, por exemplo, é citado como fazendo parte do mecanismo de resposta do patógeno e resistência da planta, sensibilizando células de plantas para elicitores de fungos, dando o sinal na indução da resistência sistêmica adquirida (WEDGE & CAMPER, 2000). Por outro lado o ácido salicílico, componente de algumas espécies do gênero *Salix* (JULKUNEN-TIITTO et al., 1993), tem comprovado efeito inseticida.

Antibióticos, herbicidas, fungicidas e inseticidas freqüentemente se originam de mecanismos de defesa de microorganismos e plantas. Metabólitos secundários, que já foram considerados sem importância, só vistos agora como mediadores no mecanismo de defesa das plantas, comportam-se como barreiras químicas contra microorganismos e animais predadores (WEDGE & CAMPER, 2000). Não deverá ser surpresa se, comprovadamente, a múltipla função de metabólitos for comum entre as plantas, como forma de economia de energia e pela complexidade de diversas moléculas bioativas.

Produtos naturais fornecem drogas que podem ser inacessíveis por outras rotas e o processo de descoberta de compostos de plantas envolve muitas etapas, desde a coleção de plantas e preparação dos extratos para os bioensaios com extratos, até o isolamento e elucidação estrutural dos constituintes bioativos (KINGSTON et al., 2000).

Quando se usam extratos vegetais com atividade inseticida, diversos são os efeitos nos insetos: inibição na alimentação, crescimento e oviposição; alterações na morfologia, no sistema hormonal e comportamento sexual; no aumento da mortalidade em estádios iniciais do desenvolvimento ou mesmo no adulto e tantos outros (KOUL et al. 1990; RODRIGUES, 1996; HARTMANN et al., 1997; PRATES & SANTOS, 2000). Na verdade são os mesmos sintomas provocados no inseto-praga, pela planta resistente, quando eventualmente atacada (AUSEMUS et al. 1967; BREWBAKER, 1969; NORRIS & KOGAN, 1984; DOWD, 1994; STOEWSAND et al., 1994; XU et al., 1996). Para fungos, igualmente, os extratos de plantas, com potencial citotóxico, podem inibir a germinação de esporos e mesmo o crescimento dos micélios (RIBEIRO, 1998)

Portanto, quando um extrato vegetal tem algum efeito deletério sobre algum inseto ou fungo é porque há um ou mais metabólitos secundários com este poder. Ao mesmo tempo há um ou mais genes envolvidos no processo de defesa ou de resistência da planta que deu origem ao extrato

vegetal. Pode-se dizer, portanto, que existe uma importante conexão entre a pesquisa de novos produtos naturais de defesa das plantas contra pragas e a busca de genes de defesa ou de resistência às mesmas.

O trabalho da engenharia genética começa exatamente quando é alcançada a meta da busca por novas drogas. É quando se chega à elucidação estrutural dos constituintes bioativos (KINGSTON et al., 2000).

Por esta razão, é de grande utilidade à pesquisa na área de biotecnologia, as informações provenientes da prospecção de novas moléculas e da bioatividade das mesmas nos extratos vegetais, pois poderão significar novos genes a serem utilizados na criação de cultivares transgênicas.

2.6.3. Plantas com ação inseticida e fungicida: novos genes de resistência

O uso de “plantas inseticidas” (que tipicamente produzem substâncias inseticidas, de expressão constitutiva) e de plantas resistentes a pragas, tem uma base comum, que é o emprego de aleloquímicos presentes na planta, como proteção (VENDRAMIN & CASTIGLIONI 2000) e que são extremamente importantes no desenvolvimento de uma agricultura que tenha como prioridade a preservação e a recuperação ambiental.

A descoberta e o desenvolvimento de novos produtos derivados de metabólitos secundários, provenientes de vegetais, têm importância significativa, no sentido de se buscar produtos menos agressivos ao ambiente. Os produtos derivados de plantas, mais aceitos pelos consumidores, por terem menor impacto ambiental e por serem menos tóxicos aos mamíferos, têm sido investigados mais intensivamente pela indústria atual (WEDGE, & CAMPER, 2000).

As plantas têm sido a fonte mais comum de pesquisas na avaliação de produtos naturais e têm contribuído muito significativamente na produção

de produtos farmacêuticos modernos. Mesmo assim, a imensa maioria de aproximadamente 250 a 500 mil espécies de plantas superiores no mundo ainda não foi avaliada e o pouco que já foi testado (5 a 15%) se restringiu apenas a alguns restritos alvos terapêuticos (MILLER & GEREAU, 2000; ECHEVERRIGARAY et al., 2001).

Essas defesas naturais poderão ou não ser tóxicas em maior ou menor grau aos mamíferos e outros animais, dependendo da proteína inseticida e de sua presença ou concentração na parte comestível da planta (PUSZTAI et al., 1996). Já anteriormente (PUSZTAI et al., 1993) sugeriram que a presença de lectina para aumentar a resistência a insetos, em quantidades requeridas para ser eficiente contra os mesmos, não poderia ser considerada sem riscos para a saúde humana. A possibilidade que os avanços da engenharia genética apontam para a utilização dos mecanismos que determinam a expressão gênica tecido-específica poderá vir a ser uma forma de poder utilizar genes relacionados a substâncias de defesa que podem ser tóxicas aos mamíferos, por sua concentração na planta ou mesmo por sua natureza.

Muitas substâncias de plantas defensivas (denatonium benzoato, denatonium sacaride, L-fenilalanina, flavonóides, terpenos, taninos e outras) têm sabor amargo e podem ser tóxicas as seres humanos. Entretanto, para herbívoros (inclusive mamíferos) e igualmente para insetos, tal impalatabilidade e possível toxicidade para uns, podem não ocorrer para outros (NOLTE et al., 1994), o que torna tal estudo bastante importante, no sentido de avançar no entendimento dessas interações, antes de usar qualquer transferência genética, o que, de forma correta, tem sido feito atualmente, em relação à segurança alimentar. Ou seja: a transferência de resistência a uma praga, sem os devidos estudos, poderia significar também a transferência da suscetibilidade a outra praga, adaptada à espécie doadora do gene. Por outro lado, a produção do novo metabólito pode significar a ampliação da resistência, inclusive a microorganismos.

Salicortina, salicilina, (+)- catequina e proantocianidina são compostos fenólicos, com efeito inseticida, encontrados em *Salix myrsinifolia* (Salisb.) que foram estudados por JULKUNEN-TIITTO et al. (1993), os quais demonstraram que as variações ambientais interferem significativamente no conteúdo dos mesmos. Igualmente, JOHNSON et al. (2000) observaram grande variação no conteúdo de acetogeninas (inseticida e anti-tumoral) em *Asimina triloba* (L.) Dunal, conforme a estação do ano. Este tipo de resistência estaria então sujeito a uma certa instabilidade, o que fortalece ainda mais a idéia da necessidade de combinações piramidais, num manejo integrado de pragas. Diferentemente, (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1995) avaliaram a variação de terpenos em *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae), na defesa contra herbívoros, observando que as diferenças ambientais não possuem forte efeito sobre a herbivoria nessa espécie, mas que a variabilidade genética em composição química foi a estratégia mais importante na defesa contra herbívoros, reduzindo-lhes a sobrevivência e a eficiência.

Essa instabilidade devida às variações ambientais e a variabilidade genética da resistência determinam então o desenvolvimento de estratégias de manipulação genética, visando maior eficiência no controle de pragas e maior segurança aos consumidores e ao ambiente.

Quando uma planta é investigada, não é descartada a possibilidade de haver mais de um alvo terapêutico, tanto que na busca por agentes anti-tumorais tem-se descoberto novos antibióticos, fungicidas, bactericidas e até inseticidas.

Em trabalho cooperativo entre diversos países, no Suriname, KINGSTON et al.(2000), buscando agentes anticancerígenos, relatam as principais plantas, onde foram encontrados agentes tóxicos importantes e que podem ser potencialmente fungicidas e inseticidas:

Em *Renealmia alpinia*(rott) Maas (*Zingiberaceae*) foram isoladas três labdanoditerpenóides citotóxicos. Análises com *Eclipta Alba* (L.) Hassk detectaram diversos alcalóides com bioatividade, em bioensaios com

fungos. Em *Himatanthus fallax* (Muell.Arg.) Plumel e *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), os iridóides plumericina e isoplumericina mostraram potencial promissor. A espécie *Miconia lepidota* DC (Melastomataceae) caracterizou-se pela presença de alquil-benzoquinonas com alto potencial tóxico.

Atualmente, as espécies de plantas mais promissoras, que se tem estudado, encontram-se principalmente nas famílias Annonaceae, Aristolochiaceae, Asteraceae, Labiaceae e Meliaceae (SCHMUTTERER, 1990).

Na família Annonaceae, as centenas de compostos bioativos já identificados nos vários gêneros conhecidos, indicam que há um imenso potencial (LORENZI, 1998; JOHNSON et al., 2000), que pode ser explorado através da engenharia genética. Nesses gêneros mais promissores desta família, encontra-se no Brasil, principalmente, *Annona crassiflora* Mart., *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baill., *R. sericea* (R. E. Fries) R. E. Fries e *Xylopiá frutescens* Aubl. (LORENZI, H., 1998).

Entretanto, não pode ser ignorado que as acetogeninas, pelos mecanismos de ação conhecidos e pela sua natureza, podem ser tóxicas aos mamíferos, inclusive humanos. Tais compostos, contidos na graviola (*Annona muricata*), por exemplo, podem ser 10 mil vezes mais potentes que a adriamicina no combate a diversos cânceres (MOSS, 2003). Se as células cancerígenas são bem mais sensíveis que as normais, isto não significa que as últimas sejam completamente insensíveis. Diversos estudos realizados em populações que consomem plantas anonáceas (frutos e chás) com certa regularidade, relacionam este hábito com diversos males, inclusive com o parkinsonismo (CAPARROS-LEFEBVRE & ELBAZ, 1999; LITVAN et al, 1999).

Por essas razões é que a pesquisa tem tido muito cuidado na liberação de produtos, cujos mecanismos de ação sejam os mesmos nas pragas e em outros animais, inclusive o homem. Entretanto a variedade imensa de metabólitos secundários projeta a possibilidade de se descobrir novos

mecanismos de ação ou sítios-alvos diferentes, que tornem mais segura a utilização dessas novas moléculas praguicidas.

Dentre as plantas inseticidas, talvez não haja atualmente no mundo nenhuma mais conhecida e popular do que a *Azadiracta indica* (nim), cujo composto ativo, a azadiractina, parece controlar mais de 200 espécies de insetos e ainda atua como fungicida e nematicida (BURG & MAYER, 1998).

Muito conhecido no Brasil, o cinamomo (*Melia azedarach*), da mesma família do *nim*, também é conhecido há vários anos como planta inseticida (McMILLIAN et al., 1969; BURG & MAYER, 1998).

VENDRAMIM & SOUZA (2000) avaliaram extratos aquosos de três espécies de meliáceas (*Azadiracta indica*, *Melia azedarach* e *Trichilia pallida*), os quais foram eficientes contra a mosca branca do tomateiro (*Bemisia tabaci*). ROEL et al. (2000) também comprovaram a eficiência de extratos de *Trichilia pallida*, como inseticida, em relação à lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).

Os alcalóides da pirrolizidina têm função como compostos de defesa de plantas contra herbívoros, mas certas espécies de insetos adaptados requerem estes compostos para seu próprio crescimento e desenvolvimento (HARTMANN et al., 1997). Isto explicaria, pelo menos em parte, a maior ou menor especificidade das pragas e o conceito de que toda e qualquer planta é resistente, ou não teria sobrevivido; e abriria espaço para o conceito de que toda e qualquer planta é igualmente suscetível, já que não há uma só espécie que não tenha seu grupo de pragas.

É tão comum a presença de substâncias naturais defensivas da planta contra pragas em geral, que praticamente todos os vegetais comestíveis de cultivos comerciais estão incluídos numa longa listagem organizada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2000), tidos como “plantas tóxicas”, estas, definidas como espécies vegetais que já tenham sido relatadas na literatura científica mundial como causadoras

de algum mal à saúde humana. Apesar de adaptados, sempre tem havido uma certa porcentagem, maior ou menor, de seres humanos sensíveis (alérgicos) a alguns aleloquímicos existentes em qualquer espécie vegetal, mesmo nas plantas domesticadas. Estes compostos secundários podem ou não corresponder às moléculas de defesa das plantas contra pragas.

Por outro lado, essas descobertas têm encorajado muitos pesquisadores a aceitarem a idéia da maior relativa vantagem e segurança deste tipo de defesa seletiva da própria planta. A utilização da resistência genética de forma cruzada, ou seja, de uma cultura (espécie já domesticada) para outra, poderia aumentar a proteção dos cultivos, controlando um maior número de insetos, sem que houvesse problemas para a saúde humana, desde que sejam tomados os cuidados necessários. O organismo humano já está adaptado a tais toxinas ou mesmo estas substâncias já fazem parte de suas próprias necessidades. Isto também acontece com os insetos consumidores (HARTMANN et al., 1997). Há ainda a possibilidade de alterar minimamente, mas o suficiente, a proteína alergênica, eliminando o caráter tóxico e beneficiando aquele percentual sensível de seres humanos. Assim, além da possibilidade de substituição dos agrotóxicos convencionais pela resistência genética, com inestimáveis benefícios à saúde humana e ambiente, é possível não só evitar o acúmulo de produtos tóxicos na cadeia alimentar, como também eliminar os problemas de toxidez, comumente existentes nos alimentos, com adequados cuidados, que advirão com os avanços na pesquisa.

De acordo com SACHS et al. (1996), apesar de todos os avanços nos últimos anos ainda não é comum superar os métodos convencionais de controle de pragas através de agrotóxicos. O número de cultivares transgênicas resistentes é ainda relativamente muito pequeno e a ocorrência de mais de uma praga na mesma cultura obriga o produtor a utilizar, algumas vezes, agrotóxicos mesmo nelas. Entretanto a

combinação de várias alternativas parece ter um imenso potencial para, definitivamente, desbancar os métodos convencionais, já que é possível combinar fatores de caráter horizontal no controle de pragas que, em se complementando, tornar-se-iam altamente eficientes para retardar a adaptação das mesmas.

Há que se considerar ainda que muitos outros organismos podem e estão contribuindo com metabólitos secundários os mais diversos. Os fungos, os actinomicetos, as bactérias e outros têm um grande potencial a ser desenvolvido. Os actinomicetos já têm contribuído com muitos produtos. As espinosinas, por exemplo, são inseticidas naturais (dois já são comercializados), produzidos pelo actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*, altamente eficientes contra lepidópteros, rapidamente degradados no ambiente, com efeito residual comparável com os piretróides (WEDGE & CAMPER, 2000); e que por terem um único modo de ação, mínimo impacto ambiental, pouca toxicidade para os insetos benéficos, insetos não-alvos e mamíferos, com rápida degradação por fotólise, tornaram-se uma importante classe (macrólidos) de produtos de origem natural. Há que se considerar ainda que o ambiente marítimo tem claramente um imenso potencial para a descoberta de compostos para o desenvolvimento de agentes ativos contra pragas (insetos, ácaros, nematóides, fungos e outros) de plantas e os recentes avanços na área já possibilitam resultados concretos na obtenção de novos produtos (SAYED, 2000).

Assim, juntamente com um potencial praticamente inesgotável à disposição da ciência, surge um duplo desafio para a engenharia genética: a manipulação desses genes sem comprometer a cadeia alimentar com substâncias que possam ser tóxicas aos seres humanos. Entretanto, há um grande potencial ainda a ser desenvolvido, utilizando-se os genes das plantas domesticadas, comprovadamente mais seguros, por serem tais vegetais consumidos há milhares de anos pelos humanos, como o feijão-caupi e o feijão-de-corda.

No Quadro 1, a seguir, de forma resumida, estão algumas espécies vegetais e suas potencialidades, a partir de citações de diversos autores, desde os estritamente científicos, até mesmo aqueles fundamentados no uso popular de plantas. A lista, na verdade, é bem maior e o que ora se apresenta é apenas para que se tenha uma idéia geral dessas possibilidades.

QUADRO 1. Algumas espécies vegetais com potencial para estudo das propriedades inseticidas, repelentes e atraentes (PINHEIRO et al., 1985; TIDEI et al. 1986; HERTWIG, 1986; JULKUNEN-TIITTO et al., 1993; GRAHAM et al., 1995; XU et al., 1996; HARTMANN et al., 1997; BURG & MAYER, 1998; FEPAGRO, 1999; PRATES & SANTOS, 2000; CRUZ et al., 2001; FDA, 2001; STANGARLIN et al. 2001).

NOME CIENTÍFICO*	NOME POPULAR*	AÇÃO/CONTROLE*
<i>Achillea millefolium</i>	Mil-folhas	Fungicida
<i>Achyrocline satureioides</i>	Macela, marcela	Inseticida para pulgões
<i>Adenostyles</i> spp.	-	Inseticida em geral
<i>Allamanda nobilis</i>	Alamandra	Inseticida para pulgões
<i>Allium sativum</i>	Alho	Inseticida para pulgões
<i>Aloe</i> spp.	Babosa	Fungicida e inseticida
<i>Annona crassiflora</i>	Araticum	Inseticida em geral
<i>Anona palustre</i>	Araticum	Combate a piolhos
<i>Anthemis</i> spp.	Macela galega	Inseticida em geral
<i>Artemisia vulgaril L.</i>	Losna	Inseticida em geral
<i>Azadirachta indica</i>	Nim	Inseticida em geral
<i>Baccharis genitelloides</i>	Carqueja	Inseticida em geral
<i>Brassica</i> spp.	Mostarda	Controle de cochonilhas
<i>Calendola officinalis</i>	Calêndula	Inseticida em geral
<i>Canavalia ensiformis</i>	Feijão-de-porco	Herbicida (inibidor)
Continua...		

Continuação...		
<i>Capsicum annum</i>	Pimenta	Repelente em geral
<i>Cayaponia tayuya</i>	Tajujá	Atraente a vaquinhas e besouros
<i>Chrysanthemum Cinerariaefolium</i>	Piretro	Inseticida em geral
<i>Cinnamomum camphora</i>	Canforeira	Repelente de insetos
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela-de-cheiro	Repelente de insetos
<i>Cordia verbenacea</i>	Erva-baleeira	Repelente de insetos
<i>Coriandrum sativum</i>	Coentro	Combate a ácaros e pulgões
<i>Crotalaria wightiana</i>	Crotolária	Combate a nematóides
<i>Croton californicos</i>	Cróton do deserto	Inseticida para pulgões
<i>Croton tiglium</i>	Cróton	Inseticida em geral
<i>Cyclamem elegans</i>	Violeta dos Alpes	Acaricida
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-cidrô	Herbicida e repelente de insetos
<i>Datura stramonium</i>	Figueira-do-inferno	Repelente
<i>Delphinium sp.</i>	Esporinha	Controle de gafanhotos
<i>Equisetum arvense</i>	Rabo-de-lagarto	Inseticida para pulgões e ácaros
<i>Equisetum sp.</i>	Cavalinha	Moléstias foliares
<i>Eucalyptus spp.</i>	Eucaliptos	Inseticida em geral, herbicida
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitangueira	Repelente de insetos
<i>Eupatorium spp.</i>	-	Inseticida em geral
<i>Euphorbia sp.</i>	Papagaio	Inseticida em geral
<i>Heimia palicifolia</i>	Erva-da-vida	Repelente de insetos domésticos
<i>Helianthus annuus</i>	Girassol	Repelente em geral
<i>Heliopsis scabra</i>	Olho-de-boi	Inseticida em geral
<i>Heliotropium spp.</i>	-	Inseticida em geral
<i>Hplophyton cimicidum</i>	Barata	Controle de lagartas em geral
<i>Jatrophos curcas</i>	Pinhão-do-Paraguai	Repelente em geral
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomateiro	Controle de pulgões
<i>Mammea americana</i>	Abriçó-do-Pará	Inseticida em geral
<i>Manihot utilissima</i>	Mandioca-brava	Nematicida
<i>Medicago sativa</i>	Alfafa	Combate mosquitos
<i>Melia azedarach</i>	Cinamomo	Inseticida em geral
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã	Repelente para formigas
<i>Mentha pulegium</i>	Poejo	Fungicida e repelente de insetos
<i>Mikania laevigata</i>	Guaco	Inseticida em geral
Contiuna...		

Continuação...		
<i>Nepta cataria</i>	Cataria	Controle de pulgões
<i>Nerium oleander</i>	Espirradeira	Inseticida em geral
<i>Ocimum basilicum</i>	Manjericão	Controle de dípteros
<i>Origanum majorana</i>	Manjerona	Fungicida, repelente de insetos
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Fungicida
<i>Pachyrrhizus erosus</i>	Chegadinha	Inseticida em geral
<i>Palicourea marcgravii</i>	Erva-do-rato	Raticida
<i>Pelargonium zonali</i>	Gerânio	Repelente em geral
<i>Pimpinella anisum</i>	Anis	Repelente de traças
<i>Piptadenia colubrina</i>	Angico	Inseticida em geral
<i>Polygonum hydropiperoides</i>	Erva-de-bicho	Inseticida em geral
<i>Pteridium aquilinum(L.) Kuhn</i>	Samambaia-das-taperas	Inseticida em geral
<i>Punica granatum</i>	Romã	Fungicida
<i>Quassia amara</i>	Quássia	Repelente para pulgões
<i>Ricinus communis</i>	Mamona	Repelente em geral
<i>Rollinia mucosa</i>	Ariticum	Inseticida em geral
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Repelente de insetos
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda	Pulgões e formigas
<i>Ryania speciosa</i>	Riânia	Controle de <i>Carpocapsa sp.</i>
<i>S. fuchsii</i>	-	Inseticida em geral
<i>Salix spp.</i>	Salso	Inseticida em geral
<i>Sambucus australis</i>	Sabugueiro	Repelente de insetos
<i>Sapindus saponaria L.</i>	Saboneteira	Inseticida em geral
<i>Schinus therebenthifolius</i>	Aroeira vermelha	Inseticida em geral
<i>Schoenocaulon spp.</i>	Sabadilha	Inseticida em geral
<i>Senecio memorensis</i>	-	Inseticida em geral
<i>Stachytarphetta cayenensis</i>	Gervão	Inseticida em geral
<i>Stemona tuberosum</i>	Estemona	Inseticida em geral
<i>Stenocalyx spp.</i>	Pitangueira	Repelente de insetos, fungicida
<i>Stylosanthus spp.</i>	Alfafa-brasileira	Carrapaticida
<i>Symphytum officinalis</i>	Confrei	Inseticida em geral
<i>Tagedes spp.</i>	Cravo-de-defunto	Inseticida em geral
<i>Tanacetum vulgare</i>	Atanásia	Repelente em geral
<i>Taraxacum officinale</i>	Dente-de-leão	Repelente de insetos
Continua...		

Continuação...		
<i>Teucrium abyonicum</i>	Teucrio	anti-helmíntico
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Repelente de insetos domésticos
<i>Tropaeolum majus</i>	Capuchinho	Repelente de pulgões e nematóides
<i>Urginea marítima</i>	Cila-vermelha	Raticida
<i>Urtica urens</i>	Urtiga	Pulgões e lagartas
<i>Vernonia anthelmintica</i>	Vernonia	Vermicida e inseticida
<i>Vigna unguiculata</i>	Feijão-caupi	Inseticida em geral
<i>Zanthoxylum clavalerculis</i>	Espinho-de-vintém	Inseticida em geral

* Nomes científicos, nomes populares e ação ou controle foram colocados na lista, com fidelidade total aos respectivos autores.

2.6.4. Plantas resistentes a herbicidas e plantas que produzem seus próprios herbicidas

Com o advento da engenharia genética, a resistência genética deverá substituir em muito o uso dos agrotóxicos convencionais, principalmente inseticidas e fungicidas. Ganham em importância então os herbicidas, quando se generaliza em todo o mundo o uso da resistência de plantas a herbicidas não seletivos. É o caso da resistência ao glifosato e glufosinato de amônio, já utilizados em mais de 40 milhões de hectares em todo o mundo.

O glifosato, pertencente ao grupo dos chamados derivados da glicina, é um herbicida de ação total, que é degradado rapidamente pelos microorganismos do solo, sofrendo ainda oxidação e decomposição pela luz (OLIVEIRA JR, 1999). Os herbicidas deste grupo atuam inibindo a enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), encontrada nos cloroplastos (COSTA, 2001), impedindo, por consequência, a síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. Por apresentarem mais de um mecanismo de ação, limitado ao metabolismo da planta e praticamente nenhum efeito residual, esses herbicidas são considerados

produtos com baixa probabilidade de selecionar espécies resistentes (OLIVEIRA JR, 1999)..

Com tais características, principalmente referentes à baixa toxicidade e efeito residual no solo praticamente inexistente, pode-se afirmar, sem sombra de dúvidas, que os herbicidas desse grupo são aqueles que mais se aproximam das exigências atuais da sociedade. A intensificação de pesquisas nesta área, com o advento da engenharia genética, vislumbra moléculas menos tóxicas ainda aos seres vivos e menos agressivas ao ambiente.

Culturas tolerantes a herbicidas oferecem aos produtores rurais um importante instrumento no controle de inços e são compatíveis com os sistemas de plantio direto, que auxiliam na conservação do solo. O glifosato é favorável sob o ponto de vista ambiental porque se liga fortemente às partículas do solo e se degrada rapidamente em componentes que ocorrem naturalmente, como o dióxido de carbono (JEZOVSEK, 1997).

De acordo com BRASILEIRO & DUSI (1999), plantas geneticamente modificadas para resistirem a herbicidas podem favorecer a utilização de produtos de ação total, de menor toxidez e mais facilmente degradáveis no solo, aumentando as opções no controle dos inços. Genes de resistência a herbicidas são muito comuns na natureza, atuando das mais diversas formas, fazendo desta opção uma das mais importantes, apesar da resistência que tem havido por parte de grupos de ambientalistas leigos.

Com o aumento da área de plantio de cultivares resistentes a herbicidas, o surgimento de espécies resistentes é uma possibilidade concreta, pela possível seleção de genótipos pré-existent nas populações. Esta é uma situação que a ciência tem enfrentado, em condições muito mais complexas, desde que o primeiro herbicida foi inventado. Por isto não deverá ser difícil a solução por parte da engenharia genética, pois novos herbicidas, mais eficientes, menos

tóxicos e menos agressivos ainda ao ambiente, já estão sendo pesquisados, visando estabelecer novos sistemas.

Como acontece com toda tecnologia em sua fase inicial, mesmo antes que o sistema resistência a herbicidas se generalize, já se apresentam novas perspectivas nesta área. Herbicidas naturais podem ser encontrados em fungos e plantas, formando um grupo extremamente diverso de moléculas naturais, que podem ser vistas potencialmente como herbicidas (COBB, 1992). Assim como podemos contar com genes de resistência a pragas e moléstias, dentro e fora da espécie, em breve a pesquisa estará criando cultivares geneticamente modificadas, que lançam aleloquímicos ao solo, capazes de impedir ou retardar a germinação ou o crescimento das espécies daninhas. É a possibilidade excitante e que começa a ganhar espaço nos projetos de pesquisa em todo o mundo, ou seja, a produção de variedades comerciais de plantas alelopáticas às ervas daninhas, dispensando o uso dos herbicidas sintéticos, como são substituídos os fungicidas e inseticidas, quando se opta pela resistência genética.

O estudo dos metabólitos secundários das plantas tem então inestimável interesse prático, na busca de novas moléculas inseticidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas, dentre outras. Com os avanços da biologia molecular, genes que codificam metabólitos de defesa podem ser transferidos para espécies cultivadas ou mesmo superativados nelas, para aumentar os níveis dos compostos de defesa. Antes, entretanto, há necessidade de se prospectar, dentre uma imensidade de espécies vegetais, aquelas mais promissoras. É um trabalho árduo que começa nos ensaios de alelopatia, desde aqueles com uma dose somente de extrato vegetal, passando pelos os ensaios específicos de dose-resposta de extrato, para se chegar aos experimentos com compostos fracionados, rumo ao caminho para desvendar as estruturas moleculares das substâncias químicas envolvidas, interagindo com outras áreas da ciência.

2.7. A alelopatia e a contribuição à prospecção de novas moléculas bioativas e de genes de resistência a pragas

A busca por novas moléculas na natureza, que possam reverter a crescente degradação ambiental tem ocorrido em todos os sentidos, mas convergindo sempre para a meta principal que é a de prover a humanidade com novas tecnologias menos agressivas à natureza e, por conseguinte, aos seres vivos, inclusive ao homem.

Os trabalhos atuais sobre alelopatia na agricultura têm se voltado principalmente para esta questão: a descoberta de moléculas orgânicas que possam vir a substituir ou associar-se aos agroquímicos convencionais e que estejam mais em consonância com as exigências atuais dos modernos conceitos de biossegurança.

O conceito moderno de alelopatia abrange, além dos mecanismos de defesa das plantas, em função da presença de predadores e competidores, as relações de sinergismo, representadas por aleloquímicos produzidos por certas espécies e capazes de induzir crescimento noutras espécies ou a ativação de qualquer característica que signifique melhoria na adaptação destas últimas ao ambiente (BLUM, 1999; DAKSHINI, 1999).

Em geral, resultados obtidos de experimentos conduzidos em laboratório são o primeiro passo na identificação dos mecanismos do comportamento de plantas, que podem envolver alelopatia (BLUM, 1999), fornecendo subsídios para que tais agentes alelopáticos possam ser isolados e identificados.

De uma forma ou de outra, todas os seres vivos são capazes de produzir substâncias que inibem o crescimento de seus competidores, pois não fosse isto, jamais teriam condições de sobrevivência e a seleção

natural já os teria eliminado, como deve ter ocorrido e continua acontecendo com muitas espécies. Em algumas, entretanto, esta capacidade se sobressai das demais, quando a produção desses metabólitos secundários resulta em forte interferência nos processos de crescimento e desenvolvimento de outras espécies.

Relações de interferência entre plantas são agrupadas na denominação geral de alelopatia (RAVEN et. al., 2001). Na agricultura os efeitos alelopáticos já tem sido aplicados já há algum tempo, tanto no sentido da precaução, como dos benefícios do fenômeno.

Se o termo alelopatia, quando foi criado, referia-se às relações entre plantas e entre microorganismos, atualmente já tem havido uma generalização no sentido de uma maior abrangência na denominação, já que uma planta não compete apenas com outra, mas há um envolvimento geral no ambiente, onde entre os competidores estão também os insetos, os ácaros, os fungos, as bactérias, os vírus e outros (ALMEIDA, 1988; DAKSHINI, 1999). Muitas vezes, inclusive, um mesmo metabólito secundário pode servir como mecanismo de defesa para mais de um agente biótico de estresse, já que diversos fatores agressores externos são capazes de ser percebidos por um mesmo receptor, gerando uma cascata de sinais no processo de regulação gênica, para a ativação de um fator de transcrição (TAIZ & ZAIGER, 1998).

As plantas produzem suas substâncias de defesa quando atacadas, como resultado do processo de expressão gênica (TAIZ & ZAIGER, 1998), mas tais metabólitos secundários podem estar presentes, como produto gênico de expressão constitutiva. Assim como algumas plantas produzem fitoalexinas, outras produzem substâncias fenólicas, como os taninos e os isoflavonóides, que parecem desempenhar um papel semelhante na natureza (RAVEN et. al., 2001), mesmo que estes últimos sejam geralmente de defesas estáticas, ou seja, sempre presentes nas partes da planta onde eles ocorrem.

A ciência da alelopatia tem o potencial de contribuir muito com a produção e estabilidade da agricultura. O grande desafio é utilizar os conhecimentos gerados promovendo uma agricultura sustentável, com proteção à biodiversidade (DAKSHINI, 1999) e para isto a alelopatia necessita da integração com áreas avançadas como bioquímica e biologia molecular, para se tornar plenamente confiável. Desta forma a alelopatia não só seria uma fonte de descoberta de novas moléculas bioativas, como também poderia ter uma influência muito grande no manejo de sistemas naturais e cultivados, se puder ser devidamente estabelecida como um processo ecológico (DALTON, 1999).

2.7.1. A alelopatia na agricultura no controle de ervas daninhas

A alelopatia é um fenômeno muito comum e bem conhecido. Está plenamente comprovado que as plantas em geral produzem compostos químicos alelopáticos que atuam não só sobre outras plantas, interferindo na conservação, dormência das sementes, crescimento das plântulas e vigor vegetativo das adultas, como também são capazes de defendê-las de ataques de patógenos (atuando sobre os esporos, por exemplo), insetos (repelentes atraentes ou tóxicos) e outros herbívoros (ALMEIDA, 1988).

Com relação a moléstias, insetos, bactérias, vírus e outras pragas, os mecanismos envolvidos têm sido relativamente bem estudados, inclusive avanços na área de genética têm permitido que genes de resistência sejam transferidos de uma cultivar para outra, dentro da espécie e de espécies silvestres para cultivares correspondentes, via reprodução sexual. Com o advento da engenharia genética as possibilidades são mais abrangentes, pois a barreira entre espécies foi finalmente quebrada.

A alelopatia, no seu conceito mais clássico, que envolve a produção de aleloquímicos por parte das espécies vegetais, como defesa contra outras

plantas da circunvizinhança, apesar do termo só ter sido criado em 1937, por Molisch (ALMEIDA, 1988), já era conhecida desde a antigüidade. Entretanto, pouco tem sido feito, em termos de melhoramento genético convencional, e só recentemente a área de engenharia genética começa a ser envolvida no sentido de se buscar plantas cultivadas resistentes ou tolerantes a ervas daninhas.

A alelopatia tem um grande potencial no manejo integrado de inços, pela capacidade que as plantas têm, inclusive as cultivadas, de produzirem aleloquímicos com potencial inibidor de crescimento de ervas daninhas (WU et al., 1999), pelas evidências acumuladas de que as cultivares diferem geneticamente entre si na resposta alelopática; e pelos sucessos já obtidos através da manipulação genética deste caracter.

Uma vez que os aleloquímicos são tão comuns, a possibilidade de se obter produtos deles com características herbicidas, a produção de análogos sintéticos e cultivo de plantas consorciadas adequadamente escolhidas, parece ser plenamente viável (ALMEIDA, 1988). Tais produtos poderiam ser muito úteis, por exemplo, na preservação, dormência e germinação das sementes, além de atuarem na lavoura, sobre as sementes das ervas daninhas, quebrando-lhes a dormência e obrigando-as a germinar mais cedo, processos estes já utilizados, mas ainda em pequena escala.

Além da possibilidade de escolher adequadamente as culturas a serem utilizadas conjuntamente e aproveitar o somatório dos efeitos alelopáticos individuais, os avanços no conhecimento das interações alelopáticas pode ser crucial na escolha da seqüência de culturas nas rotações, o que não tem sido geralmente levado em consideração (ALMEIDA, 1988).

Entretanto, há necessidade de muito mais pesquisas, visando clarear mais profundamente os mecanismos de ação dos aleloquímicos, para se conseguir avançar mais no sentido de compreender melhor o controle genético da alelopatia (WU et al., 1999), onde provavelmente muitos genes devem estar envolvidos. Uma vez que tais genes alelopáticos

possam ser identificados e clonados, estariam estabelecidas as condições para programas de melhoramento visando transferir esses genes para cultivares modernas, aumentando sua atividade alelopática, reduzindo o uso de herbicidas.

2.7.2. A alelopatia e o fenômeno da hormese

Os vegetais produzem seus metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 1998), tanto de expressão constitutiva (sempre presentes na planta), quanto de expressão ativada (conforme a necessidade). Se alguns compostos estão presentes em teores tão altos que podem ser até extraídos industrialmente, outros, certamente a grande maioria desconhecida, podem ser produzidos em concentrações muito baixas. Entretanto, devido serem extremamente bioativos, tais compostos, mesmo em mínimas concentrações, podem agir diretamente sobre as células, ativando ou inibindo o crescimento ou desenvolvimento do próprio organismo ou de outros na vizinhança (BLUM, 1999). Quantidades extremamente baixas podem ainda atuar indiretamente, interagindo com outras moléculas, como os fito-hormônios, desencadeando processos de defesa das plantas contra pragas ou mesmo incrementando outros caracteres importantes, relativos ao próprio rendimento das culturas.

Atualmente tem crescido muito o interesse da pesquisa em alelopatia, tanto pela indústria na busca por novas moléculas herbicidas (COBB, 1992; CHON et al., 2003), quanto pela engenharia genética, visando a criação de variedades alelopáticas geneticamente modificadas.

Os experimentos em alelopatia guardam muita semelhança com os ensaios de dose-resposta a herbicida. Esta semelhança, em se tratando da prospecção de compostos herbicidas em extratos vegetais, certamente deve significar também similaridade em relação às próprias respostas. E se pode haver respostas inesperadas ou discrepantes para determinadas

doses de herbicidas, é de se esperar que também possa ocorrer o mesmo em relação a compostos com atividade herbicida nos extratos vegetais.

A bioatividade de compostos em baixíssimas concentrações tem sido observada relativamente há muito tempo na área de pesquisa agrícola, mas as evidências surgiram a partir de biotestes com herbicidas, quando diversos autores notaram, ao determinar curvas de dose-resposta, que alguns produtos estimulavam caracteres estudados no material reagente (SCHABENBERGER et al., 1999; WAGNER et al., 2003; HUNT & BOWMAN, 2004; NICOLA et al., 2004; PEREIRA et al., 2004). Este fenômeno foi definido como hormese, ou seja, a propriedade de um agente tóxico, sob baixíssimas concentrações, em estimular um determinado caráter (FORBES, 2000). Se inicialmente o fenômeno serviu apenas para intrigar os pesquisadores e aumentar os desvios das curvas de resposta, com o advento das modernas tecnologias, o interesse pela compreensão do fenômeno tomou corpo e de alguns anos para cá, diversos autores têm desenvolvido equações que explicam matematicamente o fenômeno (BRAIN & COUSENS, 1989; SCHABENBERGER et al., 1999). Estas equações são capazes de traçar a curva completa de dose-resposta de agentes tóxicos para organismos vivos reagentes, caracterizando desde os efeitos horméticos até os efeitos tóxicos inibidores. Uma equação não é suficiente para a compreensão de um fenômeno, mas a comprovação de sua ocorrência já é um primeiro passo para desvendá-lo.

Um exemplo notável da ocorrência da hormese pode ser obtido com o herbicida glifosato, que em concentrações muito baixas estimula o crescimento de plântulas em biotestes (SCHABENBERGER et al., 1999; SOUZA et al., 2000; WAGNER et al., 2003).

A hormese pode ser explicada como uma adaptação evolutiva que atua para manter a capacidade reprodutiva sob mudanças ambientais (FORBES, 2000). Como exige gasto de energia, nem todos os caracteres exibem hormese simultaneamente, e assim, nem toda a capacidade

reprodutiva é estimulada sob baixos níveis de agentes tóxicos. Já que agentes tóxicos afetam diferentes caracteres em diferentes direções e para diferentes níveis, interpretar as conseqüências ecológicas da hormese de um determinado caráter não é possível sem examinar suas relações com todos os efeitos sobre a capacidade reprodutiva, definida como a habilidade de um organismo em deixar cópias de seus genes para as futuras gerações, envolvendo assim a capacidade de sobrevivência e reprodução, que são essenciais para facilitar a persistência evolutiva dos genes de um organismo.

Assim, caracteres importantes podem então ser afetados negativamente por baixas concentrações de agentes bioativos, diminuindo a capacidade reprodutiva do organismo-alvo. Outros caracteres estimulados podem ser agronomicamente importantes. No primeiro caso se poderia adicionar uma nova opção de estratégia integrada à moderna proposta de Manejo Ecológico de Pragas. Em ambas as situações a descoberta dessas moléculas bioativas forneceria importantes subsídios à moderna química e biotecnologia. Derivados sintéticos de produtos naturais, em baixas concentrações, poderiam controlar pragas, interferindo na capacidade adaptativa das mesmas; outros poderão ser importantes bioestimulantes. Através da engenharia genética, microorganismos e plantas geneticamente modificados também poderiam produzir tais compostos naturais, em teores que viabilizassem a extração e industrialização. Identificados, seqüenciados e clonados esses genes, a transferência dos mesmos para plantas cultivadas melhoraria a resistência a pragas e os rendimentos, sem qualquer riscos a saúde e ao ambiente, pelas baixas concentrações na planta.

2.7.3. Condições a serem observadas nos testes de alelopatia

Os testes de alelopatia parecem ser indicados para avaliar a citotoxicidade de compostos, quaisquer que sejam eles; ou mesmo que estejam isolados ou como participantes no conjunto de um extrato bruto. Tais testes podem mesmo não ser muito fiéis na busca por alelopatia, pois as respostas podem ou não ser resultados de interações alelopáticas (QASEM & HILL, 1989), já que não é possível ter certeza de que o comportamento observado nos bioensaios seja resultado de modificações em consequência do aumento dos níveis de resíduos das plantas incorporadas. A mera presença de um aleloquímico não prova que ele seja ecologicamente importante, já que a prova conclusiva de ocorrência de alelopatia deve demonstrar que os aleloquímicos são produzidos em concentrações suficientemente altas para influenciar na associação entre espécies (INDERJIT & DAKSHINI, 1999).

Entretanto, esses biotestes não apresentam essas limitações, quando se trata apenas de testar citotoxicidade com o objetivo de identificar um ou mais metabólitos de defesa, partindo da avaliação do conjunto nos extratos, até a individualização dos componentes. Mesmo as interações entre os componentes e outros processos que podem ocorrer no meio, alterando os compostos, como as oxidações, potencializando os efeitos citotóxicos, não deixam de ser úteis, já que um dos objetivos de projetos como este é abrir espaço para a descoberta de novas moléculas bioativas. É necessário considerar que um composto, resultado da oxidação de um metabólito secundário, pode ser o produto final da defesa da planta, quando o tecido recebe um ferimento provocado por um herbívoro ou mesmo por um patógeno ou outro agente agressor. No ambiente natural, como por exemplo, no solo, os metabólitos secundários podem sofrer modificações químicas, modificações microbianas, ou mesmo reagirem com os húmus ou serem alterados por fatores físicos (WALLER et al., 1999).

Diferentemente da maioria dos estudos a campo, os bioensaios de laboratório são desenvolvidos em condições ótimas, sem a vulnerabilidade aos estresses químicos que ocorrem com as plantas em ambiente natural (DALTON, 1999), onde níveis relativamente baixos de aleloquímicos são lançados continuamente e por efeito cumulativo acabam sendo efetivos nas relações alelopáticas. Por isto não deve ser surpresa que sejam necessárias altas concentrações de aleloquímicos (ácidos fenólicos) para inibir crescimento nas plantas expostas nos bioensaios.

Algumas vezes não é possível identificar individualmente os agentes alelopáticos, já que muitas respostas são devidas a misturas complexas de compostos orgânicos tóxicos ou não, cada um em baixíssima concentração (BLUM, 1996). Quando o objetivo de um projeto é a alelopatia propriamente dita, a análise dos componentes pode ser frustrante, no caso de se esperar que a bioatividade observada seja devida a determinados componentes, mas os efeitos ocorrem apenas como resultados de interações entre moléculas. A procura por produtos bioativos não tem os resultados iniciais dos testes dos extratos no seu conjunto como o objetivo final, mas apenas a busca da identificação de um fenômeno que precisa ser estudado na sua essência.

Por outro lado, alterações devido ao meio, que diminuem os efeitos de um extrato, estas sim, têm potencial de mascarar os resultados, não interessando aos objetivos de qualquer projeto. Desta forma, não resta dúvidas de que a uniformidade é fator primordial na elaboração de biotestes em alelopatia. Como o ambiente natural promove extrema variação na composição alelopática (INDERJIT & DAKSHINI, 1999), certamente ensaios de laboratório com condições mais controladas possíveis, devem ser provavelmente os mais recomendáveis.

LEHMAN & BLUM (1996) demonstraram que a umidade do solo pode influenciar, mascarando, reduzindo ou mesmo eliminando os efeitos

alelopáticos, por ação de dominância, conforme aumenta o grau de umidade.

WEIDENHAMER et al.(1989) verificaram que os efeitos fitotóxicos são dependentes da densidade de sementes e concentração da fitotoxina. A fitotoxicidade decresceu com o aumento da densidade pela menor disponibilidade (concentração) de toxinas por indivíduo.

Putnan e De Frank (1983), citado por BLUM (1999) observaram que os efeitos do centeio (*Secale cereale*) eram mascarados pela interferência da serragem de plátano, utilizada no experimento, reduzindo a luminosidade e a temperatura.

Os efeitos inibitórios do girassol (*Helianthus annuus L*) sobre *Amaranthus retroflexus* diminuíram, quando foi adicionada solução nutritiva (Hall et al, 1982, citados por BLUM, 1999), influenciando no conteúdo total de ácidos fenólicos. Hall et al.(1982) ainda cultivaram girassol (*Helianthus annuus L*) sob vários níveis de nutrientes, para obter tecidos de girassol com diferentes níveis de ácidos fenólicos totais (TPA), observando que a germinação de sementes de *Amaranthus retroflexus* diminuiu conforme era utilizado tecido de girassol com teores mais altos de TPA. Por outro lado, a adição ao substrato de solução nutritiva diminuiu ou anulou os efeitos inibitórios na germinação de sementes e no crescimento das plântulas. Nos tecidos de girassol, os conteúdos de nitrogênio e TPA foram correlacionados negativamente, enquanto que fósforo e potássio tiveram correlação positiva na produção de TPA, resultando na diminuição da biomassa de plântulas de *Amaranthus*. Isto mostra que o conteúdo de nutrientes no solo e na espécie alelopática pode influenciar na resposta às fitotoxinas. Ácidos clorogênicos foram os mais abundantes, mas influenciaram apenas no crescimento de plântulas de *Amaranthus*, efeito este eliminado quando da adição de solução nutritiva.

Nos sistemas ecológicos os compostos fenólicos parecem desempenhar um papel central, pelo seu potencial fitotóxico, claramente

reconhecido (DALTON, 1999), sem que, entretanto, tenha sido possível estabelecer definitivamente que tenham efeitos alelopáticos, pois não se conseguiu até agora demonstrar que estejam presentes em concentrações e tempo suficientes no solo, para serem responsabilizados pela ocorrência do fenômeno.

INDERJIT & DAKSHINI (1999) sugerem extremos cuidados na elaboração de protocolos de bioensaios para detecção de alelopatia, visando minimizar os efeitos de interações que venham mascarar os efeitos alelopáticos, pois os componentes físicos, químicos e biológicos do solo influenciam na disponibilidade e na ação dos compostos alelopáticos. Assim, a utilização de solo na condução dos ensaios parece não ser a melhor escolha na avaliação da citotoxicidade dos compostos secundários das plantas.

De acordo com BLUM (1999), fundamentado em vários autores, algumas considerações principais devem ser observadas no estabelecimento de bioensaios de alelopatia: maximização dos efeitos fitotóxicos ou benéficos no laboratório; freqüentemente se tem utilizado tecido foliar de plantas saudáveis, mas sob estresse e antes de chuvas, parece ser mais eficiente; no caso de se estocar tecido vegetal, este deve permanecer na forma intacta, para evitar oxidações facilitadas pela moagem; após preparado, o extrato deve ser aplicado imediatamente, para evitar alterações por fatores ambientais; o reagente deve ser de uma espécie bem sensível (*Lactuca sativa* e *Cucumis sativus* são bastante sensíveis); recomenda-se utilizar sementes individuais para o teste, a fim de maximizar as concentrações das fitotoxinas; várias concentrações de extratos de plantas devem ser testadas, já que no solo ocorre esta situação. A espécie reagente mais indicada pelos autores parece ser a alface (*Lactuca sativa*), que apesar de não ser ecologicamente a mais indicada (FOY, 1999), tem a vantagem de ser uma das mais sensíveis (BLUM, 1999; ELAKOVITCH, 1999).

Em geral, os resultados de laboratório são o primeiro passo na identificação dos mecanismos do comportamento de plantas, que pode envolver alelopatia. No mínimo, os agentes alelopáticos devem ser isolados, seu modo de ação e de transmissão identificados e outros fatores (umidade do solo, temperatura, acidez) devem ser eliminados, como causas de variação, antes de se considerar a alelopatia como agente causador dos fenômenos (WILLIS, 1985). Apesar das limitações, os bioensaios são cruciais para a pesquisa em alelopatia e permitem ao pesquisador demonstrar, no mínimo, a existência de potencial alelopático (ELAKOVITCH, 1999), mesmo que poucos experimentos tenham sido eficientes para separar interações alelopáticas de outras interações planta-planta, como aquelas envolvendo competições.

Os bioensaios em alelopatia têm consistido em monitorar a germinação de sementes e/ou crescimento de plântulas de espécies vegetais, peculiarmente mais sensíveis, na presença de resíduos da planta em estudo (BLUM, 1999). A inibição ou estímulo da germinação ou crescimento de plântulas é considerado pela maioria dos autores como evidência de atividade alelopática.

3. PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Resumo

Visando selecionar espécies vegetais como fontes de compostos bioativos, bem como adequar uma metodologia eficiente em testes de alelopatia, 56 diferentes extratos foram testados em seis ensaios (fotofase 14, $25 \pm 0,5^{\circ}$ C) em sementes e plântulas de *Lactuca sativa*, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS), no período de fevereiro de 2003 a abril de 2004. Com exceção do extrato de ariticum (*Rollinia silvatica*), que consistiu na obtenção de um litro de destilado de 750 gramas de folhas com 1,5 L de água, e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) na concentração de 1% (v/v), os demais 54 foram extratos brutos aquosos na dose de 1/3 (p/v), obtidos pela trituração de folhas em água destilada com liquidificador doméstico, com posterior coagem e pH corrigido para $5,8 \pm 0,2$. Sementes a germinar e pré germinadas de *L. sativa* foram colocadas sobre papel toalha esterilizado, contendo extratos vegetais (20 mL), em caixas tipo *germbox*. Nos dois primeiros experimentos, caixas, folhas do material reativo e sementes do material reagente foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto. As sementes ainda foram descontaminadas também com álcool 70 °GL por 15 segundos. Nos demais bioensaios procedeu-se apenas a uma lavagem das folhas com água potável. No primeiro ensaio a utilização de solução nutritiva permitiu a realização de medidas finais aos

12 dias e nos demais, somente com a adição dos extratos, as leituras dos dados de observação foram feitas dos cinco e aos oito dias. Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso com quatro repetições. Nos dois primeiros biotestes cada repetição constou de 16 sementes pré germinadas (plântulas) por repetição. No terceiro e quarto bioensaio foram, respectivamente, 25 sementes a germinar e 16 germinadas por parcela. No quinto e sexto ensaios foram utilizadas 10 sementes a germinar e 10 sementes germinadas, colocadas lado a lado em cada caixa, permitindo a realização de dois bioensaios em cada bateria de caixas e extratos vegetais. Foram medidos os caracteres germinação, emissão de cotilédones, sobrevivência, estatura de plântula, massa fresca e massa seca de raízes, massa fresca e seca da parte aérea. Os biotestes realizados neste trabalho permitem afirmar que a alelopatia é regra geral entre as espécies vegetais e a prospecção de moléculas bioativas, através de testes preliminares, discrimina também facilmente extratos vegetais com efeitos alelopáticos positivos e, portanto, promissores como excipientes de compostos bioestimulantes. A simplificação dos bioensaios possibilita a realização dos testes de alelopatia *in loco*, através de laboratório móvel, permitindo a coleta para avaliações mais precisas daquelas espécies mais promissoras, economizando tempo e recursos financeiros.

Abstract

Aiming to select plant species as source of bioactive compounds and to develop an adequate methodology, 56 different vegetal extracts were studied by six bioassays (photophase 14, $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) on seeds and seedlings of *Lactuca sativa* at laboratory at Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil, from February 2003 to April 2004. Except for *Rollinia silvatica* extract, that consisted on distilled (one liter) obtained from

distillation of 750 g of leaves with 1.5 liter of water, and nim (*Azadirachta indica*) oil at 1%, the others 54 aqueous extract were obtained by the same way (1/3, p/v, respectively, leaves and water distilled and pH 5.8 ± 0.2). The reagent materials (seeds and seedlings of *L. sativa*) were placed on *germbox* (11cm X 11 cm) on substrate (toilet-paper) containing the extracts (20 mL). In some experiments the material (seeds) was disinfected with sodium hypochloride (0.5%) for one minute and alcohol 70° GL for 15 seconds. In others, the leaves received a single washing. In the first bioassay it was applied nutritive solution (hydroponics solution to lettuce) that permitted record of data on the 12th day. The other bioassays (without solution), with extracts only, the data were obtained on the fifth and eighth days. The experimental design adopted was the randomized complete block, with 15 treatments, four repetitions and 40, 64 and 100 seeds or seedlings per treatment. On two experiments the seed and seedlings were placed on the same *germbox*, aiming to execute two bioassays at the same time on each set of boxes and extracts. The characters germination, survival, shoot length, root and shoot dry matter and others were measured and analyzed. The results obtained show that allelopathy is a general condition among plants and the screening of bioactive compounds easily allow to select extracts with negative and positive allelopathic effects. Simplicity of bioassays permits the execution of tests *in loco*, by a mobile laboratory.

3.1. Introdução

Todos os seres vivos, principalmente as plantas, produzem substâncias de defesa como resposta a estresses bióticos e abióticos (ALMEIDA, 1988; TAIZ & ZAIGER, 1998); algum organismo, que porventura não o fizesse, certamente estaria, no mínimo, em processo de extinção. Se por um lado isto significa que a pesquisa por produtos bioativos tem à sua disposição uma fonte praticamente inesgotável

(BARREIRO, 2001), por outro lado, requer que se estabeleçam metodologias adequadas para se prospectar, por exemplo, dentre centenas de metabólitos secundários elaborados numa só espécie, um ou poucos compostos realmente úteis aos objetivos de pesquisa.

Diante de tanta complexidade, impõe-se a simplificação, através do estabelecimento de etapas que objetivem a construção de uma base sólida, a partir da qual a pesquisa científica possa avançar, visando a elucidação dos fenômenos biológicos, tendo como meta uma agricultura cada vez mais sustentável.

Com base nesta visão, foram estabelecidos ensaios de laboratório em condições mais uniformes possíveis, onde extratos vegetais em altas concentrações, adequadamente coletados, foram testados em sementes e plântulas de *Lactuca sativa* (alface), por se constituir esta espécie mais sensível em comparação com as demais, segundo a maioria dos autores (BLUM, 1999; ELAKOVITCH, 1999; FOY, 1999).

Este trabalho de pesquisa objetivou selecionar algumas espécies vegetais mais promissoras, dentre as diversas disponíveis na Região Sul do Brasil, com potencial de bioatividade, a serem testadas para aplicação nas diversas áreas da agricultura. Também se buscou desenvolver metodologia eficiente, rápida e de fácil utilização, para testar extratos vegetais, se necessário, *in loco*, economizando tempo e recursos.

3.2. Revisão de literatura

Os químicos consideram que a dificuldade em trabalhar com extratos de plantas reside principalmente no número muito grande de compostos, aumentando o tempo necessário para purificação; e na complexidade das moléculas naturais, o que na verdade se constitui na riqueza do potencial de tais estruturas complexas (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001), pelas

inúmeras possibilidades na busca de novos derivados sintéticos (MONGE, 2001; YUNES & CECHINEL FILHO, 2001).

Na procura por novos compostos não importa a complexidade, a facilidade de separação ou a concentração, mas se apresentam atividade biológica e por isto os estudos guiados por bioensaíos *in vivo* ou *in vitro* são muito importantes nas fases iniciais (CECHINEL-FILHO & YUNES, 2001). As triagens iniciais geralmente iniciam com modelos experimentais menos complexos e só após a seleção das substâncias puras ativas é que estas são analisadas em ensaios mais específicos, para depois serem levadas ainda para a análise do mecanismo de ação biológica. Esta última etapa é das mais difíceis, pois exige a combinação de técnicas avançadas de biologia molecular, bioquímica, eletrofisiologia (CALIXTO, 2001).

Assim, numa primeira etapa de avaliações, há necessidade primeiramente de testar supostos produtos bioativos no conjunto dos demais metabólitos (BLUM, 1996; CHECHINEL-FILHO & YUNES, 2001). Como as substâncias bioativas, apesar de em número relativamente grande delas, compondo o conjunto dos produtos secundários produzidos por uma espécie vegetal, estão, em geral, individualmente em concentrações relativamente baixas (BLUM, 1996; DALTON, 1999), há que se testá-las em concentrações mais altas possíveis. Desta forma, os autores, de uma maneira geral, recomendam iniciar os biotestes a partir de extratos vegetais nas suas doses mais elevadas, para depois, revelando a presença de uma ou mais substâncias bioativas, avançar no sentido de testá-las isoladamente. Da mesma forma, devido às prováveis concentrações baixas do metabólitos de defesa nos extratos vegetais também é recomendável a utilização de espécies reagentes altamente sensíveis (BLUM, 1999; ELAKOVITCH, 1999), como *Lactuca sativa*, *solanum lycopersicum* e diversas espécies da família Cucubitaceae.

Além das altas concentrações dos extratos vegetais a serem testados, a densidade (distância entre plântulas) das espécies reagentes é muito

importante, no sentido de que a quantidade de metabólitos secundários absorvidos por indivíduo-alvo está diretamente relacionada com o tamanho da população do organismo reagente, para uma determinada porção de extrato vegetal reativo (WEIDENHAMER et al.,1989; BLUM, 1999).

O teste de germinação é muito importante (BLUM, 1999), mas avaliações no crescimento e desenvolvimento de plântulas, a partir de sementes pré germinadas, pela maior sensibilidade destas a estresses abióticos, provavelmente são mais eficientes na detecção da bioatividade nos extratos vegetais.

Os mesmos testes utilizados para detectar alelopatia nos extratos vegetais podem ser utilizados visando a prospecção de bioatividade, com vantagens em relação aos primeiros. Os biotestes muitas vezes não revelam alelopatia (QASEM & HILL, 1989; INDERJIT & DAKSHINI, 1999), mesmo quando detectam interferência no crescimento e desenvolvimento das espécies reagentes. Entretanto, para objetivos que incluem a busca de substâncias que potencialmente possam vir a ser praguicidas, diretamente ou por ação elicitora, ou mesmo indutoras de processos que envolvam o crescimento e desenvolvimento vegetal, tais biotestes podem ser excelentes.

Como os metabólitos de defesa das plantas, em resposta a fatores bióticos e abióticos são, em grande parte, ativados a partir de tais eventos (ALMEIDA, 1988; TAIZ & ZAIGER, 1998), deve ser esperada grande variação na composição dos extratos vegetais em função das variações ambientais (WILLIS, 1985). Mesmo aquelas substâncias secundárias, cujos genes possuem expressão constitutiva, podem variar muito em concentração nos extratos vegetais, em função das variações ambientais envolvendo condições climáticas. Nos períodos de seca ou com umidade abundante provavelmente estarão, respectivamente, mais ou menos concentrados nas plantas. As variações podem ocorrer até mesmo em função do horário de coleta do material vegetal. Por exemplo, em dias

ensolarados as maiores concentrações geralmente ocorrem entre 12 e 15 horas, quando as perdas são menores, pois as plantas usualmente evitam a saída de água no período mais quente do dia, fechando os estômatos das folhas. Através de um mecanismo envolvendo o ácido abscísico, resulta em menor turgescência das células-guarda e, por conseguinte, os ostíolos se fecham (TAIZ & ZEIGER, 1998).

Condições do solo como pH, pressão osmótica da solução, nutrientes, textura, aeração, umidade, presença de microorganismos e outras também podem influenciar muito a atividade dos metabólitos secundários (LEHMAN & BLUM, 1996; INDERJIT & DAKSHINI, 1999; WALLER et al., 1999). Assim, não há dúvidas de que a utilização de solo como substrato para os biotestes de alelopatia, principalmente quando o objetivo é avaliar a bioatividade de extratos vegetais, sejam ou não por efeitos alelopáticos, não é recomendável. Desta forma, os biotestes de alelopatia e de bioatividade em laboratório são decisivos (ELAKOVITCH, 1999), mas exigem o máximo de uniformidade (DALTON, 1999; INDERJIT & DAKSHINI, 1999), visando eliminar fatores que venham a interferir, seja na composição dos extratos, seja nas substâncias neles contidas, degradando-as ou inativando-as.

3.3. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no período de fevereiro 2003 a abril de 2004, em sala climatizada (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 horas) do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria.

A escolha das espécies vegetais testadas baseou-se principalmente na referência por outros autores, como tendo potencial alelopático ou mesmo como fungicida e inseticida, principalmente (PINHEIRO et al., 1985; TIDEI et al. 1986; HERTWIG, 1986; JULKUNEN-TIITTO et al., 1993; GRAHAM et

al., 1995; XU et al., 1996; HARTMANN et al., 1997; BURG & MAYER, 1998; FEPAGRO, 1999; PRATES & SANTOS, 2000; CRUZ et al., 2001; FDA, 2001; STANGARLIN et al. 2001). Outras, como algumas espécies da família Annonaceae (*R. silvatica*) e Meliaceae (*Azadirachta indica* e *Meliah azedarach*), que foram utilizadas nos experimentos, já são conhecidas por conterem compostos inseticidas promissores, até mesmo já identificados (McMILLIAN, 1969; SCHMETTERE, 1990; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1997; JOHNSON et al., 2000; SOUZA & VENDRAMIM, 2000; VENDRAMIM & SCAMPINI, 1997; NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002; BOGORNI, 2003; dentre outros).

A identificação e confirmação das espécies vegetais utilizadas, relacionadas nos bioensaios a seguir, foram realizadas pelo Professor Adelino Alvarez Filho, M. Sc. em Taxonomia Vegetal.

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L. - Asteraceae), variedade Maravilha de Inverno, a germinar e pré-germinadas, foram colocadas em caixa tipo *germbox* (11cm x 11 cm) fechadas, sobre papel-toalha embebido com extratos vegetais (20 mL por caixa) a serem avaliadas, com pH corrigido para $5,8 \pm 0,2$, na concentração de 1/3 (p/v), em gramas de folhas frescas por mL de água destilada. Os extratos vegetais foram obtidos a partir da coleta (entre 12 e 15 horas) de folhas, que foram a seguir lavadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto e novamente lavadas com água potável, em dois primeiros bioensaios (Bioteste 1 e 2). Nos demais experimentos esta assepsia não foi realizada, já que se observou que os níveis de infecção são mínimos, relativamente ao curto espaço de tempo entre a instalação e a coleta de material para análise. Após, as folhas, misturadas com água destilada, foram trituradas em liquidificador doméstico por 2 minutos. Os extratos foram filtrados em tecido de algodão, sob pressão, e imediatamente utilizados, ficando no máximo por um período de 12 horas estocados à temperatura ambiente. O extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*) foi obtido a partir de flores secas (à sombra), com 10 cm de pedúnculo e

conservadas no congelador a -20°C . O destilado de ariticum (*Rollinia silvatica*) correspondeu ao material bruto de um litro de destilado da mistura de 750 gramas de folhas com 1,5 L de água. O óleo de nim, utilizado na concentração de 1% (v/v), de acordo com Certificado de Análise (BRITO, 2004), continha 0,158% (m/m). A testemunha correspondeu ao tratamento com água destilada.

As sementes de alface pré-germinadas, com radícula aproximada de 2mm, foram obtidas a partir da germinação em papel toalha embebido com água destilada, à temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 24 horas. As sementes ainda foram também desinfetadas com álcool 70 °GL por 15 segundos. Foram utilizados 16 indivíduos (plântulas) por repetição, nos dois primeiros e no quarto experimentos; 25 sementes no terceiro experimento de germinação e 10 sementes e plântulas (sementes pré germinadas) nos demais experimentos (Bioteste 5 e 6). Nos bioensaios com 10 sementes por repetição, as caixas *germbox*, repartidas ao meio, serviram para realizar os dois experimentos (de germinação e de crescimento e desenvolvimento de plântula) simultaneamente, aproveitando os extratos para ambos.

Os principais parâmetros observados foram: índice de germinação, índice de sobrevivência, estatura de plântula, massa seca de raízes e massa seca da parte aérea. Outros dados, como índice de emissão de cotilédones, comprimento de radícula, massa fresca de raízes e massa fresca da parte aérea, foram obtidos em alguns experimentos, na tentativa de otimizar a metodologia.

O delineamento experimental para todos os experimentos foi blocos ao acaso com 4 repetições. Cada experimento constou de 15 tratamentos.

Os procedimentos de análise e interpretação de experimentos foram realizados usando o pacote estatístico NTIA/EMBRAPA (Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia, cedidos pela EMBRAPA 1986, 1988, 1989). Os dados para índice de germinação, emissão de cotilédones e sobrevivência, nas análises estatísticas, foram

transformados em arco-seno da raiz quadrada da proporção de indivíduos viáveis para o caráter considerado, relativamente ao número inicial de indivíduos testados, igual em todas as parcelas.

Para a consecução dos objetivos do projeto foram executados seis experimentos especificados a seguir.

Bioteste 1

Estabelecimento: 28 de fevereiro de 2003. As medidas em plântulas foram realizadas aos sete e doze dias. Para tal, foi feita uma aplicação de solução nutritiva (20 mL/caixa) para hidroponia em alface (SANTOS et al., 2002), aos sete dias, preparada pelo Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Rurais (UFMS, Santa Maria, RS).

Tratamentos:

- 1- Testemunha: Água (água destilada)
- 2- Capim-santo: *Cymbopogon densiflorus* Stapf. - Poaceae
- 3- Cipreste: *Cupressus sempervirens* L. - Cupressaceae
- 4- Espirradeira, var. vermelha: *Nerium deander* L. - Apocynaceae
- 5- Eucalipto: *Eucalyptus citriodora* Hook. - Myrtaceae
- 6- Gervão: *Stachytarpheta cayenensis* (Rich.) Vahl - Verbenaceae
- 7- Sabugueiro: *Sambucus australis* Cham. et Schlecht. -
Caprifoliaceae
- 8- Manjerição: *Ocimum basilicum* L. - Lamiaceae
- 9- Canela-de-cheiro: *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. - Lauraceae
- 10- Maricá: *Mimosa bimucronata* Kuntze - Mimosaceae
- 11-Taquaireira: *Bambusa tuldoides* Munro - Bambusaceae
- 12-Capim-cidrô: *Cymbopogon citratus* (Stapf.) DC. - Poaceae
- 13-Poejo: *Cunila microcephala* Benth. - Lamiaceae
- 14-Jurubeba: *Solanum paniculatum* L. - Solanaceae
- 15-Caliandra: *Calliandra selloi* (Spreng.) Macbride - Mimosaceae

Bioteste 2

Este bioteste foi estabelecido a 17 de julho de 2003. As medidas de plântulas foram realizadas aos 8 dias, no limite aparente do fim das reservas nutritivas das sementes.

Tratamentos:

- 1- Testemunha: água destilada
- 2- Cinamomo sombrinha: *Meliah azedarach* L. var. *umbracolifera* (Knox) Rehder - Meliaceae
- 3- Alecrim: *Rosmarinus officinalis* L. -Lamiaceae
- 4- Erva-de-bicho: *Polygonium punctatum* Elliot e spp. -Polygonaceae
- 5- Carqueja: *Baccharis trimera* (Less.) DC. -Asteraceae
- 6- Marcela: *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. -Asteraceae
- 7- Aveloz: *Euphorbia tirucalli* L. -Euphorbiaceae
- 8- Mamona: *Ricinus communis* L. -Euphorbiaceae
- 9- Samambaia-das-taperas: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn - Pteridaceae
- 10- Quitoco: *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabr. -Asteraceae
- 11- Aroeira-periquita: *Schinus terebinthifolius* Raddi -Anacardiaceae
- 12- Angico-vermelho: *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan - Mimosaceae
- 13- Guaco: *Mikania laevigata* Schultz-Bip - Asteraceae
- 14- Destilado de ariticum: *Rollinia silvatica* (St. Hil.) Mart. -Annonaceae
- 15- Óleo de nim a 1%: *Azadirachta indica* A. juss. -Meliaceae

Bioteste 3 e bioteste 4

Estabelecimento: 02 de dezembro de 2003. Diferindo da metodologia dos biotestes anteriores, a limpeza do material vegetal consistiu apenas numa lavagem com água potável. Foram registrados o número de plantas germinadas (emissão de mais de 1mm de radícula) no Bioteste 3 e outras medidas de plântulas aos cinco dias no Bioteste 4. Foram colocadas 25

sementes para germinar no Bioteste 3 e 16 sementes pré germinadas no Bioteste 4, por caixa *germbox*.

Tratamentos:

- 1- Testemunha: água destilada
- 2- Falso-boldo: *Plecthranthus barbatus* Andr. -Lamiaceae
- 3- Carurú: *Amaranthus cruentus* L. -Amarantaceae
- 4- Folha-da-fortuna: *Bryophyllum calycinum* Salisb. -Crassulaceae
- 5- Salso-chorão: *Salix humboldtiana* Willd. -Salicaceae
- 6- Capuchinho: *Tropaeolum majus* L. -Tropaeolaceae
- 7- Pariparoba: *Piper dilatatum* L. C. Rich. -Piperaceae
- 8- Guajuvira: *Patagonula americana* L. -Boraginaceae
- 9- Murta: *Blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) Berg. -Myrtaceae
- 10- Tiririca: *Cyperus rotundus* L. -Cyperaceae
- 11- Uva-do-japão: *Hovenia dulcis* Thumb. -Rhamnaceae
- 12- Romanzeira: *Punica granatum* L. -Punicaceae
- 13- Babosa: *Aloe arborescens* Mill. -Liliaceae
- 14- Cancorosa: *Maytenus ilicifolia* Mart. -Celastraceae
- 15- Mil-folhas: *Achillea millefolium* L. -Asteraceae

Bioteste 5 e Bioteste 6

Estabelecido em 16 de abril de 2004, nestes dois bioensaios não foi também realizada a desinfecção de folhas para preparação dos extratos. Diferindo da metodologia dos biotestes anteriores, foram colocadas 10 sementes (pré germinadas e não) por caixa *germbox*, possibilitando a realização de dois ensaios com o mesmo material. As medidas de plântulas foram realizadas aos cinco dias no Bioteste 6 e o número de plantas germinadas consistiu em considerar germinadas as sementes que emitiram mais 1 mm de radícula no Bioteste 5. Esta simplificação permitiria até mesmo realizar os testes no próprio local de coleta de material.

Tratamentos:

- 1- testemunha: água destilada
- 2- Pixirica: *Leandra purpurascens* (DC.) Cogn. -Melastomataceae
- 3- Purga-pinhão: *Jatropha curcas* L. -Euphorbiaceae
- 4- Erva-do-capitão: *Hydrocotyle umbellata* L. -Apiaceae
- 5- Jambolão: *Syzygium cumini* (L.) Skeels -Myrtaceae
- 6- Grevilha-anã: *Grevillea banksii* R. Br. -Preoteaceae
- 7- Hortelã-pimenta: *Mentha piperita* L. -Lamiaceae
- 8- Pata-de-vaca: *Bauhinia forticata* Benth. -Caesaspiniaceae
- 9- Açoita-cavalo: *Luehea divaricata* Mart. -Tiliaceae
- 10- Fáfia: *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze -Amaranthaceae
- 11- Fumo-bravo: *Solanum erianthum* D. Don - Solanaceae
- 12- Chá-de-bugre: *Casearia sylvestris* Sw. -Flacourtiaceae
- 13- Salvia-da-gripe: *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britton et Wilson -Verbenaceae
- 14- Terramicina: *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik ex R. E. Fries -Amaranthaceae
- 15- Pinus: *Pinus elliottii* Engelm. -Pinaceae

3.4. Resultados e discussão

Os resultados obtidos em seis biotestes com extratos vegetais, na germinação, crescimento e desenvolvimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), são apresentados através das tabelas a seguir.

Na Tabela 1 observa-se que os extratos de Capim-santo, cipreste, eucalipto, sabugueiro, manjerição, taquaireira, jurubeba e Capim-cidrô promoveram efeitos drásticos sobre os parâmetros emissão de cotilédones e sobrevivência, não permitindo inclusive que os demais caracteres pudessem ser avaliados. De uma maneira geral todos os

extratos vegetais apresentaram efeitos, em maior ou menor grau, sobre os caracteres estudados. Estes resultados já eram esperados, já que a grande maioria das espécies testadas neste experimento foi escolhida a partir de referências de outros autores, como potencialmente alelopáticas.

A aplicação de solução nutritiva aos sete dias permitiu a obtenção de alguns dados de observação (estatura, massa seca de raízes e massa seca da parte aérea) aos 12 dias. A suposta interferência da solução nutritiva, anulando os efeitos alelopáticos dos extratos (BLUM, 1999), parece não ter ocorrido, como demonstraram os resultados para estes referidos caracteres.

Na Tabela 2 verifica-se que os extratos de carqueja e guaco provocaram a mortalidade de 100% das plântulas de alface avaliadas. Acrescente-se ainda como altamente tóxicos os extratos de cinamomo e aroeira-periquita. Por outro lado, o extrato de marcela apresentou efeito alelopático significativamente positivo para o caráter estatura de plântula, comparativamente com a testemunha. O destilado de ariticum determinou reduções significativas na manifestação de todos os caracteres estudados, enquanto que o óleo de nim inibiu apenas o crescimento das plântulas de alface e induziu significativamente o crescimento de raízes, o que resultou num maior acúmulo de matéria seca. Com exceção do extrato de marcela, os resultados deste bioensaio eram também esperados. Entretanto, se a comprovação de efeitos alelopáticos pode ser indicativo de material promissor no controle de pragas (bactérias, fungos, insetos, ervas daninhas e outras), a utilização dos extratos de ariticum, nim e cinamomo, com efeitos inibidores diversos e já identificados pela ação inseticida (McMILLIAN, 1969; SCHMETTERER, 1990; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1997; JOHNSON et al., 2000; SOUZA & VENDRAMIM, 2000; VENDRAMIM & SCAMPINI, 1997; NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002; BOGORNI, 2003), demonstra a eficiência dos ensaios de alelopatia em identificar espécies vegetais promissoras. Este caminho inverso mostra também que a procura por agentes praguicidas não pode se fixar

apenas na escolha de extratos de espécies vegetais com efeitos drásticos sobre o material reagente. O extrato de cinamomo demonstrou ter, além de poderosa ação inseticida, efeitos alelopáticos drásticos sobre alface, que apontam para a provável existência de um ou mais compostos, no mínimo com ação herbicida. Já os extratos de ariticum e de nim, apesar da poderosa ação inseticida, não tiveram efeitos drásticos sobre as plântulas de alface. O extrato de ariticum foi o que apresentou mais toxicidade, enquanto que o extrato de nim, além de pequenos efeitos inibidores, promoveu uma maior acumulação de matéria seca de raízes, como consequência provável do maior desenvolvimento de raízes e da formação intensa de pelos radiculares. Isto sugere que possam existir no extrato de nim um ou mais compostos com ação elicitora da resposta das plantas a agentes externos. A intensa proliferação de pelos radiculares pode indicar a indução da biossíntese de etileno, um mediador da resposta das plantas a pragas (TAIZ & ZEIGER, 1998).

O extrato de marcela, com efeito alelopático significativo para o caráter estatura de plântula, sugere a presença de um ou mais compostos bioestimulantes neste extrato e remete à possibilidade de avaliação posteriores neste sentido.

A leitura de dados de observação aos oito dias parece ser o limite para o bioensaio com *L. sativa*, sem a utilização de solução nutritiva.

Na Tabela 3, que contém resultados de dois bioensaios, evidenciaram-se os efeitos alelopáticos altamente tóxicos de extratos de carurú, capuchinho, pariparoba, murta e romanzeira, tanto para os caracteres germinação, quanto para sobrevivência de plântulas de alface. Os extratos de boldo, guajuvira, tiririca e babosa aparentemente apresentaram efeitos alelopáticos positivos para os caracteres estatura de plântula e massa fresca da parte aérea em alface. Entretanto, para as condições do experimento, apenas o extrato de guajuvira apresentou resultados estatisticamente superiores, comparativamente com a testemunha. Mesmo assim, todas essas quatro espécies vegetais

certamente merecem avaliações mais abrangentes e aprofundadas em outros bioensaios específicos. Acrescente-se que a aplicação do teste de Duncan discrimina significativamente estes respectivos tratamentos da testemunha (água destilada). A espécie tiririca parece conter compostos inibidores da germinação, além de estimulantes do crescimento, sugerindo a existência de um complexo de compostos que podem agir isoladamente ou interagir das mais variadas formas.

A leitura final efetuada aos cinco dias já permitiu a discriminação entre os tratamentos, sem que houvesse problemas com contaminação, já que os extratos foram preparados a partir de folhas simplesmente lavadas com água potável.

Como nos demais bioensaios, os dois experimentos resumidos na Tabela 4, permitem identificar as mais variadas formas de ação alelopática no diversos extratos vegetais testados. Vários extratos (pixirica, hortelã, pata-de-vaca, fáfia, salva-da-gripe, terramicina e pinus) mostraram efeitos drásticos sobre germinação e sobrevivência, eliminando praticamente a população de sementes ou plântulas das parcelas. Os demais, com exceção do extrato de açoita-cavalo, que parece ter estimulado o crescimento de plântulas de alface, apresentaram efeitos tóxicos em geral, para os caracteres avaliados. O extrato de açoita-cavalo, similarmente ao extrato de tiririca, parece conter agentes inibidores da germinação e estimulantes do crescimento.

Da mesma forma que os dois bioensaios anteriores, a leitura realizada aos cinco dias e a simples lavagem do material reativo com água potável, aparentemente não interferiram no desempenho dos experimentos.

Nos seis experimentos realizados foram testados extratos de 56 espécies vegetais, principalmente dentre as mais promissoras, em função da literatura disponível (PINHEIRO et al., 1985; TIDEI et al. 1986; HERTWIG, 1986; JULKUNEN-TIITTO et al., 1993; XU et al., 1996; HARTMANN et al., 1997; BURG & MAYER, 1998; FEPAGRO, 1999; PRATES & SANTOS, 2000; CRUZ et al., 2001; FDA, 2001; STANGARLIN

et al. 2001). Isto talvez explique porque praticamente todas as espécies testadas apresentaram aparentemente efeitos alelopáticos ou, de forma mais abrangente, seus extratos foram bioativos. Mesmo para os extratos de boldo e de babosa, para os quais não houve diferenças significativas (Tabela 3) pelo teste de Tukey para os caracteres avaliados, comparativamente com a testemunha, pode-se inferir que tais diferenças poderiam ser evidenciadas estatisticamente se o experimento fosse mais preciso; tanto que bastou aplicar o teste de Duncan para que essas médias se diferenciasssem significativamente da testemunha.

De uma maneira geral, pode-se também inferir, com base nos resultados observados nas quatro tabelas constantes neste trabalho, que os extratos vegetais contêm compostos bioativos que podem tanto ter efeitos por si só, isoladamente, como podem interagir sinergicamente ou antagonicamente com outros. Alguns extratos, por exemplo, inibiram a germinação e não afetaram a sobrevivência de plântulas e outros, inclusive, chegaram a apresentar efeitos alelopáticos positivos sobre outros caracteres. Isto corrobora com as observações feitas por alguns autores (WILLIS, 1985; ALMEIDA, 1988; TAIZ & ZAIGER, 1998; MONGE, 2001; YUNES & CECHINEL FILHO, 2001), que se referem à complexidade, ao grande número de compostos contidos nos extratos vegetais e à variabilidade devida às variações ambientais e à própria resposta da planta pelos sistemas de ativação da defesa. Assim, se ensaios preliminares como estes apenas remetem para a realização de biotestes mais específicos, a partir da seleção de espécies mais promissoras, alguns dados de observação devem ser melhor apreciados para tentar evitar que sinergismos e antagonismos entre compostos contidos nos extratos possam eliminar espécies promissoras, contendo moléculas de especial interesse. Desta forma, algumas observações particularizadas para determinados tratamentos podem ser importantes também para futuras investigações. O extrato de ariticum, por exemplo, em contato com a radícula das plântulas provocou necrose total da

mesma em menos de 24 horas. Entretanto, os sintomas foram limitados à região de contato, de tal forma, que muitas plântulas conseguiram sobreviver, emitindo novas radículas. Pode-se especular, neste caso, que o modo de ação do agente causador é por contato. Já o extrato de carqueja, que promoveu sintomas similares, resultou em mortalidade total, como se um composto agisse rapidamente por contato e outro por ação sistêmica, porém mais demoradamente. Alguns extratos como os de ariticum, nim, marcela, aveloz e mamona promoveram intensa proliferação de pelos radiculares, provavelmente devido induzirem a síntese de etileno, fito-hormônio mediador da biossíntese de metabólitos secundários de defesa das plantas (TAIZ & ZEIGER, 1998).

A partir da utilização de metodologia, com base em diversos autores, foi possível encaminhar uma metodologia para os ensaios preliminares com extratos vegetais. As recomendações de BLUM (1996) e de DALTON (1999) do uso de altas concentrações de extrato, seguidas neste trabalho (1/3, p/v) foram altamente eficientes e a baixa densidade do material reagente sugeridas por BLUM (1999) e WEIDENHAMER et al. (1999), permitiram que se chegasse a 20 sementes por caixa tipo *germbox*, sendo que foi plenamente possível obter resultados satisfatórios utilizando 10 indivíduos por repetição e assim, realizar dois ensaios simultaneamente com os mesmos extratos vegetais. A espécie *L. sativa*, recomendada pela maioria dos autores, dentre os quais BLUM (1999) e ELAKOVITCH (1999), parece ser um ótimo reagente. Entretanto observou-se uma relativa alta variabilidade nesta espécie, para a variedade utilizada (Maravilha de verão), o que parece ser responsável por alguns coeficientes de variação relativamente altos. Isto leva a se sugerir que para a realização de tais bioensaios se poderia realizar seleções nesta espécie, visando a obtenção de material mais puro e uniforme.

A leitura final dos dados de observação ao cinco dias, mostrou-se satisfatória, permitindo a simplificação dos biensaios, não havendo necessidade de desinfecção e nem a adição de solução nutritiva, pois

neste curto intervalo de tempo não ocorreram problemas de infecções por microorganismos.

Corroborando com as observações feitas por BLUM (1999), observações feitas em plântulas parecem ser mais informativas e consistentes do que os testes de germinação, apesar destes também serem importantes. Neste trabalho, nos biotestes realizados a partir de sementes a germinar, não foi possível aproveitar os dados de observação sobre sobrevivência, estatura e outros subseqüentes, devido aos altos coeficientes de variação. Neste caso parece ser mais recomendável obter apenas os dados sobre germinação. Para os demais dados de observação ficou bastante evidente a necessidade de se partir de bioensaios com sementes pré-germinadas (plântulas), garantindo 100% de indivíduos vivos no início do experimento para todas as parcelas, ganhando-se com isto na precisão dos experimentos.

Outra observação importante e que não pode deixar de ser registrada é que em todos os experimentos foi comum o efeito significativo para blocos, indicando a necessidade de bloqueamento nos bioensaios, como fator de redução do erro experimental. Como o tempo de preparação dos experimentos foi em torno de 12 horas, prováveis alterações devido a oxidações e interações entre compostos nos extratos devem ter ocorrido neste período. Interessantemente observou-se que a tendência sempre foi a de extratos colocados em contato mais tardiamente com o material reagente (últimas repetições) promoverem inibição em grau maior do que aqueles utilizados quase que imediatamente à preparação.

TABELA 1. Valores médios \pm EP (erro padrão da média) para os caracteres emissão de cotilédones (E) em porcentagem; sobrevivência (S) em porcentagem; estatura (C), em milímetros; massa fresca de raízes (MFR) em miligramas; e massa fresca da parte aérea (MFA) em miligramas de plântulas oriundas de sementes pré germinadas de alface (*Lactuca sativa*), tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório (bioteste 1). 2005.

Tratamentos	E (%)	S (%)	C (mm)	MFR (mg)	MFA (mg)
Testemunha	98,4 a	93,8 a	18,0 \pm 0,71 a	88,3 \pm 15,49 a	461,8 \pm 17,52 a
Capim-santo	0,0 h	0,0 d	-	-	-
Cipreste	12,5 gh	0,0 d	-	-	-
Espirradeira	57,8 cd	56,2 b	13,8 \pm 0,49 b	36,9 \pm 2,89 cb	175,0 \pm 10,15 c
Eucalipto	65,6 bc	0,0 d	-	-	-
Gervão	73,4 b	21,9 c	8,5 \pm 0,29 c	21,8 \pm 1,8 cb	127,6 \pm 8,34 cd
Sabugueiro	57,8 cd	0,0 d	-	-	-
Manjeriçã	1,6 h	0,0 d	-	-	-
Canela	23,4 fg	6,2 cd	13,0 \pm 0,41 b	22,2 \pm 4,34 cb	112,0 \pm 9,8 cd
Maricá	43,8 de	18,8 c	5,2 \pm 0,25 d	13,0 \pm 1,79 c	93,0 \pm 2,77 d
Taquareira	45,3 de	0,0 d	-	-	-
Capim-cidrô	0,0 h	0,0 d	-	-	-
Poejo	28,1 ef	25,0 c	9,5 \pm 0,50 c	20,0 \pm 2,54 cb	131,0 \pm 13,95 cd
Jurubeba	28,1 ef	0,0 d	-	-	-
Caliandra	71,9 bc	67,2 b	16,8 \pm 0,25 a	42,4 \pm 6,07 b	349,5 \pm 36,41 b
Média	-	-	12,11	34,96	207,26
Desvio padrão	-	-	0,74	11,72	32,70
C. V. %	18,2	31,3	6,1	33,5	15,8

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

TABELA 2. Valores médios \pm EP (erro padrão da média) para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem; estatura (C), em milímetros; massa seca de raízes (MR) em miligramas; e massa seca da parte aérea (MA) em miligramas de plântulas oriundas de sementes pré germinadas de alface (*Lactuca sativa*), tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório (bioteste 2). 2005.

Tratamentos	S (%)	C (mm)	MR (mg)	MA (mg)
Testemunha	95,3 a	8,5 \pm 0,65 bc	2,52 \pm 0,19 cd	9,4 \pm 0,3 ab
Cinamomo	25,0 ef	2,7 \pm 0,24 ef	0,58 \pm 0,05 e	2,48 \pm 0,19 d
Alecrim	54,7 cde	4,0 \pm 0,50 ef	1,33 \pm 0,25 de	5,18 \pm 0,94 cd
Erva-de-bicho	64,1 c	8,4 \pm 0,44 bc	1,10 \pm 0,18 e	6,15 \pm 0,45 c
Carqueja	0,0 f	-	-	-
Macela	95,3 a	13,0 \pm 1,29 a	3,05 \pm 0,25 bc	10,20 \pm 0,53 a
Aveloz	96,9 a	7,6 \pm 0,13 cd	4,00 \pm 0,04 b	9,28 \pm 0,54 ab
Mamoneira	79,7 bc	10,9 \pm 0,50 ab	2,90 \pm 0,5 bc	9,12 \pm 0,75 ab
Samambaia	59,4 cd	5,0 \pm 0,33 de	0,95 \pm 0,12 e	5,20 \pm 1,07 cd
Quitoco	62,5 c	4,7 \pm 0,4 e	0,90 \pm 0,15 e	6,92 \pm 1,16 bc
Aroeira-periquita	17,2 f	5,0 \pm 0,37 de	0,35 \pm 0,09 e	2,60 \pm 0,50 d
Anjico-vermelho	29,7 def	7,6 \pm 0,88 cd	0,45 \pm 0,12 e	3,05 \pm 0,82 d
Guaco	0,0 f	-	-	-
Destilado ariticum	57,8 cde	1,7 \pm 0,19 f	0,80 \pm 0,09 e	5,99 \pm 0,99 c
Óleo de nim a 1%	90,6 ab	2,4 \pm 0,16 ef	5,28 \pm 0,57 a	7,10 \pm 0,36 bc
Média	-	6,26	1,86	6,35
Desvio padrão	-	1,08	0,50	1,10
C.V. %	22,0	17,2	26,8	17,4

Valores médios seguidos por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 3. Valores médios \pm EP (erro padrão da média) para os caracteres germinação (G) em percentagem; sobrevivência (S) em percentagem; estatura (C) em milímetros; e massa fresca da parte aérea (MFA) em miligramas de plântulas oriundas de sementes pré germinadas de alface (*Lactuca sativa*), tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório (biotestes 3 e bioteste 4). 2005.

Tratamentos	G (%)	S (%)	C (mm)	MFA (mg)
Testemunha	85,0 a	97,5 a	9,9 \pm 0,29 bc	115,6 \pm 8,06 abc
2- Boldo	82,5 ab	95,0 a	13,3 \pm 0,98 ab	111,3 \pm 6,72 abcd
3- Carurú	10,0 ef	0,0 b	-	-
4- Folha-da-fortuna	45,0 bcdef	92,5 a	9,9 \pm 1,38 bc	82,6 \pm 9,34 cde
5- Salso-chorão	32,5 def	75,0 a	6,2 \pm 0,91 c	50,7 \pm 11,60 e
6-Capuchinho	0,0 f	0,0 b	-	-
7- Pariparoba	0,0 f	0,0 b	-	-
8- Guajuvira	72,5 abc	97,5 a	17,4 \pm 1,32 a	132,1 \pm 11,38 a
9- Murta	5,0 ef	0,0 b	-	-
10-Tiririca	52,5 bcde	90,0 a	14,1 \pm 0,77 ab	123,0 \pm 8,19 ab
11- Uva-do-japão	40,0 cdef	97,5 a	9,8 \pm 0,60 bc	82,7 \pm 3,77 cde
12-Romanzeira	22,5 ef	0,0 b	-	-
13-Babosa	75,0 abcd	92,5 a	13,7 \pm 1,26 ab	116,0 \pm 9,80 abc
14- Cancorosa	22,5 ef	80,0 a	7,3 \pm 0,75 c	74,8 \pm 4,77 de
15- Mil-folhas	37,5 def	87,5 a	10,4 \pm 0,42 bc	87,0 \pm 2,27 bcde
Média	-	-	11,2	97,6
Desvio padrão	-	-	1,79	16,45
C. V. %	46,7	32,6	16,0	16,8

Valores médios seguidos por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. A aplicação do teste de Duncan separou os tratamentos 2, 10 e 13 da testemunha (tratamento 1).

TABELA 4. Valores médios para os caracteres germinação (G) em porcentagem; sobrevivência (S) em porcentagem; e estatura (C), em milímetros de plântulas oriundas de sementes pré germinadas de alface (*Lactuca sativa*), tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório (bioteste 5 e 6). 2005.

Tratamentos	G (%)	S (%)	C (mm)
1- Testemunha	77,5 a	100 a	7,0 b
2- Pixirica	7,5 cd	0 g	-
3- Purga-pinhão	12,5 cd	60 de	6,8 b
4- Erva-do-capitão	30 b	72,5 cd	5,6 bc
5- Jambolão	12,5 cd	40 ef	3,9 cde
6- Grevilha-anã	5 cd	82,5 bc	4,8 bcd
7- Hortelã	0 d	0 g	-
8- Pata-de-vaca	0 d	30 efg	2,8 def
9- Açoita-cavalo	15 9	95 ab	10,3 a
10- Fáfia	0 d	0 g	-
11- Fumo-bravo	15 c	27,5 fg	3,3 cdef
12- Chá-de-bugre	2,5 cd	30 efg	3,2 cdef
13- Salva-da-gripe	0 d	0 g	-
14- Terramicina	0 d	12,5 fg	1,1 f
15- Pinus	0 d	17,5 fg	2,0 ef
C. V. %	44,5	29,2	22,8

Valores médios seguidos por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

3.5. Conclusões

Os biotestes realizados neste trabalho permitem fazer uma série de afirmações, a seguir.

- ✓ A alelopatia é regra geral entre as espécies vegetais, sendo que a seleção das mais promissoras deve ter como parâmetros os maiores ou menores efeitos alelopáticos e alguns caracteres específicos, tidos ou supostamente relacionados às respostas das plantas a estresses bióticos.
- ✓ A prospecção de moléculas bioativas, através de testes preliminares de alelopatia também discrimina facilmente extratos vegetais com efeitos alelopáticos positivos e, portanto, promissores como excipientes de compostos bioestimulantes.
- ✓ O presente trabalho permitiu relacionar diversas espécies vegetais alelopáticas, com potencial para serem melhor investigadas no seu potencial biocida, bem como possivelmente contendo compostos bioestimulantes.
- ✓ A simplificação dos bioensaios, como foi possível neste trabalho, conduz à possibilidade de realização dos testes de alelopatia *in loco*, através de laboratório móvel, permitindo a coleta para avaliações mais precisas daquelas espécies mais promissoras, economizando tempo e recursos financeiros.

4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ALELOPÁTICA DE *Cymbopogon citratus* (Stapf.) DC.

Resumo

A busca de moléculas bioativas em espécies vegetais, que atendam às novas exigências da sociedade, em termos de saúde e ambiente, é praticamente uma imposição aos cientistas e revela uma nova etapa de desenvolvimento tecnológico da humanidade. Visando testar o potencial alelopático do capim-cidró (*Cymbopogon citratus* (Stapf.) DC.) foram estabelecidas três séries de experimentos com três bioensaios cada uma, através dos quais foram avaliadas diversas doses (de 1/3 a 1/128, p/v) de extrato aquoso desta gramínea, em laboratório, na Universidade Federal de Santa Maria- UFSM (Santa Maria- RS), no ano de 2003. Como reagentes foram utilizadas sementes a germinar e pré-germinadas de alface (*Lactuca sativa*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e trigo (*Triticum aestivum*). Os nove experimentos constaram, cada um, de cinco doses de extrato aquoso de folhas de *C. citratus*, obtidas da trituração em liquidificador, com água destilada, por dois minutos e posterior filtragem, abrangendo concentrações desde 1/3 (p/v) até 1/128, além da testemunha (água destilada). O delineamento experimental utilizado nos diversos experimentos foi blocos ao acaso, cinco tratamentos, com quatro repetições (fotofase de 14 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$). Cada repetição constou de 16 sementes germinadas (2 a 3 mm de radícula) e a germinar, deitadas sobre papel-toalha embebido de extrato aquoso, com pH corrigido para $5,8 \pm 0,1$, em caixas tipo *germbox* (11cm X 11 cm). Todo

o material utilizado foi adequadamente desinfetado com hipoclorito de sódio e álcool 65°GL. De uma maneira geral, os principais parâmetros biológicos avaliados (germinação em porcentagem, sobrevivência em porcentagem, estatura de plântula em mm, massa seca de raízes em mg e massa seca da parte aérea) foram afetados pelos tratamentos, em menor ou maior grau, caracterizados adequadamente por equações estabelecidas nos modelos polinomial e logístico. Conforme a dose de extrato de *C. citratus* aumentou, houve um incremento na inibição dos caracteres avaliados, com exceção para as doses menores que tenderam a mostrar efeitos horméticos, especialmente para o caráter estatura de plântula e com maior expressão em *L. sativa*. Os biotestes realizados permitem concluir que a espécie *C. citratus* contém, provavelmente, um ou mais compostos bioativos, inclusive com efeitos hormético e herbicida, com potencial de utilização no Manejo Ecológico de Pragas, com o avanço nas pesquisas, principalmente através das áreas de química e biologia molecular.

Abstract

There is demand over the world for pesticide free food and environment. This means that researchers have the challenge to discover new products, socially acceptable and the plants, probably are the main source for getting this goal. Aiming to test the allelopathic potential of *Cymbopogon citratus*, three sets with three bioassays were performed in the laboratory at Universidade Federal de Santa Maria-UFSM (Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil), 2003. Doses of aqueous crude extract of leaves (pH= 5.8 \pm 0.1), ranging from 1/128 to 1/3 (p/v) and the control (distilled water) were tested against seed and seedlings of *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa* and *Triticum aestivum*. The experimental design adopted was the randomized complete block, with five treatments, four

repetitions and 48 seeds or seedlings per treatment (photofase 14 h., $25 \pm 1^\circ\text{C}$). The reagent materials were placed in *germbox* (11cm X 11 cm) on substrate (toilet-paper) containing the extracts. All the main parameters analyzed (germination, survival, shoot length, root and shoot dry matter) declined with the increase of extract dose, adequately characterized by polynomial and logistic equations. Very low doses showed hormetic effects for seedling length, but it was statistically significant just for *L. sativa*. The results permit to conclude there are one or more bioactive compounds in extracts of *C. citratus*, including substances with hormetic and herbicidal effects. These compounds must be separated for testing by new bioassays and probability would be very important on a sustainable agriculture program and as model to elaborate new derivative molecules, as well as for prospecting new resistant genes.

4.1. Introdução

Na busca por moléculas bioativas, socialmente mais adequadas, os vegetais representam um potencial praticamente inesgotável como manancial para a pesquisa científica.

A escolha das espécies vegetais a serem pesquisadas, diante das centenas de milhares à disposição, pode e deve ser facilitada pelo “conhecimento popular”, como o conjunto de informações empíricas acumuladas através de séculos. Se hoje se reconhece a baixa eficiência do método empírico, isto não significa que as conquistas do empirismo tenham pouco valor para a humanidade. Pelo contrário: o método experimental ou científico, bem como outras denominações e conceitos mais modernos, são o resultado dos avanços no conhecimento, proporcionados pelo empirismo, de forma demorada e sofrida através dos tempos.

A utilização de extratos vegetais no controle de pragas (vírus, bactérias, fungos, insetos, ervas daninhas e outras) de plantas é relativamente recente, quando comparado ao uso dos mesmos na medicina humana, cujos relatos remontam à Antigüidade ou mesmo à Pré-história. Isto provavelmente explica porque grande parte dos autores se refere ao termo “plantas medicinais”, mesmo em se tratando de estudar os efeitos de extratos de espécies vegetais no controle de pragas de plantas cultivadas.

Cymbopogon citratus, planta medicinal conhecida mais popularmente no Rio Grande do Sul por capim-cidrô, antes da utilização de herbicidas também nas estradas de ferro, era cultivado em ambos os lados das vias para evitar o avanço da vegetação à volta. É também bastante evidente que onde esta gramínea se instala, na suas proximidades, dificilmente alguma espécie vegetal consegue vingar. A ação do *C. citratus* certamente não é devida apenas a sua capacidade competitiva, mas provavelmente esta deve ser uma espécie fortemente alelopática, em relação a outras espécies.

O trabalho de pesquisa desenvolvido visou avaliar os efeitos de doses de extratos aquosos de *C. citratus* sobre sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), picão-preto (*Bidens pilosa*) e trigo (*Triticum aestivum* L.), em diversos bioensaios em laboratório. Além disso, buscou-se identificar equações que expliquem mais adequadamente os eventos biológicos decorrentes da ação alelopática do extrato de *C. citratus*.

4.2. Revisão de literatura

Os vegetais sintetizam e armazenam um grande número de metabólitos secundários nas suas diversas partes (TAIZ & ZAIGER, 1998; GERSHENZON et al, 2000), com as mais variadas funções, que vão desde a proteção ou resposta a estresses bióticos e abióticos, envolvendo

a mediação de interações ecológicas e até mesmo com atuação no próprio organismo do qual se originam (MALHEIROS & PERES, 2001).

Uma característica importante de muitos metabólitos secundários é sua distribuição relativamente restrita na natureza (MALHEIROS & PERES, 2001), que em alguns casos se limita a espécies ou subespécies únicas. Com raras exceções, os metabólitos secundários, ou agentes aleloquímicos ou alelopáticos têm em comum a sua biossíntese, originada da rota acetato ou chiquimato, ou da combinação destas duas rotas (TAIZ & ZEIGER, 1998; MALHEIROS & PERES, 2001).

Como o conceito atual de alelopatia é bastante abrangente, não mais se limitando apenas a interações planta-planta, mas envolvendo todas as relações com os demais agentes bióticos agressores como vírus, bactérias, fungos e fitófagos (ALMEIDA, 1988; BLUM, 1999; DAKSHINI, 1999; MALHEIROS & PERES, 2001), pode-se postular que os aleloquímicos têm função na sobrevivência dos organismos e, portanto, desempenham papel fundamental no processo evolutivo. Assim, não deve ser surpresa a limitação de determinados agentes alelopáticos a certas espécies vegetais (MALHEIROS & PERES, 2001). Esta condição deve espelhar a própria diversidade biológica e a luta pela sobrevivência do organismo nas interações com as demais espécies dentro de seu ecossistema.

Assim sendo, pode-se afirmar que todas as espécies existentes no Planeta produzem metabólitos secundários de defesa contra agentes externos, do contrário, aquelas que não o fizessem, não estariam mais presentes no cenário da natureza. Se por um lado isto significa existir na natureza uma fonte praticamente inesgotável (BARREIRO, 2001) na busca por novas moléculas praguicidas, por outro lado, dificulta a prospecção de compostos mais promissores, não só por pelo número de espécies existentes, mas também pelo fato de que numa mesma espécie podem ser identificados dezenas e até centenas de metabólitos secundários com as mais variadas funções e mecanismos de ação.

Acrescente-se ainda que as interações entre tais compostos dificultam ainda mais os estudos em alelopatia, já que muitas reações finais de defesa são resultados de reações em cadeia, envolvendo os mais variados compostos. Isto explicaria, pelo menos em parte, a falta de confirmação em bioensaios com extratos vegetais fracionados, de resultados obtidos com extratos brutos, situação muito comum em experimentos (QASEM & HILL, 1989; INDERJIT & DAKSHINI, 1999; CHECHINEL-FILHO & YUNES, 2001; CHON et al., 2003).

Entretanto, mesmo diante de tais limitações, tanto pelo excesso do potencial de biodiversidade, quanto pelas complexas interações entre aleloquímicos, a prospecção de espécies promissoras, como fonte de moléculas novas, atendem às novas exigências da sociedade e da opinião pública, que postula que tais moléculas são mais seguras para a saúde e ambiente (VIEIRA et al., 2001). Isto pode ser facilitado, se for estabelecida uma metodologia que proporcione a obtenção de resultados consistentes em bioensaios com extratos vegetais.

A escolha das espécies vegetais a serem avaliadas geralmente recai nas espécies tidas como plantas medicinais, como ponto de partida. Isto é perfeitamente correto, pois que a comprovação da ação de extratos de plantas na saúde humana ou mesmo as informações de uso popular, no mínimo significam que tais espécies possuem produtos fortemente bioativos (KINGSTON et al., 2000). A bioatividade de tais moléculas inexoravelmente determina a ação na célula, elemento comum a todos os seres vivos. Na célula tais compostos ainda podem ter ação ao nível molecular, inclusive sobre o DNA. Como as espécies (e até mesmo outros subníveis taxonômicos) respondem de maneira diferenciada para diferentes níveis de um agente bioativo, nas plantas medicinais podem ser encontrados importantes compostos com ação herbicida, inseticida, fungicida, bactericida e outras, em função das doses utilizadas, ou mesmo em função de alterações nas moléculas derivadas dos produtos naturais (BRISKIN, 2000; WEDGE & CAMPER, 2000).

Numa primeira fase então, extratos vegetais, em doses únicas, podem ser testados contra espécies reagentes. A partir desses bioensaios, extratos de espécies vegetais mais promissoras podem ser avaliados separadamente, em diversas doses, em experimentos mais avançados, como pré condição ou preparativo para a elaboração de bioensaios com compostos fracionados dos extratos vegetais.

O capim-cidrô, *Cymbopogon citratus* (Stapf.) DC., também conhecido popularmente como capim-cidreira, capim-limão, chá-de-estrada, capim-cidrão, erva-cidreira, citronela-de-java, dentre outras denominações (CASTRO & CHEMALE, 1995), tem sido indicado na medicina popular como analgésico, digestivo, sedativo, calmante, antibacteriano, antifúngico, febrífugo, hipotensor e cólicas em geral (ZANETTI, 1999). Esta condição de antibacteriano e antifúngico e outras, na medicina humana (VIANA et al., 2000; PUATANACHOKCHAIA et al., 2002; PRASHARA et al., 2003; GAZOLA et al., 2004), por si só, já é uma indicação importante para que se teste os extratos desta planta na área agrícola, visando o controle de pragas. Acrescente-se ainda que já foram realizados alguns trabalhos de pesquisa de interesse da área agrônômica, demonstrando a presença de agentes antifúngicos e inseticidas nos extratos de capim-cidrô (ADEGOKE & ODESOLA, 1996; RAJAPAKSE & Van EMDEN, 1997; PALHANO et al., 2004).

No gênero *Cymbopogon* já foram identificados dezenas compostos bioativos, principalmente monoterpenos voláteis, inclusive tóxicos (GERSHENZON et al., 2000;). Além dos componentes tóxicos dos óleos essenciais neste gênero, são encontrados nos extratos aquosos, inclusive de *C. citratus*, taninos e flavonóides (GAZOLA et al., 2004), classes de metabólitos secundários, onde podem estar presentes importantes substâncias de defesa (TAIZ & ZEIGER, 1998). Nos óleos essenciais de muitas plantas do gênero *Cymbopogon*, inclusive de *C. citratus*, está presente o monoterpeno limoneno (LUCKER et al., 2004), conhecido citotóxico com potencial fungicida, inseticida, repelente de insetos e

atraente de inimigos naturais de fitófagos (TAIZ & ZEIGER, 1998; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002).

No óleo essencial de *C. citratus*, o citral, uma mistura de monoterpenos isômeros acíclicos aldeídos geranial e neral (LEWINSOHN et al., 1998), com poder fungicida (PALHANO et al., 2004), participa com 70% do total dos componentes.

Mais recentemente, com os avanços nos estudos sobre alelopatia, tem havido interesse e sucesso na prospecção de compostos herbicidas (COBB, 1992; CHON et al., 2003), tanto no sentido de se identificar moléculas que possam ser precursoras de análogos sintéticos, quanto pela possibilidade que ora se abre, através da engenharia genética, da obtenção de cultivares alelopáticas, capazes de controlar os inços, de forma integrada aos programas de Manejo Ecológico de Pragas.

4.3. Material e métodos

O presente trabalho foi executado durante o ano de 2003, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Maria, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 horas.

Sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), picão-preto (*Bidens pilosa*) e trigo (*Triticum aestivum* L., cv. RS-8) foram submetidas a diversas doses de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*), em nove bioensaios.

Sementes a germinar e pré germinadas foram colocadas sobre papel toalha embebido de extrato corrigido para pH $5,8 \pm 0,2$, em caixas tipo *germbox*. A testemunha constou de água destilada. Caixas, sementes e folhas de capim-cidró para preparação dos extratos, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto. Utensílios e sementes ainda sofreram também desinfecção com álcool 70°, por 15 segundos. As concentrações (p/v) dos extratos aquosos, foram obtidas triturando-se, por

dois minutos, em liquidificador doméstico, as respectivas quantidades de folhas de capim-cidró com água destilada, com posterior filtragem em tecido de algodão descontaminado (hipoclorito de sódio a 5% por um minuto).

Foram determinados o índice de germinação (proporção de sementes que emitiram radícula), índice de sobrevivência (proporção de plântulas que emitiram cotilédones), estatura de plântula em mm, massa seca de raízes e massa seca da parte aérea em mg, obtidos a partir da secagem, por 48 horas, em forno a 65°C. Os valores foram obtidos da média de 16 indivíduos por caixa (repetição) “germbox”.

O delineamento experimental para todos os experimentos foi Blocos ao Acaso com 4 repetições. Cada experimento constou de 15 tratamentos.

Os procedimentos de análise e interpretação de experimentos foram realizados usando o pacote estatístico NTIA/EMBRAPA (Centro de Ciências Rurais- Departamento de Fitotecnia, cedidos pela EMBRAPA 1986, 1988, 1989) para o modelo polinomial; e o pacote estatístico *SigmaPlot*, para o modelo logístico. Os dados para índice de germinação, emissão de cotilédones e sobrevivência, nas análises estatísticas, foram transformados em arco-seno da raiz quadrada da proporção de indivíduos viáveis para o caráter considerado, relativamente ao número inicial de indivíduos testados, igual em todas as parcelas.

Para a consecução dos objetivos propostos foram executados os seguintes experimentos.

Biotestes 1.1, 1.2 e 1.3

Biotestes implementados em 05/06/2004. As sementes foram pré-germinadas com radículas com 3 a 5 milímetros e transferidas para as caixas tipo “germbox”, contendo os tratamentos.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/3 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró

- 3- 1/6 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró
- 4- 1/12 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró
- 5- 1/24 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró

Material reagente: sementes pré germinadas *Lactuca lativa* (bioteste 1.1); sementes pré germinadas de *Bidens pilosa* (bioteste 1.2); sementes pré germinadas de *Triticum aestivum* (bioteste 1.3). As leituras finais foram realizadas aos sete dias da instalação dos experimentos

Biotestes 1.4, 1.5, 1.6

Biotestes implementados dia 10/07/2004. As sementes foram pré-germinadas com radículas com um a três milímetros e transferidas para as caixas germ-box contendo os tratamentos.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/128 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró
- 3- 1/64 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró
- 4- 1/32 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró
- 5- 1/16 (p/v) de extrato aquoso de capim cidró

Material reagente: sementes pré-germinadas de alface, *Lactuca lativa* (bioteste 1.4); sementes pré germinadas de picão-preto, *Bidens pilosa* (bioteste 1.5); sementes pré germinadas de trigo, *Triticum aestivum* (bioteste 1.6). As leituras finais foram realizadas aos sete dias.

As sementes foram pré-germinadas e transferidas para as caixas “germbox” contendo os tratamentos, com radículas com 1 a 3 milímetros.

Biotestes 1.7, 1.8, 1.9.

Os ensaios foram delineados de maneira idêntica, respectivamente, aos biotestes 1.4, 1.5 e 1.6. Estabelecidos também no dia 10/07/2004, os biotestes diferiram dos anteriores pelas avaliações iniciarem a partir de

sementes colocadas a germinar na presença dos tratamentos. As sementes descontaminadas e imediatamente colocadas para germinar em caixas tipo germ-box, contendo os tratamentos, foram mantidas no escuro até completa germinação (48 horas).

4.4. Resultados e discussão

Nas três séries de três bioensaios por cada série, foram obtidos resultados, visando o aprofundamento das questões levantadas nesta fase (tabelas a seguir).

Na primeira série de biotestes, onde sementes pré-germinadas de alface (*Lactuca sativa*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e trigo (*Triticum aestivum*) foram tratadas com extratos aquosos de *Cymbopogon citratus*, nas proporções de 0, 1/24, 1/12, 1/6 e 1/3, são apresentadas apenas as curvas de dose-resposta para os caracteres avaliados em *B. pilosa*. Isto porque para *L. sativa* apenas 4,7% das plântulas sobreviveram na dose menos concentrada (Tabela 1) e para *T. aestivum*, mesmo que os valores médios não tenham sido tão baixos, para os dois tratamentos com doses mais concentradas, os índices de sobrevivência apresentaram valor zero, tornando nulos os demais caracteres analisados (Tabela 3). Isto torna desnecessária a elaboração de curvas de dose-resposta e demonstra a alta sensibilidade da alface, como sugere a literatura (BLUM, 1999; ELAKOVITCH, 1999), ao mesmo tempo em que evidencia o alto poder citotóxico do extrato de capim-cidró, que levou à mortalidade total de plântulas nas primeiras 24 horas, nas doses de 1/12, 1/6 e 1/3. Este relativo alto grau de toxicidade já era previsível, não só pelas características já determinadas em outras espécies do mesmo gênero *Cymbopogon* (RAJAPAKSE et al., 1997; RAJA et al., 2002; PRASHARA et al., 2003), como também a partir de alguns trabalhos já realizados com *Cymbopogon citratus* (ADEGOKE & ODESOLA, 1996; VIANA et al., 2000;

PUATANACHOKCHAI et al., 2002; GAZOLA et al., 2004; PALHANO et al., 2004).

Para *B. pilosa*, os decréscimos no caráter sobrevivência foram mais evidentes somente nas doses de 1/6 e 1/3 (Tabela 2). Os demais caracteres foram bastante afetados, com maiores evidências para estatura e massa seca de raízes de plântulas. As curvas de dose-resposta para os caracteres sobrevivência, estatura, massa seca de raízes e massa seca da parte aérea são apresentadas, respectivamente, na Figura 1, Figura 2, Figura 3 e Figura 4. Como pode ser observado, todas as curvas são bastante semelhantes, explicando adequadamente a inibição provocada, conforme aumentou a concentração do extrato de capim-cidró. Tanto o modelo polinomial quanto o modelo logístico parecem explicar os efeitos inibitórios das diversas doses de *C. citratum*, tanto que em nenhum caso foram obtidos coeficientes de regressão abaixo de 90%.

TABELA 1. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), submetidas a doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S**	C**	MR**	MA**
0	100,0	14,2	3,9	12,2
1/24	4,7	0,5	0,3	0,4
1/12	0,0	-	-	-
1/6	0,0	-	-	-
1/3	0,0	-	-	-
CV%	12,8	32,1	56,9	19,8

**F-teste tratamentos significativo a 1%

TABELA 2. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de picão-preto (*B. pilosa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S**	C**	MR**	MA**
0	100,0	23,6	3,2	9,4
1/24	100,0	14,2	2,0	8,0
1/12	96,9	8,8	1,8	7,6
1/6	59,4	5,4	0,8	4,0
1/3	46,9	3,6	0,8	3,5
CV%	9,8	12,3	22,6	19,1

** F-teste tratamentos significativo a 1%

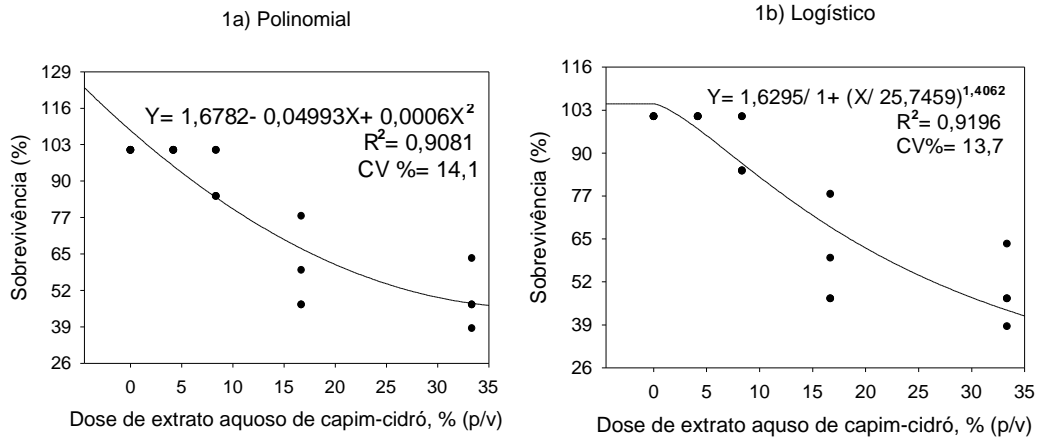


Figura 1. Curva de resposta (modelos polinomial e logístico) da sobrevivência em porcentagem, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

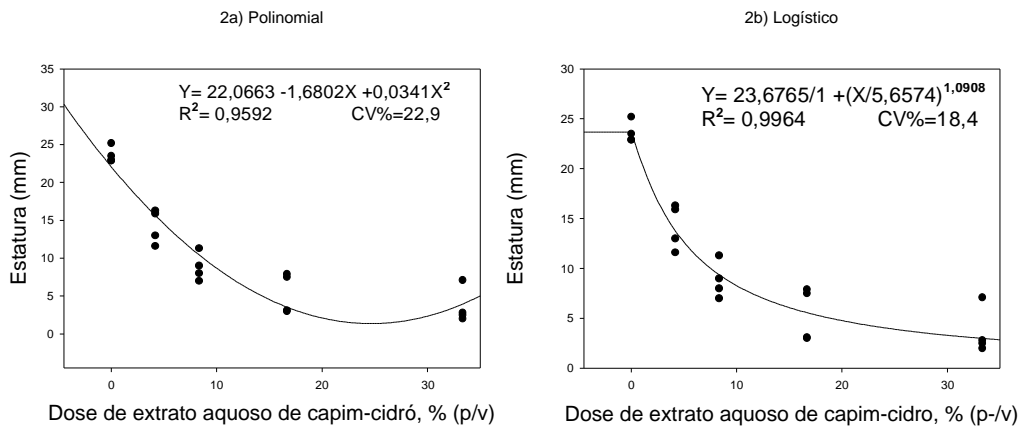


Figura 2. Curvas de resposta (modelos polinomial e logístico) da estatura em mm, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

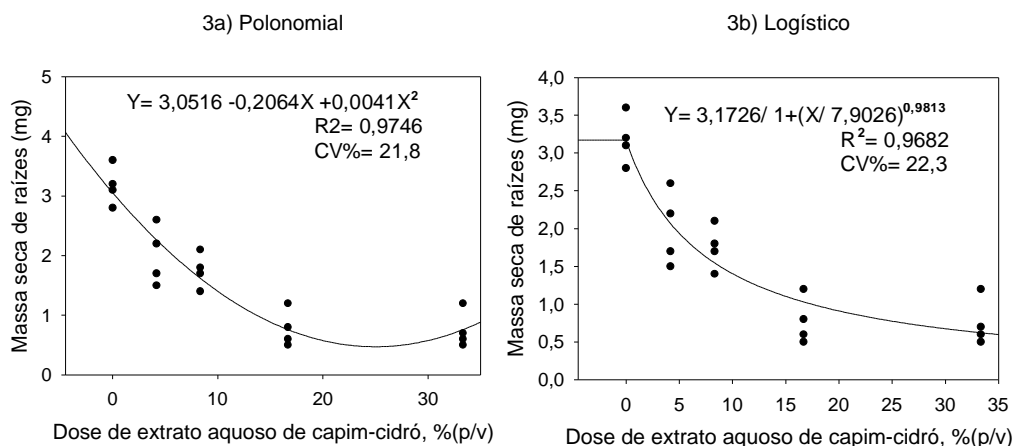


Figura 3. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca de raízes em mg, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

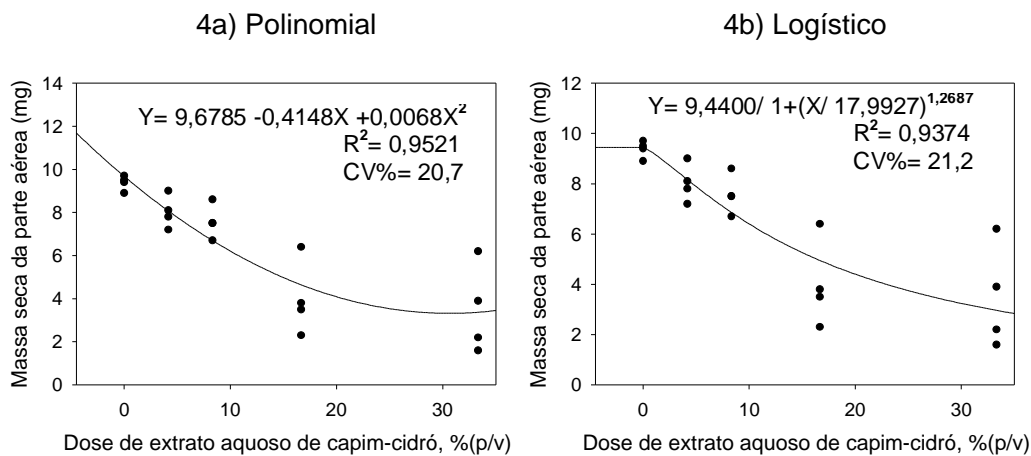


Figura 4. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca da parte aérea em mg, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

TABELA 3. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S**	C**	MR**	MA**
0	100,0	115,9	55,0	93,5
1/24	100,0	24,8	29,4	26,7
1/12	17,2	4,3	2,3	6,3
1/6	0,0	-	-	-
1/3	0,0	-	-	-
CV%	2,1	16,9	31,9	16,3

**F-teste tratamentos significativo a 1%

Na segunda série de bioensaios, desenvolvidos de forma similar aos anteriores, foram testadas as doses de 0, 1/128, 1/64, 1/32 e 1/16 de extrato aquoso de capim-cidró, a partir dos quais foram possíveis o estabelecimento de curvas de dose-resposta.

Para *L. sativa* são evidentes os decréscimos nos valores médios para os caracteres sobrevivência, massa seca de raízes e massa seca da parte aérea, conforme aumenta a concentração do extrato aquoso de capim-cidró (Tabela 4). Para o caráter estatura de plântula pode ser observado a ocorrência do fenômeno denominado de hormese, conceituado como o estímulo de um ou mais caracteres sob baixas concentrações de um agente tóxico (FORBES, 2000) e constatado por diversos autores (SCHABENBERGER et al., 1999; WAGNER et al., 2003; HUNT & BOWMAN, 2004; NICOLA et al., 2004; PEREIRA et al., 2004). A indução do crescimento de plântula com a dose de 1/128 foi evidenciada pelo teste de Duncan 5%, relativamente à testemunha.

Com exceção para o caráter estatura (Figura 6), as equações polinomiais e logísticas para plântulas de alface também se assemelharam bastante, explicando os decréscimos dos caracteres sobrevivência (Figura 5), massa seca de raízes (Figura 7) e massa seca da parte aérea (Figura 8), com coeficientes de regressão acima dos 90%. Para o caráter estatura de plântula, no modelo polinomial, somente a equação cúbica se ajustou, mas não explica biologicamente o caráter, como pode ser observado na Figura 6, 6a. Esta situação parece ter sido resultante do efeito hormético da dose 1/128 de extrato. O modelo logístico explicou melhor, mas resultou num coeficiente de variação maior. Em situações como estas, alguns autores têm recomendado o uso de modelos matemáticos que incluam os efeitos horméticos em equações logísticas (BRAIN & COUSENS, 1989; SCHABENBERGER et al., 1999). A ocorrência de efeitos horméticos e reações similares aos bioensaios com herbicida, sugere a existência de compostos herbicidas no extrato de

capim-cidr . Entretanto, a hormese pode ocorrer também com inseticidas, fungicidas e outros organismos (NICOLA et al., 2004; PEREIRA et al., 2004).

TABELA 4. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de alface (*L. sativa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidr  (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S**	C**	MR**	MA**
0	100,0	9,2 b	4,5	11,2
1/128	81,2	14,4 a	3,5	9,1
1/64	79,7	12,0 ab	3,1	8,6
1/32	18,8	2,2 c	0,4	1,2
1/16	6,3	0,1 c	0,1	0,1
CV%	13,1	23,9	22,5	17,8

** F-teste tratamentos significativo a 1%

Médias, na mesma coluna, seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan 5%.

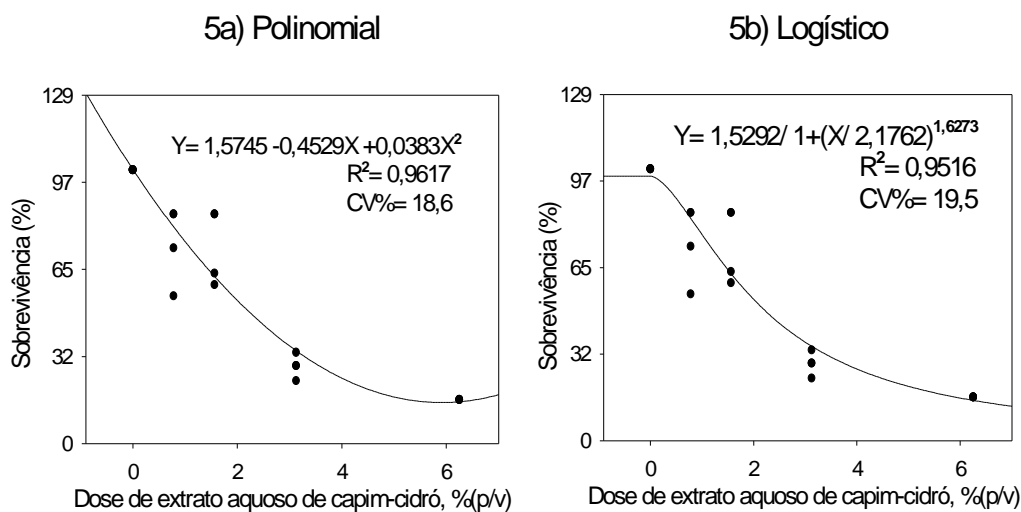


Figura 5. Curva de resposta (modelos polinomial e logístico) da sobrevivência em porcentagem, aos sete dias, de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

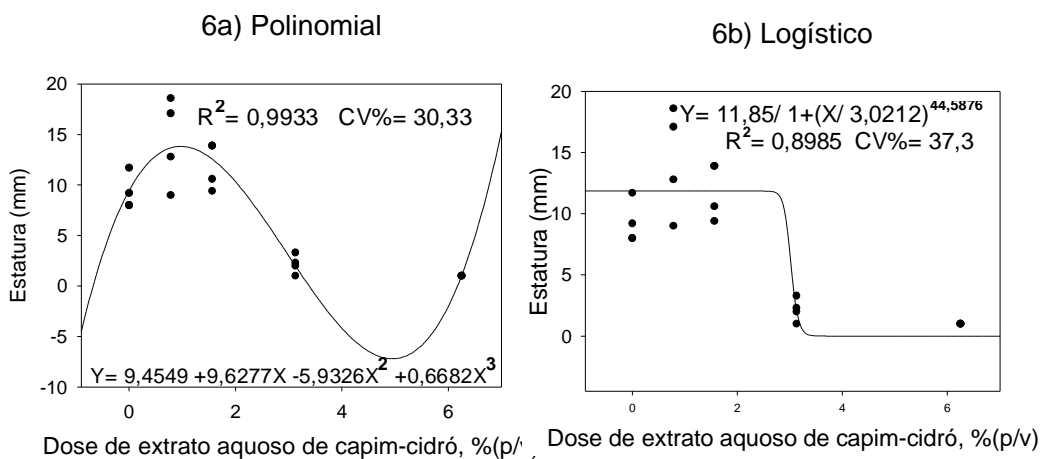


Figura 6. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da estatura em mm, aos sete dias, de plântulas de alface (*Lactuca lativa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

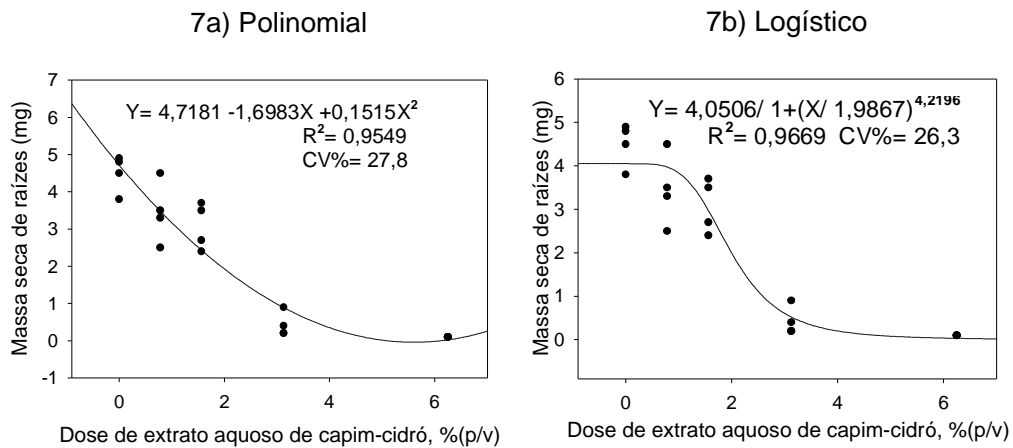


Figura 7. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca de raízes em mg, aos sete dias, de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

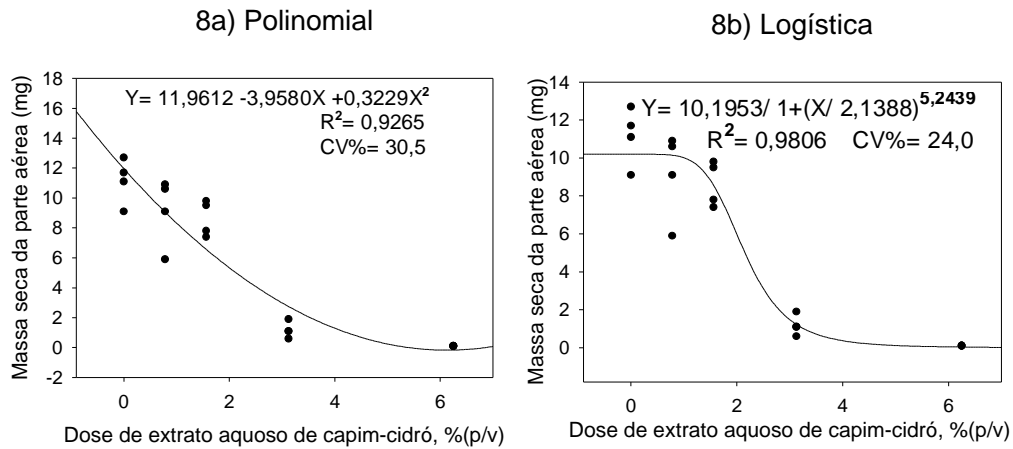


Figura 8. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca da parte aérea em mg, aos sete dias, de plântulas de alface (*Lactuca sativa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

Para *B. pilosa* (Tabela 5) o caráter sobrevivência de plântulas não foi afetado por nenhuma dose de extrato aquoso de capim-cidrô. Para os demais caracteres, houve inibição significativa, com o aumento das doses. O caráter estatura de plantas foi afetado significativamente apenas pela dose de 1/16 e o efeito hormético, apesar dos valores mais altos, principalmente determinados pela dose 1/64, não apresentaram significância estatística em relação à testemunha. Isto provavelmente ocorreu devido a menor sensibilidade do picão-preto, em relação aos caracteres analisados, em resposta ao extrato de capim-cidrô. De uma maneira geral as equações polinomiais (quadrática e linear) e logísticas conseguiram explicar matematicamente os decréscimos da estatura de planta (Figura 9), massa seca de raízes (FIGURA 10) e massa seca da parte aérea (Figura 11).

TABELA 5. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de picão-preto (*B. pilosa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S ^{NS}	C ^{**}	MR*	MA ^{**}
0	98,4	23,9 a	3,7	9,0
1/128	96,9	25,2 a	2,8	7,3
1/64	95,3	26,8 a	2,7	6,1
1/32	92,2	25,1 a	2,8	5,1
1/16	93,8	15,8 b	2,1	5,4
CV%	8,2	11,6	20,5	15,4

^{NS}F-teste tratamentos não significativo a 5%; *F-teste significativo a 5%; **F-teste significativo a 1%. Médias, na mesma coluna, seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan 5%.

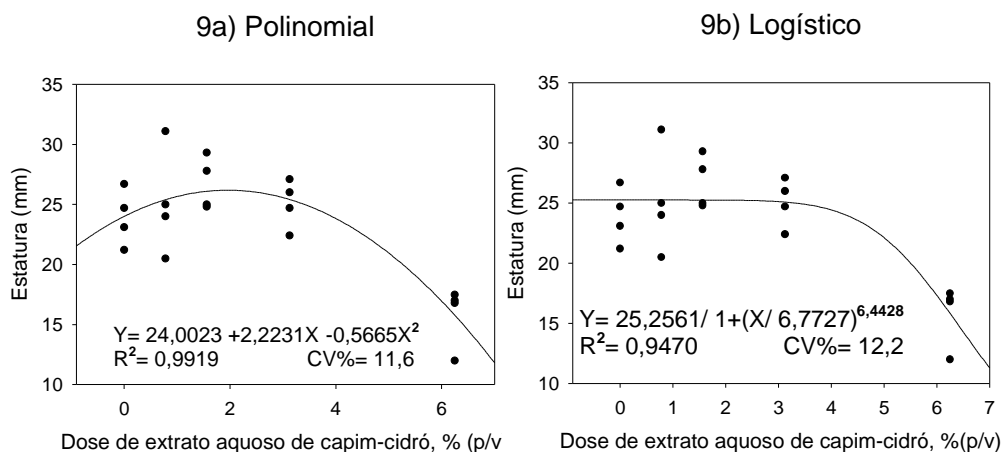


Figura 9. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da estatura em mm, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

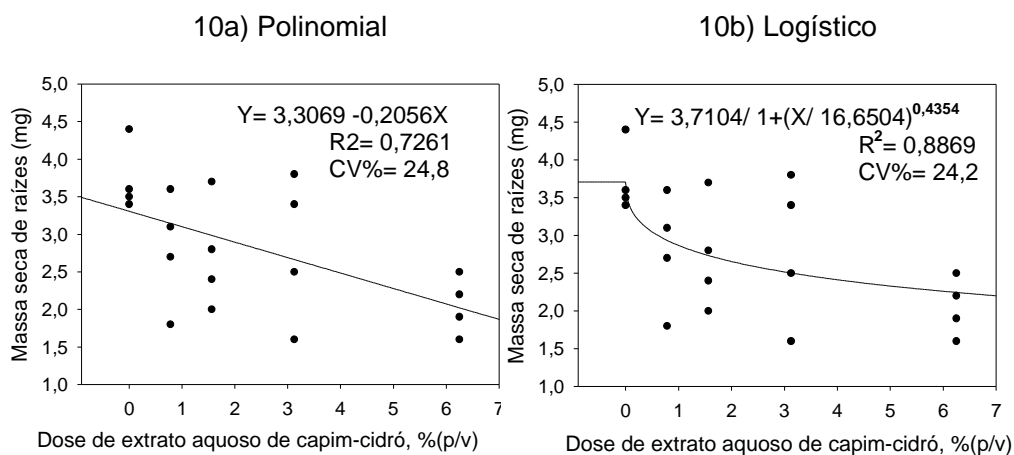


Figura 10. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca de raízes em mg, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

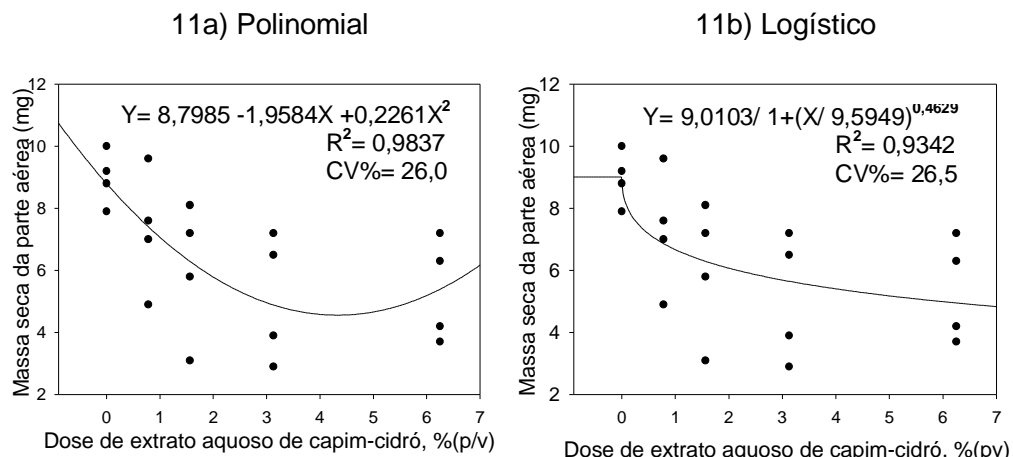


Figura 11. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca da parte aérea em mg, aos sete dias, de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

Para *T. aestivum* os tratamentos promoveram diferenças muito significativas para todos os caracteres estudados (Tabela 6) e tanto as equações polinomiais, quanto as logísticas explicaram matematicamente as variações dos caracteres sobrevivência (Figura 12), estatura (Figura 13), massa seca de raízes (Figura 14) e massa seca da parte aérea (Figura 15). Neste bioensaio não foi observado nenhum efeito hormético sobre qualquer caráter avaliado.

TABELA 6. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S**	C**	MR**	MA**
0	100,0	116,8	45,5	80,6
1/128	98,4	109,8	40,9	77,1
1/64	95,3	92,4	35,1	71,6
1/32	90,6	55,8	23,8	42,5
1/16	93,8	32,2	19,6	28,2
CV%	7,6	8,4	12,2	14,4

** F-teste tratamentos significativo a 1%.

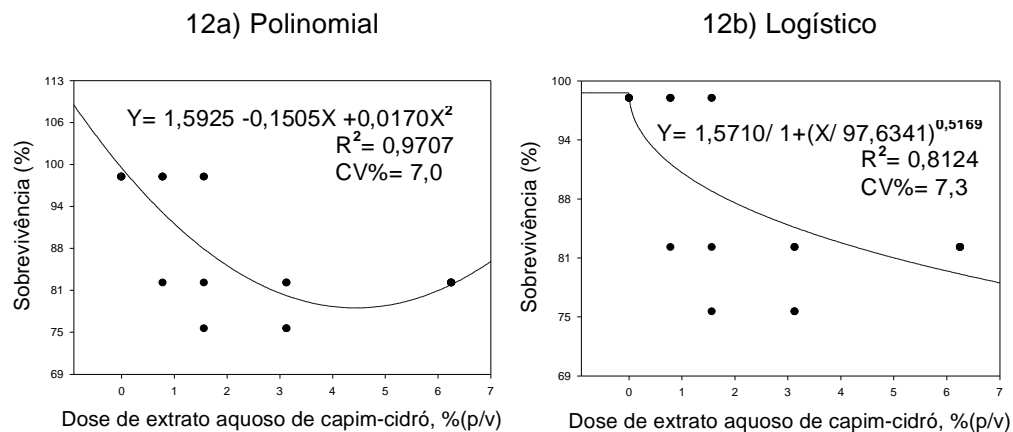


Figura 12. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da sobrevivência em porcentagem, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

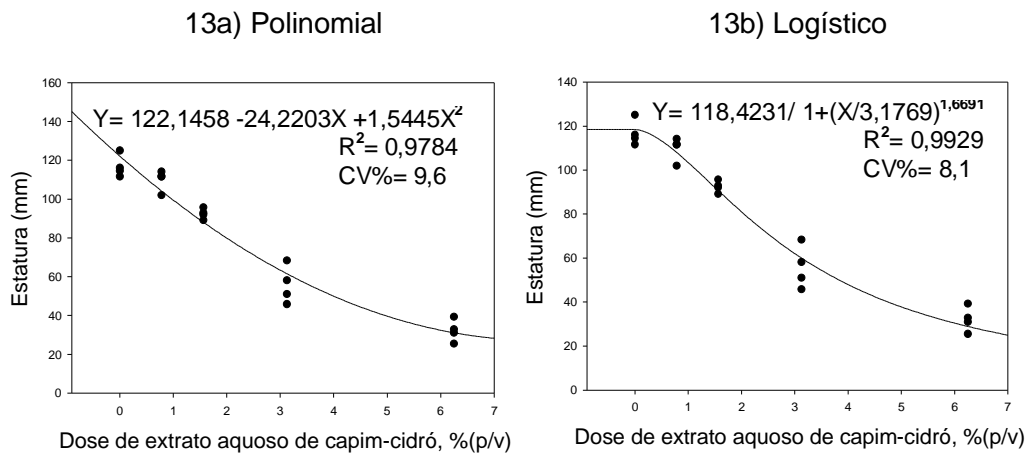


Figura 13. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da estatura em mm, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

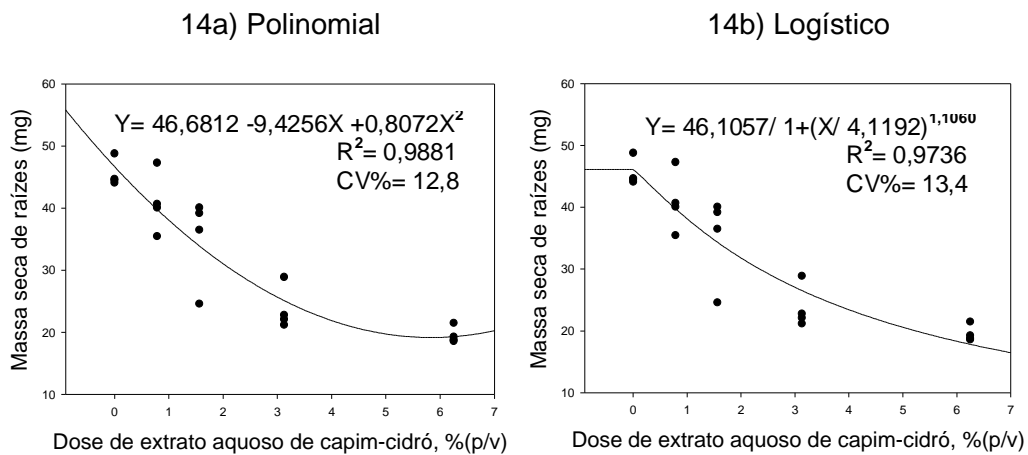


Figura 14. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca de raízes em mg, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

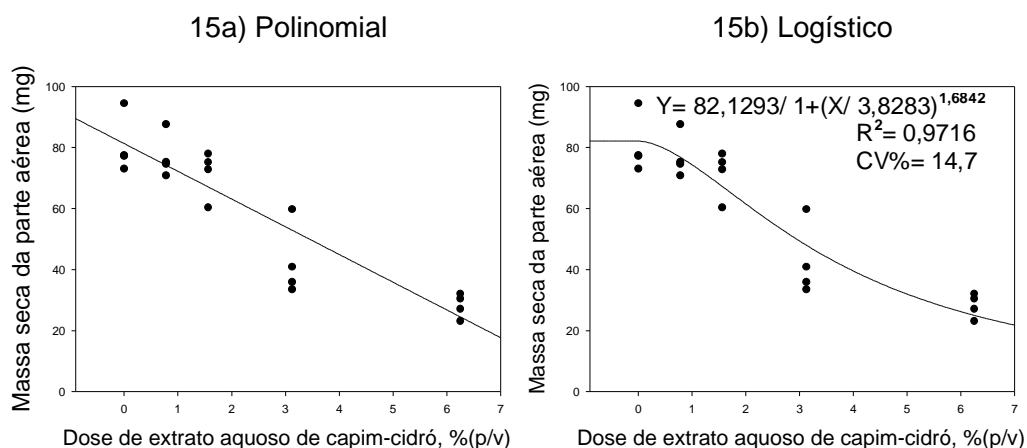


Figura 15. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca da parte aérea em mg, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

Na terceira série de bioensaios, sementes de alface, picão-preto e trigo foram submetidas, desde a germinação, às diversas doses de extrato aquoso de capim-cidró. Somente para a espécie reagente *T. aestivum*, que proporcionou, provavelmente pela sua maior pureza genotípica, o estabelecimento de experimentos mais precisos, houve significância estatística para os caracteres avaliados (Tabela 9); com exceção para o índice de sobrevivência. Os modelos polinomiais e logísticos parecem explicar satisfatoriamente o comportamento dos caracteres germinação (Figura 16), estatura (Figura 17), massa seca de raízes (Figura 18) e massa seca da parte aérea (Figura 19) para sementes e plântulas de trigo.

Para as espécies reagentes *L. sativa* (Tabela 7) e *B. pilosa* (Tabela 8), as condições dos experimentos não permitiram separar estatisticamente os tratamentos para quaisquer dos caracteres analisados. Para a alface, além das respostas relativamente menores, o experimento foi pouco preciso, apresentando coeficientes de variação relativamente elevados, quando comparados com experimentos realizados a partir de sementes

pré-germinadas. Dois fatores devem estar envolvidos neste caso: a desuniformidade das sementes de alface utilizadas no experimento e a desativação de compostos dos extratos aplicados antes, sobre as sementes, e à disposição das plântulas somente após a germinação. O processo de oxidação, por exemplo, tanto pode aumentar quanto reduzir os efeitos dos compostos alelopáticos e as interações entre os componentes do extrato são fatores importantes de variação (INDERJIT & DAKSHINI, 1999; WALLER et al., 1999). A uniformidade de ensaios a partir de sementes pré-germinadas certamente é resultado da seleção visual que é feita durante a elaboração dos experimentos. Para a espécie reagente picão-preto, a situação é bem mais evidente, pois a desuniformidade, representada por coeficientes de variação acima de 50%, praticamente inviabilizou o experimento realizado a partir de sementes a germinar. Tratando-se de uma erva daninha com variabilidade genética provavelmente muito alta, pois não foi submetida à seleção artificial, encontrou-se dificuldades para montar experimentos uniformes mesmo a partir de sementes pré-germinadas. Isto implica em reconhecer que efeitos de extratos sobre plântulas e sobre germinação de sementes são melhor avaliados em bioensaios diferentes.

TABELA 7. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de alface (*L. sativa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	G^{ns}	S^{ns}	C^{ns}	MR^{ns}	MA^{ns}
0	82,8	65,6	24,4	3,1	9,3
1/128	64,1	62,5	27,4	2,7	7,5
1/64	79,7	71,9	23,2	2,6	9,1
1/32	76,6	71,9	27,2	1,9	7,9
1/16	76,6	60,9	16,2	1,8	6,6
CV%	20,0	28,9	26,2	32,1	17,6

^{ns} F-teste tratamentos não significativo a 5%.

TABELA 8. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de picão-preto (*B. pilosa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose(p/v)	G^{ns}	S^{ns}	C^{ns}	MR^{ns}	MA^{ns}
0	34,4	32,8	24,2	0,8	3,0
1/128	20,3	21,9	26,1	0,3	1,5
1/64	17,2	25,0	20,3	0,4	1,5
1/32	25,0	17,2	18,0	0,1	1,0
1/16	23,4	20,3	28,5	0,4	1,4
CV%	43,8	40,8	32,9	89,6	86,3

^{ns}F-teste tratamentos não significativo a 5%.

TABELA 9. Valores médios, aos 7 dias, para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco de capim cidró (*C. citratus*), em laboratório. 2005.

Dose (%)	G*	S^{ns}	C**	MR**	MA**
0	90,6	98,3	146,0 ab	60,8	108,0
1/128	90,6	98,3	151,2 a	56,8	112,8
1/64	87,5	98,2	141,3 ab	45,7	108,6
1/32	85,9	98,2	132,7 bc	44,5	103,6
1/16	67,2	100,0	122,3 c	29,2	74,4
CV%	11,8	8,3	6,3	10,4	12,5

^{ns} F-teste tratamentos não significativo a 5%; *F-teste significativo a 5%; ** F-teste significativo a 1%.

Médias, na mesma coluna, seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan 5%.

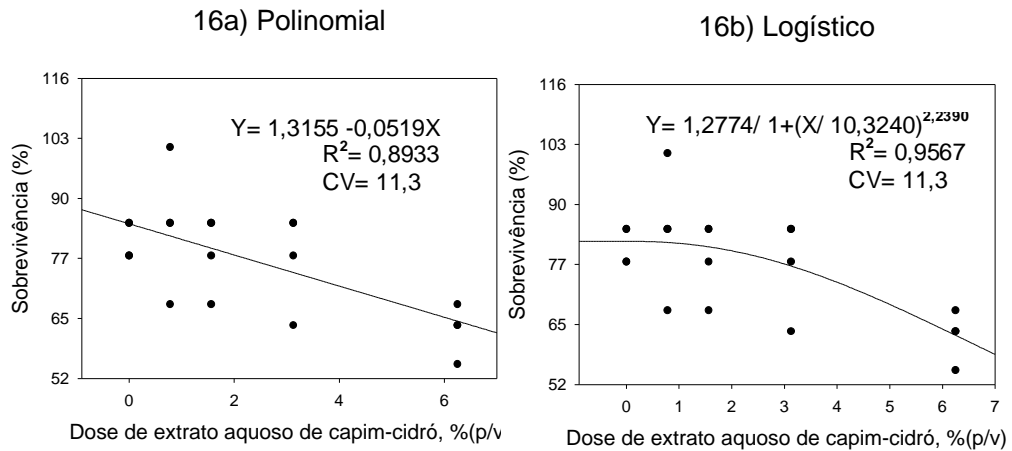


Figura 16. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da germinação em porcentagem, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

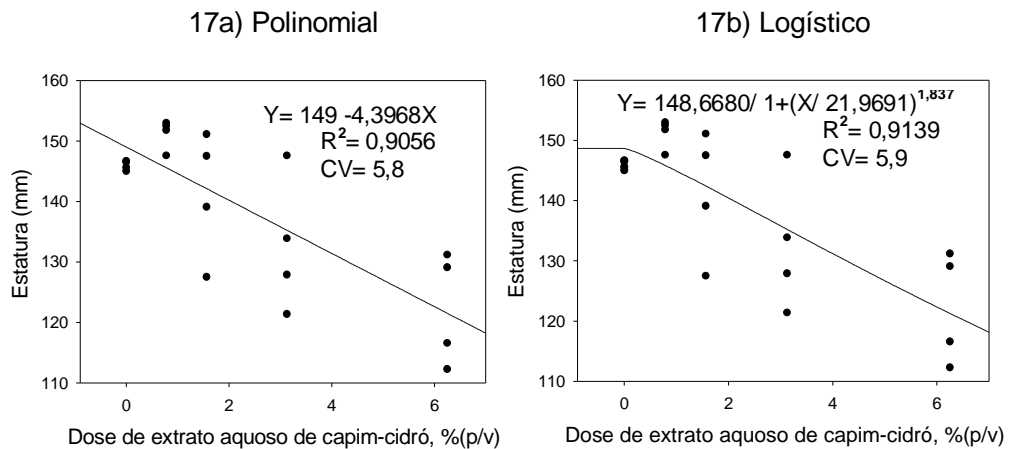


Figura 17. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da estatura em mmm, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidrô (*Cymbopogon citratus*). 2005.

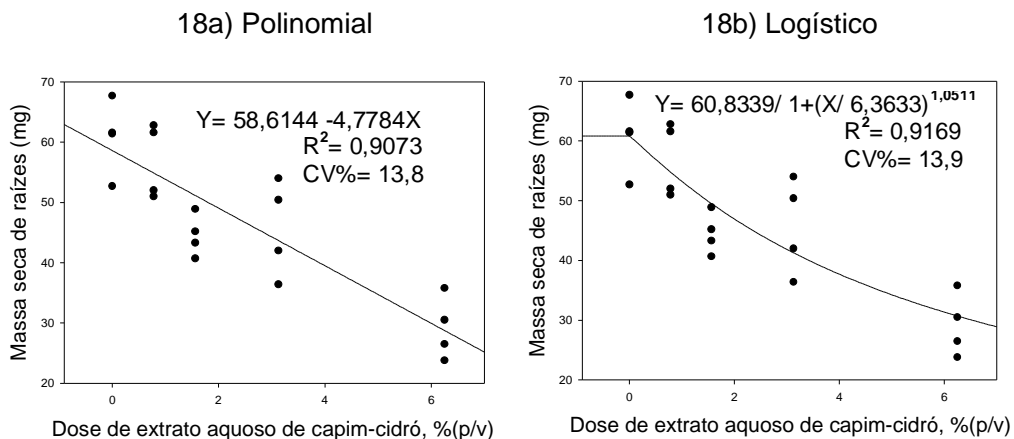


Figura 18. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca de raízes em mg, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

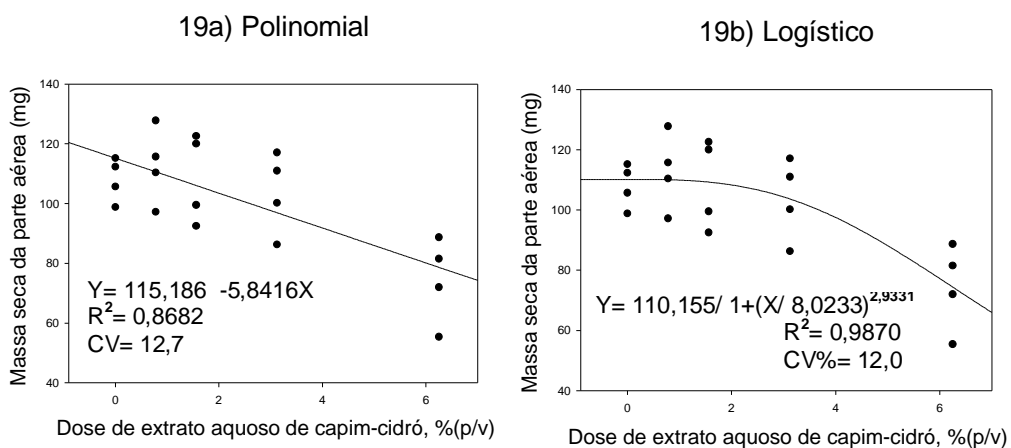


Figura 19. Curvas de resposta (modelo polinomial e logístico) da massa seca da parte aérea em mg, aos sete dias, de plântulas de trigo (*Triticum aestivum*), para doses (p/v) de extrato aquoso de capim-cidró (*Cymbopogon citratus*). 2005.

Apesar de aparentemente menos sensível do que a alface, o trigo pode ser um reagente muito interessante, pela maior uniformidade demonstrada nos bioensaios, possibilitando a obtenção de experimentos mais precisos, expressados por coeficientes de variação relativamente baixos. Entretanto, a inegável sensibilidade apresentada pela espécie reagente *L. sativa* leva a se buscar populações mais uniformes para a realização de bioensaios, como o caminho mais adequado. Se no comércio de sementes isto parece ser difícil, provavelmente a seleção de linhagens puras direcionadas para bioensaios deve ser a solução mais viável.

A maioria dos autores que trabalha com herbicidas utiliza o modelo matemático logístico por considerá-lo mais eficiente (SEEFELDT, 1995; SCHABENBERGER et al., 1999; SOUZA et al., 2000; KRUSE, 2002), na determinação de curvas de dose-resposta. Devido a semelhança de bioensaios de alelopatia com os experimentos de herbicida, optou-se por utilizar neste trabalho os dois modelos (polinomial e logístico), visando facilitar futuros trabalhos. Não houve evidências suficientes para se afirmar que o modelo logístico é mais eficiente que o polinomial nas condições dos experimentos realizados, quando se comparam nas figuras coeficientes de regressão e de variação. Entretanto, equações polinomiais de terceiro grau, apesar de se ajustarem melhor matematicamente, apresentaram muita discrepância, sugerindo a realização da análise da regressão somente a partir da equação polinomial quadrática. Visto por este lado, a equação logística seria mais recomendada pela maior rapidez das análises estatísticas. No presente trabalho os dados se ajustaram melhor à equação logística com três parâmetros, como foi utilizada por SOUZA et al., 2000, comparativamente com a equação de quatro parâmetros, utilizada por SEEFELDT (1995) e KRUSE (2002) .

Cymbopogon citratus, conhecido mais popularmente no Rio Grande do Sul por capim-cidró, antes da utilização de herbicidas também nas

estradas de ferro, era cultivado em ambos os lados das vias para evitar o avanço da vegetação à volta. É também bastante evidente que onde esta gramínea se instala, na suas proximidades, dificilmente alguma espécie vegetal consegue vingar. A ação do *C. citratus* certamente não é devida apenas a sua capacidade competitiva, mas provavelmente esta deve ser uma espécie fortemente alelopática, em relação a outras espécies. Assim, os resultados obtidos ratificam plenamente tais observações tidas como de conhecimento popular.

4.5. Conclusões

Os resultados obtidos nos experimentos permitem as seguintes conclusões.

✓ O extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* provavelmente contém um ou mais compostos, que promoveram efeitos significativos em bioensaios com as espécies reagentes *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa* e *Triticum aestivum*, que podem ser promissores como agentes no controle de pragas das plantas.

✓ A ocorrência do fenômeno da hormese apontou para a presença de compostos estimulantes do crescimento em doses baixas e, portanto, altamente bioativos.

✓ O extrato de *C. citratus* provavelmente contém um ou mais compostos herbicidas, possibilidade sustentada pela ocorrência do fenômeno hormético no trabalho e a similaridade das curvas de dose-resposta com experimentos com herbicidas, aliadas à utilização prática de *C. citratus* como planta alelopática para outras espécies.

5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE MARCELA, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC

Resumo

Visando avaliar a bioatividade do extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*), foram instalados 11 bioensaios no Laboratório de Fisiologia Vegetal (fotofase 14 h., $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS), no período de abril a novembro de 2003. Como reagentes, sementes a germinar e pré germinadas de alface (*Lactuca sativa*), picão-preto (*Bidens pilosa*) e trigo (*Triticum aestivum*) foram colocadas em caixas tipo *germbox*, sobre papel toalha embebido com as respectivas doses de extrato, inclusive a testemunha (água destilada), com pH corrigido para $5,8 \pm 0,2$. Em dez experimentos, em blocos ao acaso com 4 repetições, as doses, em número de cinco, variaram de 1/3 a 1/24 (p/v), em seis bioensaios; e de 1/16 a 1/128, em quatro biotestes, mais a testemunha (0). Num ensaio, com dose constante de marcela (1/16, p/v), em fatorial 2x6, com 4 repetições, sementes germinadas em água destilada e solução nutritiva para hidroponia em *L. sativa* (material reagente), foram tratadas, com seis combinações diferentes, no dia de instalação do ensaio, 5 dias e 10 dias após. Para a persecução dos objetivos foram analisadas: germinação, sobrevivência, estatura de plântula, massa seca de raízes, massa fresca da parte aérea e massa seca da parte aérea. Evidenciou-se que o caráter estatura de plântula foi estimulado, ora por doses crescentes, ora por concentrações decrescentes de extrato de marcela, refletindo-se geralmente nos caracteres massa seca de raízes e

massa seca da parte aérea, configurando-se a presença de fatores indutores e inibidores de crescimento. Doses crescentes e decrescentes de extrato também afetaram positivamente a sobrevivência de plântulas sob condições de estresse térmico. Os resultados obtidos no experimento em solução nutritiva com dose única de extrato, foram condizentes com aqueles extraídos dos bioensaios simples com doses de marcela. Assim, permite-se concluir que o extrato de *A. saturoioides* contém compostos bioativos, com potencial bioestimulante, inibidor do crescimento e com ação protetora contra estresse ambiental, informações que remetidas a outras áreas afins de pesquisa, podem prestar auxílio inestimável na busca por uma agricultura mais sustentável.

Abstract

The bioactivity of *Achyrocline saturoioides*, through their aqueous extracts was studied in the laboratory (fotofase 14 h., $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$) at Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil), from April to November 2003. Diverse doses of dried flowers from *A. saturoioides* in water (p/v) were applied on seed and seedlings of *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa* and *Triticum aestivum*, in *germbox* (11cm X 11 cm) on substrate (toilet-paper) containing the extracts (20 mL). In ten experiments (randomized complete block, with five treatments and four repetitions) doses ranged from 1/3 to 1/24 (five bioassays) and from 1/16 to 1/128 (six tests) and the control (distilled water). In another bioassay (factorial 2X6), with constant dose (1/16, p/v), seeds of *L. sativa* were germinated in water and nutritive solution (lettuce hydroponics solution) in six different combinations. For getting the objectives were measured and analyzed the germination, survival, seedling length, root and shoot dry and wet matter and other characters. The more evident differences occurred with the character seedling length, sometimes stimulated by increasing doses,

sometimes by decreasing doses, depending on synergic and antagonistic interaction of factors present. Generally the effects on seedling length reflected in the characters root dry matter shoot dry and wet matter. The extract of *A. saturoioides* also showed protective action on seedlings survival under thermal stress. In the experiment with nutritive solution the characters performance were similar to other bioassays and this methodology proved to be useful when it's necessary to prolong the collecting of data. Finally it's permitted to conclude that *A. saturoioides* is a source of bioactive compounds with stimulatory, protective and inhibitory action.

5.1. Introdução

O esgotamento do potencial das tecnologias atuais, ditas convencionais, e a degradação ambiental generalizada impõem à humanidade esforços cada vez maiores, no sentido de encontrar soluções que não somente contribuam para a preservação do ambiente, como também sejam fatores de recuperação, condição *sine qua non* para alcançar o novo patamar de evolução tecnológica e social. Apesar do surgimento de novas moléculas de defensivos agrícolas menos tóxicas e menos agressivas ao ambiente, a quantidade e a área de aplicação dos mesmos e dos agroquímicos em geral aumentou de uma forma muito significativa nos últimos anos, comprometendo ainda mais o ecossistema, com uma maior intensidade em problemas de toxicidade, acúmulo de resíduos e resistência das pragas (CARVALHO, 1999).

A busca por novas moléculas na natureza, que possam reverter a crescente degradação ambiental tem ocorrido em todos os sentidos, mas convergindo sempre para a meta principal que é a de prover a humanidade com novas tecnologias menos agressivas à natureza e, por conseguinte, aos seres vivos, inclusive o homem. Estudos na área de

alelopatia certamente contribuirão muito para se alcançar tais objetivos (DAKSHINI, 1999), na busca por uma agricultura sustentável.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a bioatividade do extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*), através de biotestes de alelopatia, com sementes e plântulas de alface, picão-preto e trigo, como material reagente. Além da possibilidade de sugerir material para estudo em áreas como a da química e biologia molecular, esta pesquisa ainda procurou levantar a possibilidade de utilização direta de extratos brutos frescos de marcela na agricultura familiar, a partir de testes de campo a serem efetivados.

5.2. Revisão de literatura

De uma forma ou de outra, todas os seres vivos são capazes de produzir substâncias que inibem o crescimento de seus competidores. Em algumas, entretanto, esta capacidade se sobressai das demais, quando a produção desses metabólitos secundários resulta em forte interferência nos processos de crescimento e desenvolvimento.

Relações de interferência entre plantas são agrupadas na denominação geral de alelopatia (RAVEN et. al., 2000). Na agricultura os efeitos alelopáticos já tem sido aplicados há algum tempo, tanto no sentido da precaução, como dos benefícios do fenômeno.

Se o termo alelopatia, quando foi criado, referia-se às relações entre plantas e entre microorganismos, atualmente já tem havido uma generalização no sentido de uma maior abrangência na denominação, já que uma planta não compete apenas com outra, mas há um envolvimento geral no ambiente, onde entre os competidores estão também os insetos, os ácaros, os fungos, as bactérias, os vírus e outros. Muitas vezes um mesmo metabólito secundário pode servir como mecanismo de defesa para mais de um agente biótico de estresse, já que diversos fatores

agressores externos são capazes de ser percebidos por um mesmo receptor, gerando uma cascata de sinais no processo de regulação gênica, para a ativação de um fator de transcrição (TAIZ & ZAIGER, 1998).

As pesquisas recentes sobre alelopatia na agricultura têm se voltado principalmente para esta questão: a descoberta de moléculas orgânicas que possam vir a substituir ou associar-se aos agroquímicos convencionais e que estejam mais em consonância com as exigências atuais dos modernos conceitos de biossegurança.

O conceito moderno de alelopatia abrange, além dos mecanismos de defesa da planta em função da presença de predadores e competidores, as relações de sinergismo (BLUM, 1996; DAKSHINI, 1999; CHECHINEL-FILHO & YUNES, 2001), representadas por aleloquímicos produzidos por certas espécies e capazes de induzir crescimento noutras espécies ou a ativação de qualquer característica que signifique melhoria na adaptação destas últimas ao ambiente.

As plantas produzem suas substâncias de defesa quando atacadas, como resultado do processo de expressão gênica (TAIZ & ZAIGER, 2002), porém tais metabólitos secundários podem estar presentes, como produto gênico de expressão constitutiva. Assim como algumas plantas produzem fitoalexinas, outras produzem taninos, e outras, substâncias fenólicas, que parecem desempenhar um papel semelhante na natureza (RAVEN et. al., 2000), mesmo que estes últimos sejam geralmente de defesas estáticas, ou seja, sempre presentes nas partes da planta onde eles ocorrem. Certamente é também comum na natureza a produção de metabólitos de expressão constitutiva com efeitos alelopáticos positivos, mesmo porque no conjunto de estratégias das plantas se inclui também os efeitos indutivos ou positivos sobre outros organismos que interagem no ecossistema. Assim, pode-se afirmar que, além da complexidade das moléculas contidas nos extratos vegetais, o número de compostos certamente é bastante numeroso (WILLIS, 1985; ALMEIDA, 1988; TAIZ &

ZAIGER, 1998; MONGE, 2001; YUNES & CECHINEL FILHO, 2001), tornando exaustivos os trabalhos nesta área para que se possa chegar a resultados consistentes.

Em geral, resultados de experimentos conduzidos em laboratório são o primeiro passo na identificação dos mecanismos do comportamento de plantas, que podem envolver alelopatia (BLUM, 1999), fornecendo subsídios para que tais agentes alelopáticos possam ser isolados e identificados.

A espécie marcela ou macela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, é uma das mais conhecidas na medicina popular, que tem cada vez mais despertado interesse por parte da indústria farmacêutica. Nativa da região sudeste subtropical e temperada da América do Sul, ocorre principalmente no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai (SIMÕES et al., 1986), onde se adapta muito bem a solos úmidos, secos, zonas montanhosas e até mesmo às dunas do litoral argentino (CABRERA, 1963). Na região sudeste do Brasil ocorre a espécie *Achyrocline alata* DC., conhecida pelos mesmos nomes populares e com propriedades e características semelhantes (LORENZI & MATOS, 2002).

É descrita como herbácea (0,40 – 0,60), bianual ou raramente perene, ereta ou de ramos decumbentes, medindo até 1,50 m de comprimento, caule cilíndrico, prostrado, celulósico, pardo ou verde amarelado, estriado, com numerosos ramos finos e longos, de secção circular, quebradiços, aromáticos, com pubescência branca. Folhas simples, alternas, inteiras, sésseis ou de pecíolos muito curtos, lineares a lanceoladas, de até 12 cm de comprimento por 1,8 cm de largura, com tricomas glandulares sésseis vesiculados e outros flageliformes numerosos em ambas as faces das folhas. Inflorescências axilares e terminais, com capítulos pequenos de pedicelos longos, com dois tipos de flores, reunidos em panícula corimbosa, em número de quatro a oito. Flores amarelo-douradas, as centrais hermafroditas, de corola tubulosa e anteras sagitadas, em número de uma a três, e as flores marginais, de três a seis, femininas, de

corola filiforme. Frutos representados por aquênios não-rostrados, 0,7 a 0,8 mm de comprimento, obovóides, glabros, pardos, papus alvo, unisseriado, com cerca de 4 mm de comprimento e 20 cerdas (PIO CORREA, 1974; DIMITRI, 1980; SIMÕES et al., 1986; CASTRO & CHEMALE, 1995).

A marcela cresce espontaneamente em pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, sendo tratada quase sempre como erva daninha. A propagação por sementes é o principal meio pelo qual as plantas se reproduzem na natureza (CASTRO & CHEMALE, 1995), no entanto, IKUTA (1998) ressalta que a propagação de marcela também é viável por micropropagação e por estaquia, com melhor enraizamento das estacas apicais do que as laterais.

O plantio pode ser feito de setembro a outubro na Região Sul (espaçamento de 0,80m entre linhas e 0,60m entre plantas) e a colheita de forma escalonada ou de uma só vez, quando produz as primeiras flores, podendo-se utilizar raízes, ramos, folhas e flores (CASTRO & CHEMALE), chegando-se a um rendimento de 2.000 kg de planta verde por hectare.

No Rio Grande do Sul a coleta da marcela é cercada de misticismo e religiosidade, devendo ser coletada especialmente na sexta-feira santa, pois, segundo a lenda, além de potencializar sua ação medicinal, torna-se benta, purificando o corpo inteiro (ROSA, 1977).

Suas inflorescências secas são utilizadas em muitas regiões para o enchimento de travesseiros. Na medicina popular, o chá das flores, folhas e ramos secos é empregado internamente como digestivo, antiespasmódico, carminativo, colagogo, eupético, antidiarréico, antisséptico intestinal, emenagogo e hipocolesterolêmico; externamente como antiinflamatório e antisséptico (SIMÕES et al., 1986).

Os constituintes químicos principais da marcela (TESKE & TRENTINI, 1997) correspondem a flavonóides (quercetina, luteolina, galangina, isoganfalina), ésteres da calerianina (com ácido caféico e ácido

protocatéquico), óleo essencial e saponinas triterpênicas. Os flavonóides atuam como estimulantes da circulação, reduzindo a fragilidade dos capilares, quando absorvidos através da pele têm demonstrado aumentar a circulação sangüínea periférica. O termo flavonóide (WILHELM FILHO, 2001) envolve todo um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterociclo oxigenado (C). A família dos flavonóides é formada por mais de 4.000 diferentes compostos fenólicos descritos, incluindo os subgrupos flavanóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas e flavonóis.

Em experiências com animais, têm sido observadas suas propriedades analgésica, antiinflamatória e relaxante muscular, sem nenhum efeito colateral. No Japão, estudos *in vitro* demonstraram que extratos das flores desta planta inibiram o desenvolvimento de células cancerosas e pesquisadores americanos comprovaram *in vitro* as propriedades antiviróticas do extrato aquoso quente de suas flores secas contra células T-linfoblastóideas infectadas com o vírus HIV (LORENZI & MATTOS, 2002). É provável que os flavonóides sejam os responsáveis por estas propriedades ativas, segundo estes autores.

Na agroecologia são raros os estudos com marcela, citando-se o trabalho de SAUPE (2002) que avaliou o efeito do chá de marcela no controle do pulgão verde (*Myzus persicae* Sulzer) utilizando o cultivo hidropônico de rúcula (*Eruca sativa* Gersault) como modelo experimental. A maior eficiência de controle do pulgão (91,6%) foi verificada para o chá com concentração de 10 gramas de inflorescências por litro de água. Este autor recomenda a continuidade desses estudos para o controle de insetos de importância agrícola.

5.3. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Educação e no Departamento de Defesas Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. Os experimentos, correspondentes a 11 biotestes, foram desenvolvidos no ano de 2003.

Como material reagente utilizou-se sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.), variedade Maravilha-de-inverno, picão-preto (*Bidens pilosa*, L.) e trigo (*Triticum aestivum*, L.), variedade RS-8.

A escolha do material reativo (extrato de marcela) foi fundamentada em experimento preliminar, onde se avaliou os efeitos de extratos vegetais de diversas espécies, dentre as quais *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae), na germinação e no crescimento e desenvolvimento de plântulas (pré-germinação) de alface (*Lactuca sativa* L), variedade Maravilha-de-inverno.

Preparação do material:

Flores frescas, com aproximadamente 10 cm de pedúnculos, colhidas entre 12 e 15 horas, no mês de março de 2003, foram secadas à sombra e depois desinfetadas em 0,5% de hipoclorito de sódio por um minuto, lavadas abundantemente em água potável e posteriormente estocadas no congelador a -20°C.

No momento da instalação dos respectivos ensaios, o material foi moído em liquidificador doméstico, com água destilada nas devidas proporções (peso/volume) e após, coado em tecido de algodão esterilizado. Em ensaio com solução nutritiva para hidroponia em alface, esta substituiu a água destilada.

Depois de preparados, todos os extratos foram imediatamente corrigidos para pH $5,8 \pm 0,2$.

As sementes dos materiais reagentes foram desinfetadas de maneira similar, passando ainda por uma lavagem com álcool 70°, por 15

segundos. Caixas *germbox* passaram por idêntica assepsia com hipoclorito e posteriormente lavadas com algodão embebido em álcool-70°. Toalhas de papel estéril foram colocadas nas caixas, como substratos, para receberem as sementes e os tratamentos.

As sementes a germinar e as sementes pré-germinadas (em água destilada e solução nutritiva) com aproximadamente 1 mm de radícula, foram colocadas sobre os papéis-toalha, embebidos com os respectivos tratamentos.

Em cada caixa foram colocadas 25 sementes nos ensaios de germinação, 16 sementes pré-germinadas nos biotestes de crescimento e desenvolvimento de plântulas e 9 sementes pré-germinadas no ensaio de hidroponia, com 20 ml de extrato vegetal do respectivo tratamento, além das testemunhas. Para a adição de extrato e solução nutritiva, visando completar os tratamentos, eram acrescidas ao fundo das caixas *germbox*, novas toalhas de papel esterilizado, evitando assim o excesso de líquido nos respectivos substratos.

Após a execução dos tratamentos foram feitas leituras, colhendo-se os seguintes dados de observação: germinação, sobrevivência, estatura média da parte aérea em mm, massa seca de raízes, massa seca da parte aérea e massa fresca da parte aérea em mg por parcela.

A solução nutritiva para composição dos tratamentos, utilizada em soluções hidropônicas para a cultura da alface, foi preparada pelo Departamento de Fitotecnia, da UFSM (SANTOS et al., 2002), tendo a seguinte composição, a seguir.

COMPONENTES	CASTELLANE & ARAÚJO (1995)
	g/L de solução
Nitrato de cálcio	950
Monoamônio fosfato	-
Fosfato de potássio	272
Cloreto de potássio	-
Nitrato de potássio	900
Sulfato de magnésio	246
Cloreto de manganês	-
Sulfato de manganês	1,70
Sulfato de zinco	1,15
Sulfato de cobre	0,19
Ácido bórico	2,85
Molibdato de sódio	0,12
Ferro-EDTA*	1 litro

* Fe-EDTA como fonte de ferro, obtido através da dissolução de 24,1 g de sulfato de ferro em 400 mL de água e 25,1 g de sódio-EDTA em 400 mL de água a 80°C, misturando-se as duas soluções frias e completando o volume para 1,0 litro.

Para a consecução dos objetivos propostos foram executados os seguintes experimentos:

Biotestes 1 e 2

Biotestes realizados, respectivamente, a partir de sementes a germinar e germinadas, tendo *Lactuca sativa* como material reagente. Biotestes implementados em 05/06/2003.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/3 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 3- 1/6 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 4- 1/12 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 5- 1/24 (p/v) de extrato aquoso de marcela

Bioteste 3 e 4

Respectivamente de sementes a germinar e germinadas, tendo *Bidens pilosa* como material reagente. Biotestes implementados em 05/06/2003.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/3 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 3- 1/6 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 4- 1/12 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 5- 1/24 (p/v) de extrato aquoso de marcela

Bioteste 5 e 6

Respectivamente de sementes a germinar e germinadas, tendo *Triticum aestivum* como material reagente. Biotestes implementados em 05/06/2003.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/3 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 3- 1/6 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 4- 1/12 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 5- 1/24 (p/v) de extrato aquoso de marcela

Biotestes 7 e 8

Respectivamente de sementes a germinar e germinadas, tendo *Lactuca sativa* como material reagente. Biotestes implementados em 05/06/2003.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/128 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 3- 1/64 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 4- 1/32 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 5- 1/16 (p/v) de extrato aquoso de marcela

Biotestes 9 e 10

Respectivamente de sementes a germinar e germinadas, tendo *Triticum aestivum* como material reagente. Biotestes implementados em 05/06/2003.

Tratamentos:

- 1- T (testemunha): água destilada
- 2- 1/128 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 3- 1/64 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 4- 1/32 (p/v) de extrato aquoso de marcela
- 5- 1/16 (p/v) de extrato aquoso de marcela

Bioteste 11

Constituiu-se num bifatorial 2x6, em blocos ao acaso com 4 repetições e nove indivíduos (sementes germinadas) por parcela.

As parcelas foram representadas pelos seguintes tratamentos:

- 01- Sementes germinadas em água destilada
- 01- Sementes germinadas em solução nutritiva (para hidroponia em alface).

As subparcelas corresponderam aos seguintes tratamentos, aplicados respectivamente na implantação do experimento (0), cinco dias após (5) e dez dias após (10).

1- água destilada na implantação do ensaio (0), solução nutritiva aos cinco dias (5) e solução nutritiva aos dez dias (10).

2- solução nutritiva (0), solução nutritiva (5) e solução nutritiva (10).

3- extrato de marcela (0), solução nutritiva (5) e solução nutritiva (10);

4- Marcela (0), marcela + solução nutritiva (5) e solução nutritiva (10);

5- Marcela (0), marcela + solução nutritiva (5) e marcela + solução nutritiva (10);

6- Marcela + solução nutritiva (0), marcela + solução nutritiva (5) e marcela + solução nutritiva (10).

5.4. Resultados e discussão

Os resultados obtidos em 11 experimentos, visando avaliar as propriedades bioestimulantes ou indutoras do crescimento e desenvolvimento em plântulas de alface (*L. sativa*), picão-preto (*B. pilosa*) e trigo (*T. aestivum*), são apresentados a seguir.

Na primeira série de seis bioensaios, onde foram testadas cinco doses (p/v) iniciais de marcela (1/24, 1/12, 1/6, 1/3 e 0), tendo como material reagente as três espécies vegetais citadas anteriormente, foram bastante evidentes os efeitos dos extratos de marcela para os caracteres avaliados.

Na Tabela 1 e Tabela 2 são apresentados, respectivamente, resultados do bioteste 1 e bioteste 2, a partir de sementes pré-germinadas e sementes germinadas (plântulas) de *L. sativa*.

Como pode ser observado, no primeiro bioensaio (Tabela 1, Figura 1 e Figura 2) o caráter mais afetado foi estatura de plântula, com as menores doses promovendo os maiores acréscimos, sugerindo a participação

agentes inibidores e indutores. Provavelmente a ação dos primeiros se acentua mais nas doses mais altas e a medida em que se reduzem as doses, o componente indutor do crescimento se sobressai. Outra possibilidade seria a tendência de que doses elevadas do componente indutor, possam ser citotóxicas. O efeito sobre o caráter estatura de plântula resultou por se refletir no caráter massa seca da parte aérea de forma similar.

A Tabela 2 resume os resultados obtidos desde a germinação de sementes de alface nas respectivas doses de extratos de marcela. Devido a problemas com regulação da aparelhagem no laboratório, a temperatura chegou a 38 °C, por um tempo estimado de 36 horas, provocando uma queda geral na sobrevivência das plântulas. A sobrevivência, que caiu para 25,9% na testemunha, chegou a 68,5% para a dose de 1/3 de extrato de marcela. A figura 2 mostra claramente o efeito positivo na sobrevivência das plântulas, com o aumento da dose. Para o caráter estatura de plântula, os resultados mostraram que as várias doses de extrato de marcela promoveram crescimento das plântulas, sem que houvesse menor resposta para as doses mais altas (Tabela 2), como ocorreu no bioteste 1 (Tabela 1). Pode-se especular que as 24 horas requeridas para a germinação (1 a 2 mm de radícula) podem influenciar na composição do extrato, diminuindo a ação do agente inibidor, sem afetar ou afetando positivamente o agente indutor. A maior estatura de plântulas tratadas com extrato de marcela refletiu-se de maneira similar nos caracteres massa seca de raízes e massa seca da parte aérea. Entretanto, se a curva de resposta para estatura de planta foi representada por uma equação de terceiro grau, com alto grau de ajuste para os dados, os valores baixos dos coeficientes de regressão para aqueles caracteres não permitiram traçar curvas confiáveis (Tabela 2).

Os dados obtidos nos dois experimentos, com a espécie reagente *L. sativa* permitiram demonstrar a ação positiva do extrato de marcela sobre vários caracteres avaliados e mais do que isto, levantaram a possibilidade

da existência de compostos que possibilitaram a proteção das plântulas sob estresse ambiental, no caso, alta temperatura. A ocorrência de flavonóides nos extratos de marcela, tidos como responsáveis por efeitos positivos em diversos organismos, inclusive de proteção a estresses ambientais (TESKE & TRENTINI, 1997; TAIZ & ZEIGER, 1998; LORENZI & MATTOS, 2002) poderia ser responsável por tais efeitos observados nos dois bioensaios. Isto explicaria a ação protetora observada no bioteste 2 sob estresse, já que os flavonóides nas plantas são caracterizados principalmente por este efeito.

TABELA 1. Valores médios para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de alface (*L. sativa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S ^{ns}	C**	MR ^{ns}	MA*
0	87,5	7,0	3,0	8,1
1/24	95,3	11,3	3,4	10,4
1/12	93,8	10,4	3,6	10,5
1/6	93,8	9,8	3,7	9,4
1/3	85,9	10,9	3,5	9,3
CV%	14,7	13,8	19,6	10,6
C. linear	-	7,1963	-	8,1606
X1	-	0,9053	-	0,5789
X2	-	-0,0630	-	-0,0402
X3	-	0,0012	-	0,0007
R ²	-	0,8985	-	0,9898
CV%	-	13,8	-	13,4

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 5%

* Significativo a 1%

TABELA 2. Valores médios para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de sementes e plântulas de alface (*L. sativa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	G ^{ns}	S ^{**}	C*	MR ^{**}	MA ^{**}
0	90,6	25,9	4,6	1,2	2,8
1/24	90,6	41,4	9,6	1,6	5,5
1/12	87,5	48,2	7,8	2,2	5,2
1/6	93,8	63,3	8,6	3,0	7,7
1/3	84,4	68,5	9,6	2,0	6,6
CV%	12,3	13,1	23,6	24,8	25,4
C. linear	-	0,5388	4,9573	1,0495	2,862
X1	-	0,0267	0,8707	0,1608	0,3792
X2	-	-0,0004	-0,0562	-0,0039	-0,008
X3	-	-	0,0010	-	-
R ²	-	0,9920	0,7764	26,2	27,9
CV%	-	14,0	28,7	0,8860	0,8905

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 5%

* Significativo a 1%

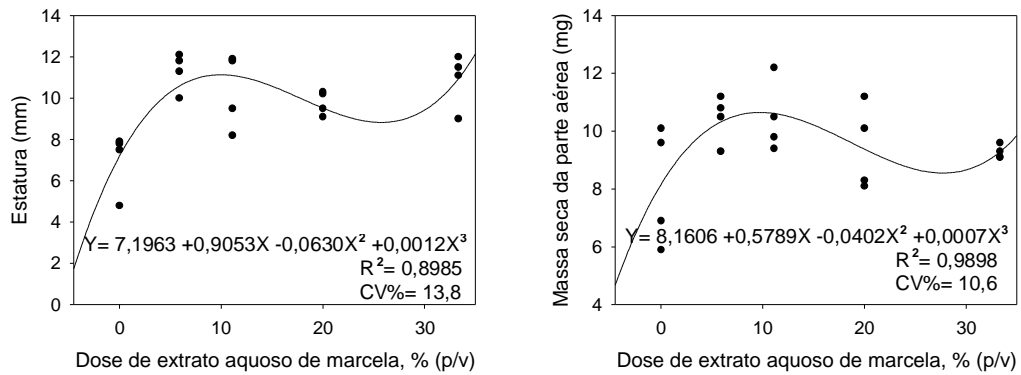


FIGURA 1. Curvas de resposta de estatura de plântula (mm) e de massa seca da parte aérea de plântulas de alface (*Lactuca sativa*) para doses (p/v) de extrato aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*). 2005.

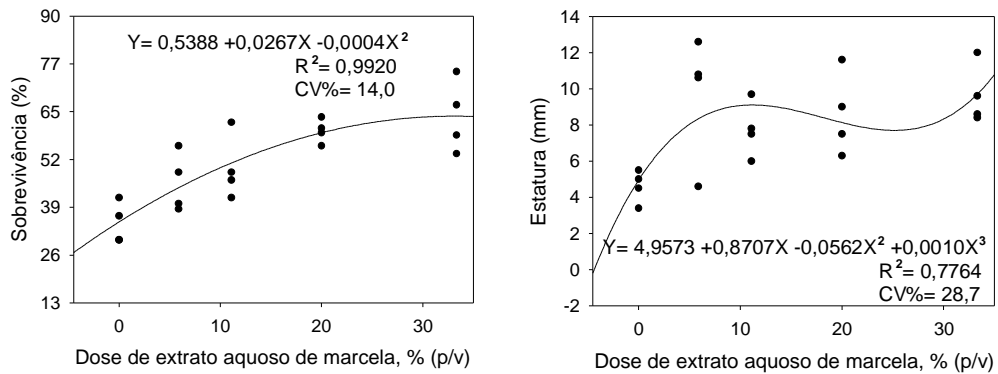


FIGURA 2. Curvas de resposta de sobrevivência (%) e estatura de plântula (mm) de plântulas de alface (*Lactuca sativa*) para doses (p/v) de extrato aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*). 2005.

Nas Tabela 3 e Tabela 4 são apresentados os dados de observação para diversos caracteres em *B. pilosa*, respectivamente para os biotestes 3 e 4, a partir de sementes germinadas e a germinar, tratadas com 5 doses de marcela (*A. saturoioides*), de 0 a 1/3 (p/v).

No bioteste 3, não houve significância estatística para qualquer dos caracteres avaliados (Tabela 3). Já o bioteste 4 (Tabela 4) apresentou resultados bastante interessantes. Diferentemente do que ocorreu com plântulas de alface (Tabela 1 e Tabela 2), as doses mais altas de extratos de marcela inibiram a germinação e a estatura de plântulas de *B. pilosa*. Mesmo para o caráter sobrevivência, a dose mais alta (1/3) promoveu a inibição para este caráter avaliado. Para as doses mais baixas este caráter foi estimulado, de forma semelhante ao que ocorreu em *L. sativa*, provavelmente pelo mesmo motivo: efeito protetor do extrato de marcela em condições de alta temperatura (38°C), já que o bioteste com picão-preto foi realizado lado a lado e simultaneamente ao bioteste com alface, sob as mesmas condições de laboratório.

Assim, tais resultados evidenciam a participação de mais de um composto com ação divergente: no caso desta espécie reagente, os resultados evidenciam que a mesma foi insensível, nas doses utilizadas, ao agente indutor de crescimento. Ao mesmo tempo evidenciaram-se os efeitos do agente inibidor sobre a germinação, sobrevivência e estatura de plântula para as doses mais altas. A Figura 3 mostra as curvas de dose-resposta para estes caracteres, denotando-se, para a equação terceiro grau, que se ajustou muito bem ($R^2 = 0,9855$), a presença de no mínimo dois fatores para sobrevivência de plântulas: um fator indutor, nas menores doses e um fator inibidor para as doses mais altas.

TABELA 3. Valores médios para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de picão-preto (*B. pilosa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S ^{ns}	C ^{ns}	MR ^{ns}	MA ^{ns}
0	39,1	20,4	0,6	0,6
1/24	40,6	24,5	0,8	0,8
1/12	39,1	20,3	0,8	0,8
1/6	37,5	20,4	0,7	0,7
1/3	32,8	19,9	0,6	0,6
CV%	13,8	26,4	27,5	56,3

^{ns} Não significativo a 5%

TABELA 4. Valores médios para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de picão-preto (*B. pilosa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	G*	S*	C*	MR ^{ns}	MA ^{ns}
0	59,4	47,4	27,3	1,4	5,7
1/24	64,1	63,4	26,6	1,5	5,9
1/12	48,4	67,7	29,8	1,3	5,2
1/6	46,9	53,3	25,8	1,0	4,2
1/3	37,5	41,7	21,8	0,8	1,8
CV%	14,1	15,2	11,8	56,3	45,7
C. linear	0,9063	0,7492	27,0789	-	-
X1	-0,0077	0,0548	0,2047	-	-
X2	-	-0,0039	-0,0110	-	-
X3	-	0,0001	-	-	-
R ²	0,8264	0,9855	0,8194	-	-
CV%	17,6	14,3	12,5	-	-

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 5%

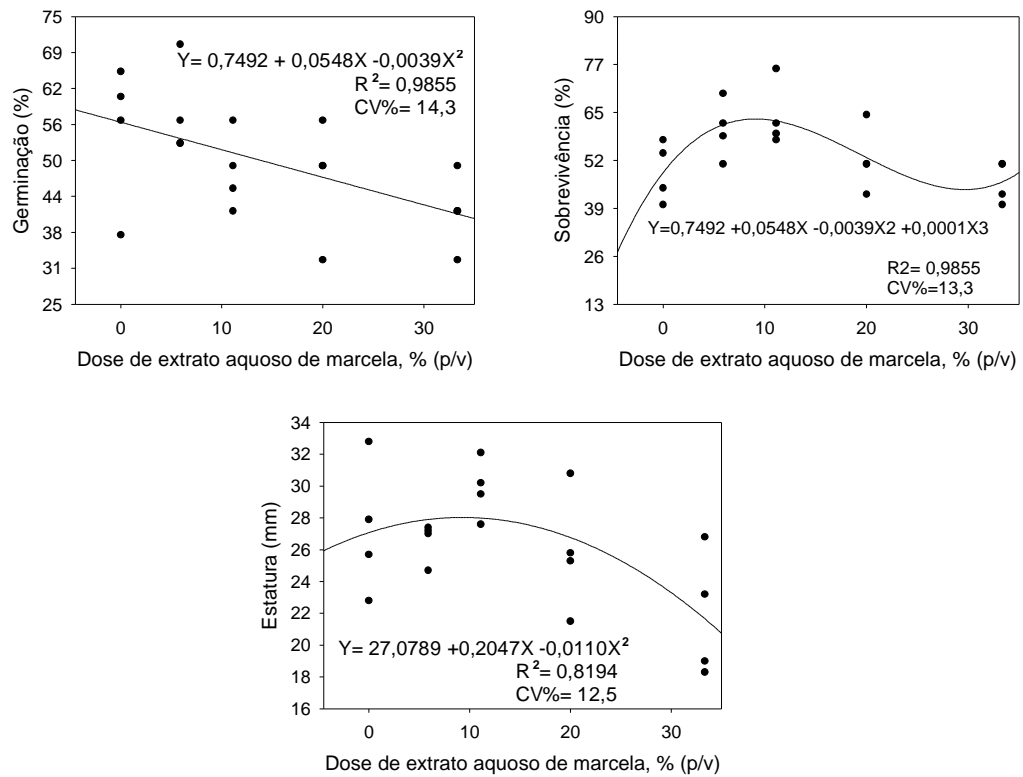


FIGURA 3. Curvas de resposta de germinação em porcentagem, sobrevivência em porcentagem e estatura de plântula (mm) de sementes e de plântulas de picão-preto (*Bidens pilosa*) para doses (p/v) de extrato aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*). 2005.

Na Tabela 5 e Tabela 6 são apresentados os valores médios dos dados de observação relativos a alguns caracteres de sementes e plântulas de trigo (*T. aestivum*), respectivamente nos biotestes 5 e 6, submetidas a cinco doses (de 0 a 1/3) de extrato de marcela (*A. satureioides*).

Como pode ser observado somente o caráter estatura de plântula, nos dois bioensaios e o caráter massa seca da parte aérea no bioteste 5, foram afetados pelas diferentes doses de marcela. Para o bioteste 5 (Tabela 5) evidenciou-se o efeito indutor do crescimento de plântulas nas doses mais baixas, sendo praticamente nulo na dose mais alta (1/3). Isto se refletiu de maneira similar na massa seca da parte aérea, tanto que inclusive as curvas de dose-resposta, para ambos, com ajuste para equações do terceiro grau, foram bastante semelhantes (Figura 4, a e b, respectivamente). As curvas de terceiro grau, geralmente consideradas biologicamente pouco representativas, poderiam ser justificadas pela presença de dois ou mais fatores interferindo e interagindo na determinação dos caracteres avaliados.

No bioteste 6 (Tabela 6), elaborado a partir de sementes a germinar, somente o caráter estatura de plântula foi afetado. Diferentemente do bioensaio 5 (Tabela 5), o aumento da dose de extrato de marcela promoveu a inibição do crescimento, mostrando que neste caso o fator de inibição pareceu ter sido mais ativado nas 24 horas requeridas para a germinação, de forma semelhante ao que ocorreu com *B. pilosa* e diferentemente do que ocorreu em *L. sativa*. O efeito protetor do extrato de marcela na sobrevivência de plântulas de trigo não pode ser evidenciada, pois diferentemente das espécies reagentes alface e picão-preto, as plântulas de trigo não foram afetadas pelas alta temperatura (38 °C), com relação a este caráter. Ressalte-se que o bioteste 6 foi implantado lado a lado e simultaneamente aos biotestes 2 e 4, portanto, nas mesmas condições de estresse térmico ocorrido no laboratório.

Esses resultados, entretanto, não eliminam uma ou outra possibilidade, mas evidenciaram que alterações ocorreram nos extratos aplicados nas sementes, comparativamente com os extratos aplicados nas sementes já germinadas, sendo que provavelmente o efeito da espécie reagente foi também fator importante e que influenciou nessas diferenças.

TABELA 5. Valores médios para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S ^{ns}	C*	MR ^{ns}	MA*
0	100	77,9	47,6	68,3
1/24	100	88,2	48,2	76,2
1/12	98,4	84,4	47,6	69,0
1/6	96,9	82,5	47,0	68,2
1/3	98,4	76,5	48,6	66,2
CV%	7,4	5,8	8,7	5,1
C. linear	-	78,5523	-	69,1392
X1	-	1,9633	-	1,2219
X2	-	-0,1351	-	-0,1069
X3	-	0,0022	-	0,0020
R ²	-	0,8675	-	0,6140
CV%	-	8,6	-	8,2

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 5%

TABELA 6. Valores médios para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MF) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	G ^{ns}	S ^{ns}	C ^{**}	MR ^{ns}	MA ^{ns}
0	89,1	98,2	86,3	47,4	72,6
1/24	92,2	100,0	98,9	44,9	78,2
1/12	95,3	98,4	87,9	41,9	70,2
1/6	93,8	95,0	83,1	41,3	69,4
1/3	95,3	95,1	76,9	41,2	62,2
CV%	14,8	9,6	5,8	19,7	11,2
C. linear	-	-	87,5469	-	-
X1	-	-	2,2366	-	-
X2	-	-	-0,2027	-	-
X3	-	-	0,0038	-	-
R ²	-	-	0,8247	-	-
CV%		-	6,6	-	

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 1%

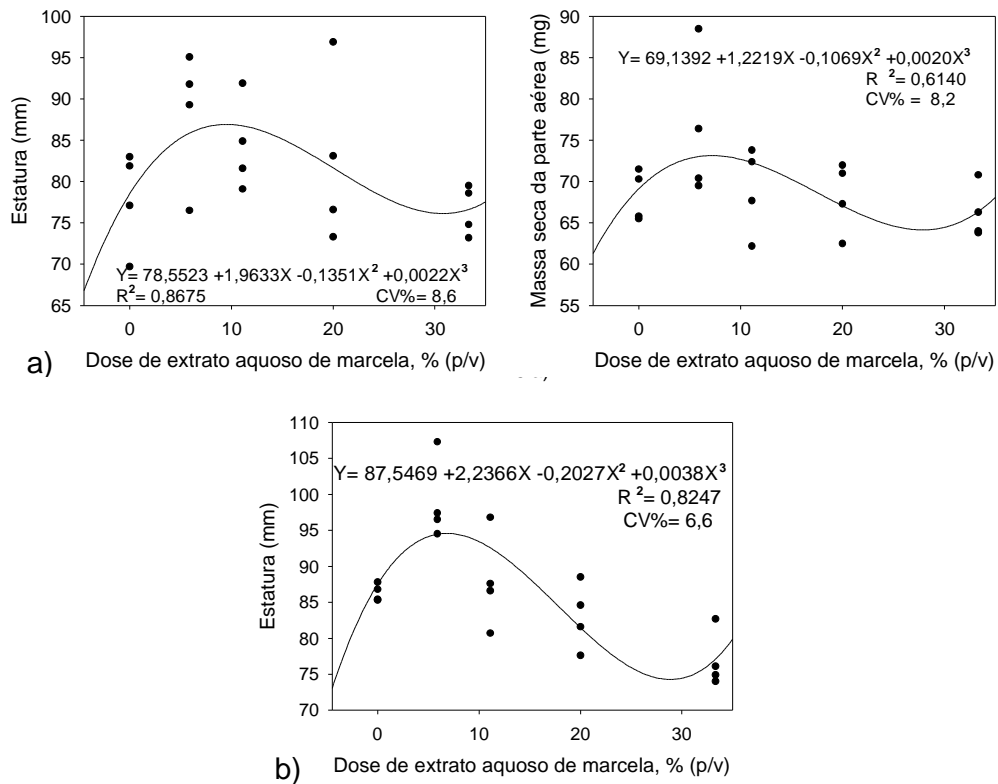


FIGURA 4. Curvas de resposta de estatura de plântula (mm) e massa seca da parte aérea do bioteste 5 (sementes germinadas); e de estatura de plântula (mm) do bioteste 6 (de sementes a germinar) de plântulas de trigo (*T. aestivum*) para doses (p/v) de extrato aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*). 2005.

Na Tabela 7 e Tabela 8 são apresentados os valores médios dos dados de observação relativos a alguns caracteres de sementes e plântulas de alface (*L. sativa*), respectivamente nos biotestes 7 e 8, submetidas a cinco doses (de 0 a 1/128) de extrato de marcela (*A. saturoioides*).

Como pode ser observado, somente o caráter estatura de plântula foi afetado significativamente (Tabela 7) para o bioteste 7, com sementes pré-germinadas, se evidenciado mais uma vez o efeito indutor de crescimento do extrato de marcela, mesmo para doses tão baixas como 1/128 e 1/64. Na Figura 5 a curva de dose resposta, determinada por uma equação de segundo grau, mostrou alto ajuste para os dados de observação ($R^2 = 0,9556$). Para o bioteste 8, com sementes a germinar, nenhum caráter avaliado variou significativamente, em função dos tratamentos aplicados. Isto talvez possa ser explicado devido à perda da atividade do fator estimulante do crescimento, pelo tempo de 24 horas entre a aplicação dos extratos nas sementes e o início da germinação. Observe-se que, apesar de não haver significância estatística, as quatro doses de extratos de marcela determinaram valores numéricos mais altos do que a testemunha, para o caráter estatura de plântula. Como o valor de F-teste esteve muito próximo ao valor correspondente da Tabela de F, pode-se inferir que se o experimento fosse mais preciso, poder-se-ia encontrar significância estatística entre os tratamentos.

TABELA 7. Valores médios para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de alface (*L. sativa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S ^{ns}	C ^{**}	MR ^{ns}	MA ^{ns}
0	100,0	8,4	4,5	11,5
1/128	100,0	10,4	3,6	12,8
1/64	98,4	11,3	3,9	11,8
1/32	100,0	12,1	4,0	12,1
1/16	100,0	12,0	4,5	11,8
CV%	5,1	8,8	10,5	5,3
C. linear	-	8,7300	-	-
X1	-	1,8348	-	-
X2	-	-0,2121	-	-
X3	-	-	-	-
R ²	-	0,9556	-	-
CV%	-	11,5	-	-

^{ns} Não significativo a 5%

^{**} Significativo a 1%

TABELA 8. Valores médios para os caracteres germinação (G) em porcentagem, sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de alface (*L. sativa*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	G ^{ns}	S ^{ns}	C ^{ns}	MR ^{ns}	MA ^{ns}
0	90,6	62,1	6,8	1,9	6,6
1/128	92,2	69,5	7,7	2,3	7,7
1/64	87,5	67,9	8,4	2,4	7,2
1/32	95,3	75,4	9,0	2,6	8,1
1/16	93,8	63,3	8,2	2,5	7,7
CV%	17,1	26,4	11,9	22,0	18,1

^{ns} Não significativo a 5%

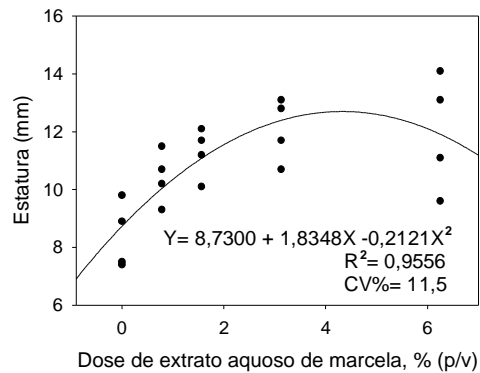


FIGURA 5. Curvas de resposta de estatura de plântula (mm) do bioteste 7 (sementes germinadas) de plântulas de alface (*L. sativa*), para doses (p/v) de extrato aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*). 2005.

Na Tabela 9 e Tabela 10 são apresentados os valores médios dos dados de observação relativos a alguns caracteres de sementes e plântulas de trigo (*T. aestivum*), respectivamente nos biotestes 9 e 10, submetidas a cinco doses (de 0 a 1/128) de extrato de marcela (*A. saturoioides*).

Os resultados, como pode ser observado nessas tabelas, são muito semelhantes aos obtidos com *L. sativa*, mas a precisão dos experimentos com sementes e sementes pré-germinadas de trigo determinaram diferenças muito significativas para estatura de plântula, o que se refletiu muito significativamente na massa seca da parte aérea e significativamente na massa seca de raízes no bioteste 9 (Tabela 9). Mesmo no bioensaio 10 (Tabela 10), onde também aparentemente houve uma diminuição na atividade do extrato de marcela, devido ao tempo entre a aplicação do mesmo e o início da germinação, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, configurando-se mais uma vez o efeito indutivo do crescimento (caráter estatura de plântula) das doses de extrato de marcela. Entretanto, aparentemente isto não chegou a se refletir nos caracteres massa seca de raízes e massa seca da parte aérea, apesar das diferenças significativas, mas discrepantes, encontradas para o primeiro.

Na Figura 6, são apresentadas as curvas de resposta para as doses de extrato de marcela, para os dois experimentos (bioteste 9 e bioteste 10), demonstrando os altos graus de ajustes dos dados de observação, determinados pelas equações correspondentes.

TABELA 9. Valores médios para os caracteres sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S ^{ns}	C**	MR*	MA**
0	98,4	83,4	45,8	71,8
1/128	100,0	92,1	51,0	81,5
1/64	98,4	91,6	52,3	79,8
1/32	98,4	100,9	48,8	89,8
1/16	100,0	100,5	46,3	87,3
CV%	6,4	2,8	5,8	6,0
C. linear	-	84,1177	45,7860	72,65
X1	-	7,6239	9,3391	7,9670
X2	-	-0,7991	-3,8926	-0,8985
X3	-	-	0,3856	-
R ²	-	0,9338	0,9993	0,8899
CV%	-	5,3	14,6	7,7

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 5%

* Significativo a 1%

TABELA 10. Valores médios para os caracteres germinação (G) sobrevivência (S) em porcentagem, estatura (C) em mm, massa seca de raízes (MR) em mg e massa seca da parte aérea (MA) em mg de plântulas de trigo (*T. aestivum*), submetidas a cinco doses de extrato bruto fresco aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	G ^{ns}	S ^{ns}	C*	MR*	MA ^{ns}
0	90,6	98,3	83,5	49,8	68,5
1/128	95,3	98,4	83,0	43,8	75,8
1/64	84,4	96,3	78,4	40,0	65,0
1/32	89,1	98,2	89,5	47,5	73,0
1/16	87,5	96,4	90,4	43,8	68,3
CV%	18,6	7,6	5,3	12,1	10,7
C. linear	-	-	84,3631	50,1142	-
X1	-	-	-8,7197	-14,1140	-
X2	-	-	4,9606	6,3521	-
X3	-	-	-0,5456	-0,68101	-
R ²	-	-	0,8581	0,9584	-
CV%	-	-	6,4	14,1	-

^{ns} Não significativo a 5%

* Significativo a 5%

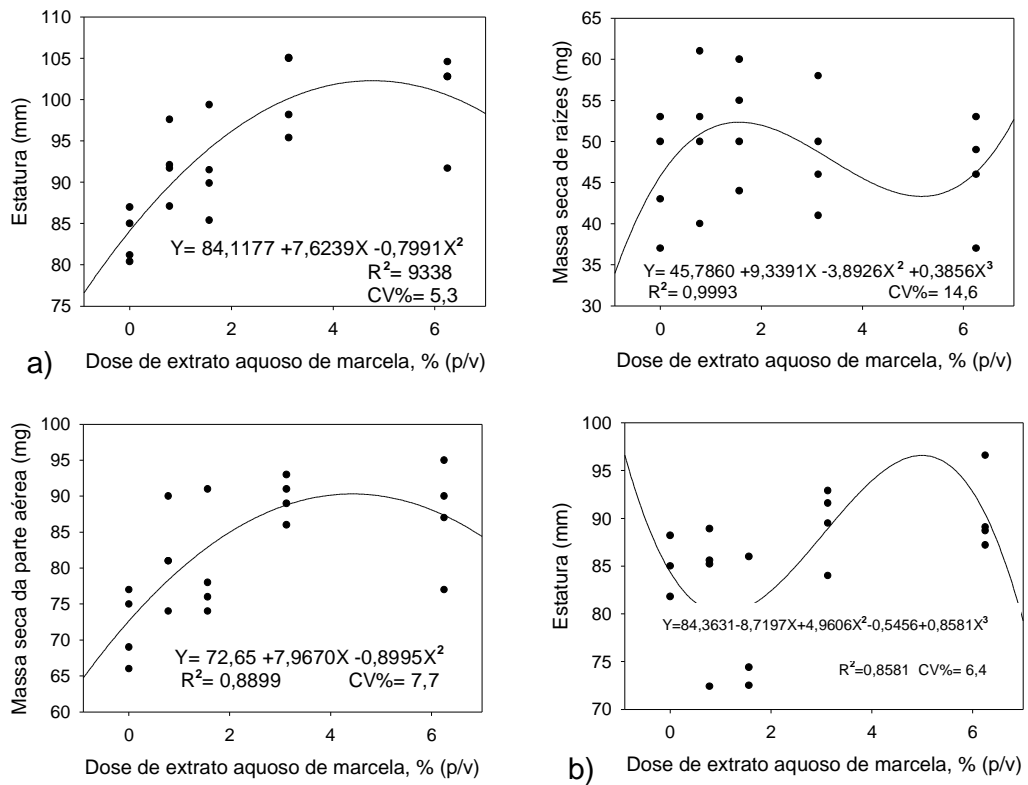


FIGURA 6. Curvas de resposta de estatura de plântula (mm) e massa seca de raízes (mg) e massa seca da parte aérea (mg) do bioteste 9 (sementes germinadas); e de estatura de plântula (mm) do bioteste 10 (de sementes a germinar) de plântulas de trigo (*T. aestivum*) para doses (p/v) de extrato aquoso de marcela (*Achyrocline satureioides*). 2005.

Os dez biotestes realizados com as três espécies reagentes (*L. sativa*, *B. pilosa* e *T. aestivum*), que compreenderam diversas doses (de 0 a 1/128) de extrato de marcela (*A. saturoioides*), demonstraram, inequivocamente, não só a presença de fatores bioestimulantes, como também de agentes inibidores e de componentes que atuaram como protetores sob estresse térmico. Estes resultados são condizentes com a literatura disponível sobre os efeitos dos extratos de marcela em diversas áreas: em pesquisa humana, animal e vegetal.

Os flavonóides formam um grupo muito grande de compostos (WILHELM FILHO, 2001), que vão desde aqueles com atividade antioxidante protetora contra estresses ambientais (TAIZ & ZEIGER, 1998) e com possibilidade de serem agentes bioestimulantes, quanto aqueles com propriedades citotóxicas, inclusive inseticidas, que puderam ser detectados nos ensaios de alelopatia com marcela, planta tipicamente rica nessas substâncias fenólicas (LORENZI & MATTOS, 2002; SAUPE, 2002). Assim não deve surpreender que muitas vezes doses mais altas de um extrato bioestimulante tiveram sua ação diminuída, comparativamente com doses menores, ou mesmo que, dependendo da espécie reagente, doses mais concentradas causaram inibição de determinados caracteres. Compostos com atividades diversas certamente atuaram isoladamente ou mesmo interagiram com outros. Foi muito comum nesses experimentos, na composição de curvas de dose-resposta, ajustes altamente significativos para equações de terceiro grau, sem que, muitas vezes, as de segundo e primeiro grau fossem sequer significativas. Há que se questionar se isto significaria a presença de mais de um composto ativo nos experimentos, interferindo ao mesmo tempo, isoladamente e interagindo, na manifestação dos caracteres estudados no material reagente. De qualquer forma, certamente os extratos vegetais geralmente contêm um número muito grande de compostos com atividade alelopática (WILLIS, 1985; ALMEIDA, 1988; TAIZ & ZAIGER, 1998; MONGE, 2001; YUNES & CECHINEL FILHO, 2001) e isto não deve ser diferente em

relação ao extrato de marcela. Existe também a possibilidade de ocorrência de fenômenos horméticos, mas nestes experimentos não ficou caracterizado o estímulo na manifestação dos caracteres estudados sob doses muito baixas de agentes tóxicos, como é conceituada a hormese (SCHABENBERGER et al., 1999; FORBES, 2000; HUNT & BOWMAN, 2004; NICOLA et al., 2004; PEREIRA et al., 2004).

O bioteste 11 diferenciou-se inteiramente dos demais por ter sido utilizada apenas uma dose de marcela (1/16), com eficiência comprovada pelos experimentos anteriores, constituindo-se em seis tratamentos (subparcelas) distribuídos em duas parcelas (a partir de sementes germinadas em água destilada e solução nutritiva para hidroponia em alface; SANTOS et al., 2000).

As condições ambientais do experimento podem afetar os efeitos alelopáticos, de forma que a maioria dos autores sugere a realização de biotestes de laboratório, eliminando, tanto quanto possível, fatores que possam influenciar nos resultados. Outros (Hall et al, 1982, citados por BLUM, 1999) chegam até a sugerir que mesmo o uso de soluções nutritivas pode anular os efeitos alelopáticos. Assim, a maioria dos autores tem trabalhado em laboratório em biotestes simples, que são conduzidos no máximo até o esgotamento da reserva das sementes.

Utilizando solução nutritiva no bioensaio 11, foram possíveis leituras até 15 dias, não sendo possível ir mais além, em função da pouca altura das caixas tipo *germbox*.

Observe-se que mesmo sob solução nutritiva os resultados obtidos, além de positivos, foram altamente consistentes, com alto grau de precisão, determinado por coeficientes de variação relativamente baixos (Tabelas 11 a 15).

Com relação ao caráter estatura de plântulas (Tabela 11), pode ser observado que não houve diferença significativa entre solução nutritiva e água destilada no período avaliado. Apresentado valores médios de 7,7

mm aos 5 dias, 20,3 mm aos 10 dias e 29,2 mm aos 15 dias após a emergência.

Na Tabela 12 para a característica estatura de plântulas nos diversos tratamentos, foi observado diferença significativa, sendo que o tratamento 6 (marcela + solução nutritiva, marcela + solução nutritiva e marcela + solução nutritiva) foi o que apresentou os mais altos valores para este caráter, sendo que este efeito se isolou significativamente dos demais a partir dos 10 dias após a emergência.

A análise estatística demonstrou interação entre os tratamentos e forma de germinação (água destilada e solução nutritiva) para o caráter estatura de plântulas aos 5 dias após a emergência (Tabela 13).

Na Tabela 14, são apresentados os dados sobre matéria seca e fresca da parte aérea. Quando analisado o comportamento das soluções, constatou-se diferença significativa somente para a matéria fresca, apresentando maior massa na solução nutritiva. Quanto aos tratamentos, observa-se que para ambos os caracteres o tratamento 6 diferiu significativamente, isolando-se dos demais com as maiores médias para matéria fresca e seca da parte aérea, respectivamente de 306,2 e 13,0 mg.

Para o caráter matéria seca da parte aérea (Tabela 15) observou-se diferença significativa quanto o meio de germinação, sendo que ambos apresentaram comportamento similar aos maiores valores nos tratamentos, ou seja, 2 e 6.

TABELA 11. Estatura de plântulas (mm) aos 5, 10 e 15 dias após a emergência em água destilada e solução nutritiva, em laboratório. 2005.

Tratamentos	5 dias	10 dias	15 dias
Água destilada	7,7a	20,1a	29,0a
Solução nutritiva	7,6a	20,5a	29,3a
Média	7,7	20,3	29,2
Cv (%)	11,0	9,2	8,7

Médias ligadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

TABELA 12. Estatura de plântulas (mm) aos 5, 10 e 15 dias após a emergência em seis combinações de tratamentos com água destilada (A), solução nutritiva (SN) e extrato de marcela (M), utilizadas na implantação do ensaio, aos 5 dias e aos 10 dias após, em laboratório. 2005.

Tratamentos	5 dias	10 dias	15 dias
1 (A, SN, SN)	6,2b	16,8c	25,8d
2 (SN, SN, SN)	6,3b	19,7b	26,6cd
3 (M, SN, SN)	8,1a	20,7b	28,9cb
4 (M, M+SN, SN)	8,5a	20,6b	30,4b
5 (M, M+SN, M+SN)	8,2a	20,8b	30,1b
6 (M+SN, M+SN, M+SN)	8,7a	23,1a	33,1a

Médias ligadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

TABELA 13. Estatura de plântulas (mm) aos 5 dias após a emergência, em seis combinações de tratamentos com água destilada (A), solução nutritiva (SN) e extrato de marcela (M), utilizadas na implantação do ensaio, aos 5 dias e aos 10 dias após, em laboratório. 2005.

Tratamentos	Germinação /água	Germinação / solução nutritiva
1 (A, SN, SN)	6,0c	6,5b
2 (SN, SN, SN)	6,1c	6,5b
3 (M, SN, SN)	7,9b	8,3a
4 (M, M+SN, SN)	8,2b	8,7a
5 (M, M+SN, M+SN)	7,8b	8,5a
6 (M+SN,M+SN,M+SN)	9,9a	7,6ab

Médias ligadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

TABELA 14. Matéria fresca da parte aérea (mg) e matéria seca da parte aérea (mg), em seis combinações de tratamentos com água destilada (A), solução nutritiva (SN) e extrato de marcela (M), utilizadas na implantação do ensaio, aos 5 dias e aos 10 dias após, a partir de sementes germinadas em água destilada (01) e em solução nutritiva (02), em laboratório. 2005.

Tratamentos Parcelas	Matéria fresca da parte aérea (mg)	Matéria seca da parte aérea (mg)
01	235,2b	11,5a
02	254,9a	11,8a
Tratamentos Subparcelas		
1 (A, SN, SN)	201,8c	11,1b
2 (SN, SN, SN)	260,0b	13,4a
3 (M, SN, SN)	214,8c	10,7b
4 (M, M+SN, SN)	233,5cb	10,5b
5 (M, M+SN, M+SN)	254,1b	11,2b
6 (M+SN, M+SN, M+SN)	306,2a	13,0a

Médias ligadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

TABELA 15. Matéria seca da parte aérea (mg) em seis combinações de tratamentos com água destilada (A), solução nutritiva (SN) e extrato de marcela (M), utilizadas na implantação do ensaio, aos 5 dias e aos 10 dias após, a partir de germinação em água destilada e em solução nutritiva, em laboratório. 2005.

TRATAMENTO	Germinação em água	Germinação em solução nutritiva
1 (A, SN, SN)	11,2b	11,0b
2 (SN, SN, SN)	13,3a	13,6a
3 (M, SN, SN)	10,8b	10,7b
4 (M, M+SN, SN)	10,6b	10,5b
5 (M, M+SN, M+SN)	10,0b	12,5a
6 (M+SN, M+SN, M+SN)	13,3a	12,6a

Médias ligadas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

5.5. Conclusões

A partir da análise dos experimentos realizados, permite-se concluir que:

- ✓ O extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*) contém compostos bioativos, cujos efeitos foram detectados em ensaios de alelopatia.
- ✓ O potencial bioestimulante, de um ou mais compostos contidos no extrato de marcela, foi expresso através dos experimentos conduzidos, e remetem à possibilidade de que outras áreas envolvidas em pesquisas mais avançadas possam determinar as estruturas químicas de moléculas bioativas, visando a síntese de derivados importantes no estabelecimento de uma agricultura mais sustentável.
- ✓ O extrato de *A. satureioides* provavelmente contém agentes citotóxicos e inibidores do crescimento, constituindo-se em importante

base para a realização de experimentos visando o controle de pragas (fungos, insetos e outras).

▼ A provável ação protetora contra estresse térmico, encontrada no extrato de marcela deve ser mais bem avaliada em experimentos específicos.

▼ Bem adaptada às condições do sul do Brasil, a marcela poderá se constituir numa opção de cultivo importante aos pequenos produtores, no fornecimento de matéria prima para a indústria, bem como no sentido de obtenção de extratos pelo próprio agricultor para aplicação direta em alguns cultivos, a partir dos avanços na pesquisa de laboratório e de campo com esta espécie.

6. PROSPECÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS, ENQUANTO EXCIPIENTES DE COMPOSTOS INSETICIDAS

Resumo

Visando selecionar espécies vegetais como excipientes de compostos inseticidas, 21 diferentes extratos de espécies vegetais foram testados em quatro ensaios (fotofase natural, $25 \pm 1^\circ \text{C}$) em lagartas de *Spodoptera frugiperda*, no Laboratório de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS), no período de novembro de 2002 a março de 2003. Lagartas de *S. frugiperda*, criadas artificialmente receberam, de maneira crônica, basicamente dietas acrescidas de extratos aquosos na concentração de 1/3 (p/v), compondo 25% das respectivas dietas. O extrato (óleo) de *Azadirachta indica* foi incluído em dois experimentos, nas concentrações de 0,1250 e 0,0625% (v/v). No Bioensaio 1, os extratos foram aplicados sobre os insetos e na superfície das dietas. Os bioensaios foram conduzidos com lagartas no segundo ínstar (Bioteste 4) quarto instar (Biotestes 1 e 2) e quinto ínstar (Bioteste 3). As lagartas foram manejadas individualmente em frascos de plástico de 100 mL. Todos os materiais utilizados (vidrarias, liquidificador, frascos e folhas) foram desinfetados com hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto. Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso com quatro (Biotestes 1, 2 e 3) e cinco (Bioteste 4) repetições. Foram analisados os caracteres consumo de dieta em matéria seca, sobrevivência de lagartas, peso de pupas e viabilidade de pupas. Os resultados obtidos e analisados estatisticamente permitiram demonstrar

que os extratos de *M. azedarach* e *A. indica* são eficientes no controle de *S. frugiperda* em laboratório, mesmo em estádios mais avançados de desenvolvimento larval. Já o extrato de *Eucaliptus citriodora*, em ínstares mais avançados, apesar de inibir o consumo de dieta, não chega a promover efeitos deletérios significativos. Em experimentos elaborados a partir de lagartas do segundo ínstar o extrato de *E. citriodora* é extremamente tóxico a estas, determinando mortalidade total. Aparece ainda como extrato promissor o de *Solanum paniculatum*, que provocou efeitos deletérios em diversos caracteres de lagartas no segundo ínstar. A maior suscetibilidade de lagartas nos ínstares precoces não esgota a possibilidade de se encontrar outros extratos promissores. A presença de agentes inseticidas em alguns extratos, detectados pela metodologia utilizada permite indicar que há um imenso potencial a explorar nas espécies vegetais, na busca por uma agricultura mais sustentável.

Abstract

Aiming to select vegetal species as source of insecticidal compounds, 21 different leaf extracts were tested throughout four bioassays (natural photophase, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $65 \pm 10\%$) on larvae of *Spodoptera frugiperda*, in the laboratory, at Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil), from November 2002 to March 2003. The larvae, maintained artificially, received chronically diets with aqueous extracts at concentration 1/3 (p/v), consisting in 25% of respective diets. The extract (oil) of *Azadirachta indica* was included in two experiments, at 0.1250 and 0.0625% (v/v). In the Bioassays 1, the extracts were applied on insects and surface of diets. The bioassays were conducted with worms at second, fourth and fifth instars, individually maintained in plastic flasks (100 mL). All materials used were decontaminated by sodium hypochlorite (0.5%) for one minute. The experiments were conducted in Randomized

Complete Block. The characters dry matter consumption of diet, survival of worms, weight of pupa, viability of pupa and others were analyzed. The results obtained and statistically analyzed permitted to demonstrate that *M. azedarach* e *A. indica* extracts are extremely efficient on the control of *S. frugiperda* at laboratory. The *Eucaliptus citriodora* extract, in latest instars, inhibits the diet consumption, but doesn't promote deleterious effects statistically significant. In bioassays elaborated with worms on earlier instars *E. citriodora* is extremely toxic to *S. frugiperda* and *Solanum paniculatum* extract promotes deleterious effects in some characters. The higher susceptibility of worms on earlier instars doesn't exhaust the possibility of getting other promising extracts. The methodology used in this work was efficient in finding promising insecticide from plants and permitted to suggest that there is an immense potential to be explored in vegetal species, aiming a more sustainable agriculture.

6.1. Introdução

De tempos em tempos a humanidade se depara com a necessidade de estabelecer um novo patamar de desenvolvimento econômico e social, quando surgem então novos paradigmas que entram em luta, na tentativa de serem portadores da filosofia da nova sociedade que se avizinha. A História tem demonstrado, entretanto, que o paradigma, ou o espírito da nova ordem socioeconômica, jamais tem sido aquele que renega ou tenta destruir a velha sociedade, mas sempre aquele que se assenta nas bases do que a humanidade tem realizado até agora, como que compreendendo que a nova ordem é, na verdade, produto da estrutura antiga e defasada. Como o *status* tecnológico é parte fundamental das estruturas sociais, é dos primeiros a acusar defasagem, impondo mudanças.

O debate entre os paradigmas atuais, pode muito bem ser compreendido pela imagem que Maturana (2001) apresenta,

diferenciando um movimento repetitivo de um recursivo. O primeiro seria como o girar da roda de um veículo atolado, sem sair do lugar. O segundo seria como o mesmo movimento desta roda, com o carro mudando de lugar. Assim, geralmente, na época do limiar da nova ordem socioeconômica, surgem grupos que pregam simplesmente a volta a tecnologias já ultrapassadas, com pequenas mudanças e algumas adequações. As conquistas da biologia molecular, enfim, da moderna biotecnologia são consideradas como perniciosas (PINHEIRO et al., 1993; ALTIERI, 2003; GLIESSMAN, 2003) e com potencial destrutivo e por isto são combatidas de todas as formas. Outros, que a história até agora tem demonstrado estarem corretos, buscam a reciclagem das tecnologias defasadas à luz dos novos conhecimentos, na visão de que a sociedade humana evolui como uma espiral ascendente, cuja projeção de um ponto em movimento, vai redesenhando sempre uma circunferência, fazendo aos mais incautos crerem que a história é repetitiva, quando na verdade ela é recursiva. Dentre os primeiros estão hoje principalmente adeptos das chamadas Agricultura Orgânica e Agroecologia; mas cumpre destacar que dentre estes já se destacam algumas posições mais avançadas (CANUTO, 2003; GOMES, 2003; KITAMURA, 2003), que propõem a adequação de diversas técnicas modernas da agricultura intensiva ou convencional e até mesmo da moderna biotecnologia.

As tecnologias, como qualquer instrumento, tem seu período de vida útil, necessitando serem substituídas de tempos em tempos. As tecnologias convencionais, assentadas sobre os produtos químicos não respondem mais às necessidades da humanidade. Os antibióticos, que pareciam ser o caminho para a cura e erradicação de todas as doenças infecto-contagiosas, apesar dos avanços científicos, cedem espaços, inclusive a moléstias que pareciam ser coisas do passado. Na agricultura, se pensava que com o advento dos defensivos agrícolas, surgiria uma agricultura sem riscos de perdas por pragas. Através dos avanços de química e áreas correlatas ou de apoio, tudo se resolveria através da

síntese de novas substâncias adequadas às novas necessidades (CASIDA & QUISTAD, 1998), mas o que se viu foi que todos os instrumentos começaram a falhar e os próprios paradigmas de sustentação tornaram-se obsoletos e vazios.

Com relação aos agrotóxicos, além de serem cada vez mais ineficientes, devido ao surgimento da resistência genética, pela seleção de genótipos mutantes pré-existentes nas populações de pragas, surge, cada vez com mais força, imposições da sociedade pelo uso de produtos menos tóxicos e menos agressivos ao ambiente (VENDRAMIN & CASTIGLIONI, 2000).

Com os avanços da biotecnologia, em particular da biologia molecular ou engenharia genética, surge a proposta de uma agricultura mais sustentável, através da utilização do potencial genético existente no Planeta, de utilização, das mais variadas formas. De forma mais didática, poder-se-ia dizer que a proposta é a de substituir o uso dos produtos químicos pelos produtos dos genes ou gênicos. Se aqueles defensores do movimento repetitivo propõem a volta do uso dos inseticidas botânicos ou de extratos vegetais *in natura*, o paradigma oriundo da biotecnologia propõe desvendar estruturas químicas e genes relacionados às substâncias de defesa das próprias plantas. Os derivados metabólitos das plantas se constituiriam na reciclagem da própria química e os genes relacionados aos mesmos substituiriam os agrotóxicos pela resistência genética. Mas este é apenas um primeiro estágio, já que os avanços da química, bioquímica, biologia molecular, biofísica, informática e outras, inexoravelmente levarão em breve a humanidade a construir seqüências de DNA, de acordo com as necessidades.

Para que tudo isto possa ser viável, há necessidade, antes de tudo, indicar em que espécies podem estar metabólitos secundários importantes, para que possam ser mais tarde fracionados, isolados, identificados, e a pesquisa prossiga até às últimas conseqüências.

Neste importante estágio básico da pesquisa, os paradigmas repetitivos e os paradigmas recursivos, não entram em choque, já que os objetivos iniciais são os mesmos, ou seja, identificar espécies vegetais excipientes de metabólitos secundários, cujos extratos tenham atividade detectável através de bioensaios de laboratório e de campo. A diferença é que os primeiros defendem o uso dos extratos vegetais exclusivamente *in natura*, enquanto que os últimos pesquisam com o objetivo principal de descobrir novos genes de defesa e moléculas-modelo na síntese de derivados, mas não excluem a possibilidade de utilização direta dos extratos vegetais pelos agricultores, em situações bastante limitadas. Até mesmo pelas dificuldades atuais de se isolar e sintetizar moléculas complexas contidas nos extratos vegetais e que muitas vezes não correspondem aos resultados obtidos nos bioensaios (RODRIGUES, 1996). Entretanto, certamente a utilização de extratos vegetais *in natura*, em larga escala, carece totalmente de sustentabilidade.

O presente trabalho visou a prospecção de espécies vegetais promissoras como inseticidas ou insetistáticas, testando seus extratos contra lagartas de *Spodoptera frugiperda*, através de bioensaios nos laboratórios do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS).

6.2. Revisão de literatura

Os trabalhos com extratos vegetais, principalmente visando avaliar o potencial inseticida dos mesmos, têm sido publicados cada vez em maior número. Quase sempre os resultados têm sido altamente positivos, demonstrando como é praticamente ilimitado o potencial das espécies vegetais na descoberta de novas moléculas biocidas (BARREIRO, 2001).

No último Congresso Brasileiro de Entomologia (2004) pode-se ter a dimensão do aumento do interesse por esta área de pesquisa, quando os

trabalhos com extratos vegetais mais do que duplicaram em relação a períodos anteriores. Mas do que isto, os resultados obtidos foram muito promissores como pode ser exemplificado a seguir.

O óleo de nim (*Azadirachta indica*, família Meliaceae), como tem acontecido sempre, foi novamente o mais testado contra as mais diversas pragas, quase sempre com eficiência em testes de laboratório, mas inconsistente em experimentos de campo. Contra *Spodoptera frugiperda* o extrato de nim mostrou alta eficiência de controle em laboratório, mas não competiu com os inseticidas sintéticos (De JESUS et al., 2004). Já contra *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas), além de eficiente o óleo de nim teve controle semelhante aos inseticidas convencionais (THULER et al., 2004). Em experimento a campo, entretanto, BESERRA et al., (2004b) não detectaram diminuição de danos por *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* em milho, com a aplicação de óleo de nim. Igualmente, em outro experimento de campo, BESERRA et al. (2004a) não encontraram eficiência do óleo de nim, nas diversas doses testadas, contra *Spodoptera frugiperda* e *Brevicorine brassicae*, na cultura do repolho. GONÇALVES (2004) avaliou, em experimento de campo, o óleo de nim contra alternativas no controle de *Thrips tabaci* em cebola, sem que observasse redução da incidência desse inseto. SILVEIRA et al., (2004), entretanto, observaram a campo a diminuição da incidência de *Spodoptera frugiperda* em milho, com uma aplicação de óleo de nim, mas sugerem a inclusão de outros métodos de controle e avaliações novas com aplicações sucessivas do produto. Em casa de vegetação, VIANA & PRATES (2004) avaliaram os efeitos de diversas formas e dosagens de extratos de nim, combinados forma e número de aplicações, no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, demonstrando que a eficiência dos extratos de *Azadirachta indica* depende da interação entre estes diversos fatores. Estes resultados demonstram a alta dependência dos extratos de nim dos fatores ambientais, pois conforme aumenta a incidência destes,

cai a eficiência do produto. Esta situação não deve ser diferente para os demais extratos vegetais.

Trabalhos com óleo de nim, em periódicos nacionais e internacionais, são também muito abundantes e quase sempre confirmam a eficiência do mesmo no controle de diversos insetos, mas geralmente se referem igualmente à dependência de fatores ambientais, sendo comum também relatos de sobre a eficiência relativa menor que os inseticidas sintéticos, como se pode exemplificar (SCHMUTTERER, 1988; ISMAN et al., 1990; SCHMUTTERER, 1990; WILPS et al., 1992; ADEL & SCHNAL, 2000; MORDUE & NISBET, 2000; TRINDADE et al., 2000; GELBIC & NEMEE, 2001; MARTINEZ & EMDEN, 2001; MANCEBO et al., 2002; LIANG et al., 2003).

Também da família Meliaceae, o cinamomo (*Melia azedarach*) e *Trichilia pallida* tiveram destaque especial no Congresso Brasileiro de Entomologia de 2004, onde foram apresentados experimentos de laboratório e de campo (PARUSSOLO et al., 2004; ROCHA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2004; VENDRAMIM & BOGORNI, 2004, dentre outros), com resultados promissores no controle de *Spodoptera frugiperda*.

Extratos de diversas outras espécies vegetais também mostraram eficiência no controle de outras pragas de lavoura, conforme outros trabalhos apresentados no referido congresso brasileiro, como se segue.

O extrato folhas de louro (*Laurus nobilis* L.) apresentou efeitos repelentes sobre adultos de *Blattella germanica* (barata) até 48 horas da aplicação, mas não mostrou nenhum efeito inseticida sobre esta espécie (ALBERNAZ et al., 2004). Os óleos essenciais de *Tagetis patula*, *Cymbopogon cytratus* (limoneno, citral, geranial, mirceno), *Eucalyptus sp* (cineol, gloutol, alfa pineno) e *Laurus nobilis* (cineol, linalo, alfa pineno, beta pineno e terpineno) foram testados no gorgulho-do-milho (*Sithophilus zeamais*), obtendo resultados de até 100% no controle deste inseto com *T. patula* e *Eucalyptus sp*, em todas as doses, em 24 horas. *L. nobilis* e *C. cytratus* foram 100% eficientes para as doses mais elevadas (MENEGATT

et al., 2004). Óleos essenciais de *Piper hispidinervum* e *P. aduncum* foram avaliados contra *Ceraeochrysa cubana*, mostrando efeitos significativamente negativos na viabilidade de ovos deste predador, nas concentrações mais altas (AMORIM, et al., 2004). Extrato bruto de *Agave sisalana* (sisal) foram eficientes como inseticida no controle de *Alabama argillacea* (curucurê do algodoeiro), apresentando efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre as lagartas desta espécie (AZEVEDO et al., 2004). Extratos de *Zinziber officinale* e *Petivesia aliacea* foram aplicados em *Anticarsia gemmatalis*, sendo ambos tóxicos às lagartas, sobressaindo-se o primeiro pela ação mais rápida (BERLITZ & FIUZA, 2004). Extratos aquosos de folhas de *Canavalia ensiformes* e *Ruta graveolens* mostraram-se mais eficientes no controle de lagartas do segundo ínstar de *Anticarsia gemmatalis* do que os extratos de *Artemisa verlotorum* e *Chenopodium ambrosioides*, que apresentaram menor letalidade (BARBIERI et al., 2004). Extratos de castanha do caju foram extremamente tóxicos à traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) em aplicações tópicas, mostrando rápida ação e ótimo potencial de uso deste extrato para controle da referida praga (De BORTOLI, et al., 2004). FERNANDEZ et al. (2004) testaram diversos extratos contra *Piezodorus guildinii*. Somente o extrato aquoso de coentro (*Coriandrum sativum*) provocou aumento significativo da mortalidade deste inseto (36%), mas os extratos de pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*), óleo de nim, cravo-de-defunto (*Tagetes sp.*), alho (*Allium sativum*) e, inclusive, o de coentro, mostraram efeitos repelentes. ANDRADE et al. (2004) aplicaram extratos aquosos de arruda (*Ruta graveolens*), cebola (*Allium cepa*), louro (*Laurus nobilis*), tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) contra *Aphis gossypii* (pulgão-do-algodoeiro). Todos os tratamentos apresentaram relativa eficiência, sendo que o louro foi o menos eficiente (28%) no controle destes insetos. GONDIM JÚNIOR et al. (2004) verificaram, em laboratório, que extratos de folhas de chicha (*Sterculia foetida*) e de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala*) apresentaram ação

inseticida contra *Bemisia tabaci*, em folhas de couve, mostrando potencial importante, pela impossibilidade de uso de agrotóxicos no Arquipélago de Fernando de Noronha. MAZZONETTO (2004) estudou o efeito repelente e de toxicidade de extratos de dez espécies vegetais. Os extratos de frutos de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), parte aérea de erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*), tanchagem (*Plantago major*) e de cascas de frutos de laranja-azedada (*Citrus auranthium*) apresentaram efeito repelente aos adultos de *Zabrotes subfasciatus*. Já nos testes de toxicidade, somente extratos de erva-de-santa-maria e de folhas de arnica (*Solidago microglossa*) afetaram a sobrevivência dos adultos. COITINHO et al. (2004) aplicaram, em experimento, óleos essenciais de nim (*Azadirachta indica*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), andiroba (*Carapa guianensis*), alecrim (*Lippia gracillis*), cedro (*Cedrela fissilis*) e eugenol, sobre adultos de *Sitophilus zeamais*. O índice de mortalidade das diversas concentrações destes óleos variou de 37,6 a 78,2%. OLIVEIRA et al. (2004) avaliaram o efeito inseticida dos óleos de cedro (*Cedrela fissilis*), nim (*Azadirachta indica*), alecrim (*Lippia gracillis*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*), andiroba (*Carapa guianensis*) e copaíba (*Copaifera oleifera*) no controle de *Callosobruchus maculatus* em grãos armazenados de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi). Quanto à mortalidade, os óleos de cedro, nim, alecrim e cravo-da-índia foram os mais eficientes (100%). Com exceção do óleo de copaíba, todos os demais reduziram em 100% a postura de ovos viáveis e a emergência.

A literatura nacional e internacional, apesar da prevalência de pesquisas com o óleo de nim, é abundante e diversificada em relação a trabalhos com outros extratos vegetais, como a seguir.

O cinamomo tem sido relatado com relativa frequência, quase sempre demonstrando a eficiência de seus extratos, de forma similar ao extrato de nim (McMILLIAN et al., 1969; HUANG et al., 1995; HUANG et al., 1996; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1997; BOHNENSTENGEL et al., 1999;

SOUZA & VENDRAMIM, 2000; TORRES et al., 2001; GAJMER et al., 2002).

A família das anonáceas tem sido referida com muita ênfase, como contendo mais de 400 acetogeninas, intensamente pesquisadas em diversas áreas das ciências, inclusive na área agronômica (LORENZI, 1998; JOHNSON et al., 2000; DAMASCENO et al., 2002; PIMENTA et al., 2003), como praguicidas. No Brasil são muito conhecidas as espécies do gênero *Annona* e *Rollinia*, nesta família.

Na busca principalmente por produtos inseticidas, com menos ênfase, mas não menos importantes, têm sido investigadas espécies do gênero *Salix* (JULKUNEN-TIITTO et al., 1993) e outras espécies vegetais tais como *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae), *Renealmia alpinia*(rott) Maas (Zingiberaceae), *Eclipta Alba* (L.) Hassk, *Himatanthus fallax* (Muell.Arg.) Plumel, *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) e *Miconia lepidota* DC (Melastomataceae), dentre outras (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1995; KINGSTON et al., 2000).

Enfim, o potencial inseticida nas espécies vegetais parece praticamente inesgotável (BARREIRO, 2001) e, portanto, encontrar espécies promissoras adaptadas à Região Sul do Brasil, não deve ser algo raro. As dificuldades certamente estarão em futuros trabalhos advindos de prospecções básicas, pois certamente chegar a uma molécula inseticida ou a identificação de um gene de defesa, com todas as etapas posteriores desvendadas, significa percorrer um longo e árduo caminho.

6.3. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS).

6.3.1. Material entomológico

Para desenvolver o presente trabalho, lagartas de *Spodoptera frugiperda* foram coletadas no campo, em plantas de milho (*Zea mays*) e mantidas em criações artificiais no Departamento de Defesa Fitossanitária. Para se dispor de uma população constante e uniforme de insetos, fundamental para o êxito de qualquer trabalho envolvendo pragas das culturas (ORTMAN & PETERS, 1984), a criação de insetos ultrapassou em muito às necessidades aparentes de material reagente para os experimentos

6.3.2. Criação de *S. frugiperda*

A partir de 300 lagartas coletadas no campo, iniciou-se um sistema criatório, visando obtenção de material para os biotestes, procurando evitar perda da variabilidade genética da população, impedindo que a consangüinidade pudesse inviabilizar as avaliações. Para isto, já na primeira geração, contou-se, basicamente, com mais de 2000 lagartas, criadas individualmente, para serem utilizadas nos biotestes e para fins de reprodução. Para cada bioteste não foi usado mais do que 20% do total de lagartas, visando selecionar material reagente mais uniformemente possível. Foram obtidas 12 gerações de insetos, sem que surgissem problemas aparentes de consangüinidade.

6.3.3. Manejo e criação de adultos de *S. frugiperda*

Pupas não sexadas de *S. frugiperda* (de 200 a 350) e obtidas ao acaso, dentre 1.000 a 2000 pupas, foram colocadas em três a cinco recipientes cilíndricos de vidro, com volume aproximado de 18 litros, forrados com papel filtro e fechados com tela plástica, apropriados à

manutenção e acasalamento. Chumaços de algodão com água destilada foram regularmente colocados no fundo do recipiente, para manter o ambiente úmido e facilitar a emergência das mariposas.

Para a alimentação dos adultos, utilizou-se a mistura embebida em algodão de mel de abelha com água destilada, respectivamente na proporção de 1/9 (v/v), acrescida de 10 gotas do produto comercial Protovit (complemento vitamínico), para cada 100 mL da calda. Para facilitar a postura foram dependuradas, no interior dos cilindros, tirantes de papel de filtro e barbantes de algodão, que posteriormente foram recortados e colocados sobre a dieta artificial até a eclosão das larvas.

Dieta para *S. frugiperda*, de acordo com PARRA (1996), com algumas modificações:

Componentes	Quantidade
Feijão carioquinha	165,00 g
Germe de trigo	79,20 g
Levedura de cerveja	50,50 g
Ácido ascórbico	5,10 g
Protovit (composição vitamínica)*	20 gotas
Ácido sórbico	1,64 g
Metilparahidroxibenzoato (Nipagin):	3,15 g
Formaldeído (38%):	3,00 g
Agar:	14,00 g**

* Composição vitamínica acrescida à dieta original

** Alteração na quantidade original (20,50 g)

6.3.4. Manejo das lagartas de *S. frugiperda*

Recortes de papel de filtro e barbante de algodão, contendo posturas, foram colocados sobre pedaços de dieta, em recipientes de plástico, de 250 ml. As larvas eclodidas eram separadas imediatamente após o

primeiro ínstar, transferindo-as para recipientes transparentes de plástico de 100 ml, com cubos de aproximadamente 4 g de dieta. A partir deste momento as lagartas estavam prontas para serem utilizadas, dependendo dos objetivos do trabalho e do ínstar requerido.

As lagartas selecionadas para multiplicação e manutenção do material foram mantidas nos recipientes de plástico citados acima, até completarem o sexto ínstar, chegando à fase de pupa, quando então eram transferidas para os recipientes de vidro para acasalamento e postura.

6.3.5. Adição dos extratos vegetais à dieta artificial

Visando simular as condições em ambiente natural, no que tange ao consumo de produto aplicado sobre a parte aérea de plantas, foram feitos testes com folhas de milho, molhadas com mistura de água e espalhante adesivo, até imediatamente antes do ponto de escorrimento. A partir desta relação, calculou-se em 22,1% a participação dos extratos frescos aquosos no peso das dietas artificiais das lagartas testadas. Este consistiu então no valor utilizado para todas os extratos e doses, visando fazer com que os insetos consumissem, em laboratório, proporcionalmente a mesma quantidade de extratos que ingeririam no campo, em pulverizações foliares.

6.3.6. Coleta e estocagem do material vegetal e preparação de extratos vegetais

As coletas das partes vegetais foram efetuadas durante todo o período de realização dos experimentos, principalmente de setembro a maio, visando utilização imediata dos extratos vegetais.

A identificação e a confirmação das espécies vegetais utilizadas foram realizadas pelo Professor Adelino Alvarez Filho, M. Sc. em Taxonomia Vegetal.

Em função dos objetivos do projeto, foram utilizadas plantas frescas (folhas, flores e frutos), imediatamente processadas ou estocadas em congelador a -20°C, quando não foi possível a utilização imediata. Folhas frescas, colhidas entre 12 e 15 horas, foram desinfetadas (com exceção na destilação) com 0,5% de hipoclorito de sódio por um minuto e após, lavadas abundantemente em água potável.

Para a utilização imediata, folhas frescas foram moídas com água destilada, em liquidificador doméstico, por 2 minutos e coadas em tecido de algodão esterilizado. Para estocagem, material intacto foi congelado, visando diminuir o processo de oxidação, provavelmente facilitado em material moído.

Da moagem e material imediatamente coado, resultaram os extratos vegetais brutos e aquosos. Da destilação das folhas frescas ou congeladas, resultaram os óleos essenciais e os destilados. Estes foram, respectivamente, estocados no escuro, a -20°C, e no refrigerador a + 3°C, quando no máximo uma semana antes da utilização.

6.3.7. Obtenção de óleos essenciais e destilados

A destilação foi realizada com um destilador, utilizando-se sobras de material, combinados com mangueiras especiais, resistentes ao calor e um condensador de vidro. Assim, o conjunto destilador, constituiu-se numa panela de pressão doméstica de 5 litros (balão receptor), uma mangueira condutora do vapor, um condensador, mangueiras condutoras de água para resfriamento do condensador e um balão coletor de vidro de 1000 mL. Desta forma, se conseguiu um rendimento adequado às necessidades do projeto de pesquisa, impossível de ser alcançado com os equipamentos disponíveis no laboratório.

O método de destilação empregado foi então uma combinação de destilação a vapor com hidrodestilação. Na panela de pressão foram colocadas 750 gramas de folhas frescas, com 1,5 litros de água. Como as folhas preenchem totalmente o recipiente, a água entra em contato

apenas parcialmente (aproximadamente 1/2), com as folhas, combinando então os dois métodos de destilação.

Os óleos essenciais foram obtidos, resgatando-se material sobrenadante do balão coletor e os destilados do restante da destilação.

6.3.8. Condições dos experimentos, dados de observação coletados e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada unidade experimental constou, dependendo do experimento, de 6, 10 e 20 lagartas, recebendo cada uma um cubo da respectiva dieta, com massa aproximada de 4 gramas. Os experimentos foram conduzidos em condições semicontroladas de laboratório, a 25°C \pm 1°C, fotofase natural e umidade relativa do ar 65 \pm 10%.

Os dados de observação coletados (sobrevivência de lagartas, consumo de dieta, peso de lagartas, peso de pupas e viabilidade de pupas) foram submetidos à análise pelo pacote estatístico NTIA/EMBRAPA (Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia, cedidos pela EMBRAPA 1986, 1988, 1989).

Os biotestes realizados tiveram as seguintes características:

Bioteste 1. Efeito de extratos de espécies vegetais, em doses variadas, na sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda*, no quarto ínstar (6 lagartas por repetição), realizado no laboratório, em novembro de 2002, com os seguintes tratamentos:

1- Água destilada

2- Destilado de ariticum, *Rollinia silvatica* (St. Hil.) Mart - Annonaceae. 100 gramas de folhas secas (em estufa, a 45°C) em pó, misturadas com 1,5 L de água, foram destilados até resultar em um litro de destilado.

3- Destilado de cinamomo sombrinha, *Meliah azedarach* L. var. umbracolifera (Knox) Rehder – Meliaceae. 100 gramas de frutos secos

(em estufa, a 45°C) em pó, misturados com 1,5 L de água, foram destilados até resultar em um litro de destilado.

4- Destilado de canela-de-cheiro, *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. – Lauraceae. 100 gramas de folhas secas (em estufa, a 45°C) em pó, misturadas com 1,5 L de água, foram destilados até resultar em um litro de destilado.

5- Extrato bruto fresco de cinamomo sobrinha, *Meliah azedarach* L. var. *umbracolifera* (Knox) Rehder – Meliaceae. 30 gramas de folhas frescas para 90 mL de água destilada.

6- Extrato bruto fresco de guaco, *Mikania laevigata* Schultz-Bip - Asteraceae. 30 gramas de folhas frescas para 90 mL de água destilada.

Os extratos foram aplicados sobre as lagartas e sobre as dietas, imergindo-as por três segundos. Escorridos os excessos de líquido, lagartas e dietas foram colocadas individualmente em frascos de plástico transparente, de 100 mL.

Bioteste 2. Efeito de extratos de espécies vegetais, na dose de 1/3 (p/v) na sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda*, no quarto ínstar, em experimento delineado em blocos ao acaso (10 lagartas por repetição), realizado no laboratório, em fevereiro de 2003. Os extratos vegetais, a partir de folhas, foram adicionados às dietas na concentração de 25%. O bioteste constou dos seguintes tratamentos:

- 1- Testemunha (água destilada)
- 2- Arruda: *Ruta graveolens* L. (Rutaceae)
- 3- Aroeira-precoce: *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)
- 4- Aroeira-preta: *Lithraea brasiliensis* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae)
- 5- Alamandra-arbustiva: *Allamanda schottii* Pohl (Apocynaceae)
- 6- Ariticum: *Rollinia silvatica* (St. Hil.) Mart. -Annonaceae
- 7- Angico-vermelho: *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan - Mimosaceae
- 8- Babosa: *Aloe arborescens* Mill. -Liliaceae

- 9- Cinamomo sombrinha: *Meliah azedarach* L. var. *umbracolifera* (Knox) Rehder - Meliaceae
- 10- Espirradeira, var. vermelha: *Nerium deander* L. - Apocynaceae
- 11- Guaco: *Mikania laevigata* Schultz-Bip - Asteraceae
- 12- Mamoneira: *Ricinus communis* L. -Euphorbiaceae
- 13- Aveloz: *Euphorbia tirucalli* L. -Euphorbiaceae
- 14- Samambaia-das-taperas: *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn - Pteridaceae
- 15- Salso-chorão: *Salix humboldtiana* Willd. -Salicaceae

Bioteste 3. Efeito de extratos de espécies vegetais, na dose de 1/3 (p/v) no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*, no quinto ínstar, em experimento delineado em blocos ao acaso (6 lagartas por repetição), realizado no laboratório, em março de 2003. Os extratos vegetais, a partir de folhas, foram adicionados às dietas na concentração de 25%. O bioteste constou dos seguintes tratamentos:

- 1) Testemunha: água destilada
- 2) Capim-santo: *Cymbopogon densiflorus* Stapf. - Poaceae
- 3) Ciprestre: *Cupressus sempervirens* L. - Cupressaceae
- 4) Eucalipto: *Eucalyptus citriodora* Hook. - Myrtaceae
- 5) Capim-cidrô: *Cymbopogon citratus* (Stapf.) DC. - Poaceae
- 6) Jurubeba: *Solanum paniculatum* L. - Solanaceae
- 7) Nim 0,125%: *Azadirachta indica* A. juss. -Meliaceae
- 8) Nim 0,0625%

Bioteste 4. Efeito de extratos de espécies vegetais, na dose de 1/3 (p/v) no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*, no segundo ínstar, em experimento delineado em blocos ao acaso (6 lagartas por repetição), realizado no laboratório, em março de 2003. Os extratos vegetais, a partir de folhas, foram adicionados às dietas na concentração de 25%. O bioteste constou dos seguintes tratamentos:

- 1) Testemunha: água destilada
- 2) Capim-santo: *Cymbopogon densiflorus* Stapf. - Poaceae
- 3) Ciprestre: *Cupressus sempervirens* L. - Cupressaceae
- 4) Eucalipto: *Eucalyptus citriodora* Hook. - Myrtaceae
- 5) Capim-cidrô: *Cymbopogon citratus* (Stapf.) DC. - Poaceae
- 6) Jurubeba: *Solanum paniculatum* L. - Solanaceae
- 7) Nim 0,125%: *Azadirachta indica* A. juss. - Meliaceae
- 8) Nim 0,0625%

6.4. Resultados e discussão

Os efeitos de extratos vegetais, adicionados à dieta de *Spodoptera frugiperda*, sobre o crescimento e desenvolvimento de lagartas desta espécie, em quatro biotestes, são apresentados nas tabelas a seguir.

Na Tabela 1, onde constam os dados de sobrevivência de lagartas, obtidos no Bioteste 1, observa-se que apenas o tratamento 6 (extrato aquoso de cinamomo a 1/3, p/v) diferiu significativamente da testemunha, determinando um índice de sobrevivência de 83,3%. Isto se deveu provavelmente a dois fatores: o avançado estágio de desenvolvimento dos insetos e a relativa pequena ingestão do extrato, aplicado apenas superficialmente. Atente-se ao fato de que as lagartas tenderam a alimentar-se evitando o consumo de dieta contaminada, fazendo galerias na mesma, utilizando apenas a parte interna. Por outro lado, a aplicação direta sobre as lagartas não deve ter produzido efeito, já que o extrato de *M. azedarach* atua apenas por ingestão, além de ser deterrente alimentar (HUANG et al., 1995; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1998). Para os demais caracteres, os insetos aparentemente não sofreram efeitos deletérios sob qualquer tratamento, e então não foram considerados.

TABELA 1. Valores médios para o caráter sobrevivência (S) em porcentagem de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em experimento, submetidas à aplicação de extratos de espécies vegetais na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório. 2005.

Tratamentos	Sobrevivência**
Água destilada	100,0 a
Destilado de ariticum	95,8 ab
Destilado de cinamomo	95,8 ab
Destilado de canela-de-cheiro	100,0 a
Extrato bruto fresco de cinamomo	83,3 b
Extrato bruto fresco de guaco	95,8 ab
C. V. %	14,4

** F-teste significativo a 1%
Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos no Bioteste 2. Como pode ser observado, o extrato de cinamomo não só promoveu efeitos significativos sobre todos os caracteres avaliados, como também determinou sobrevivência zero em *S. frugiperda*, mostrando alto grau de toxicidade desse extrato a este inseto, mesmo quando o consumo é pequeno e aplicado em estádios avançados de desenvolvimento. Isto corrobora com os resultados obtidos por outros autores (McMILLIAN et al., 1969; HUANG et al., 1995; HUANG et al., 1996; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1997; BOHNENSTENGEL et al., 1999; SOUZA & VENDRAMIM, 2000; TORRES et al., 2001; GAJMER et al., 2002), em experimentos, onde extratos de *M. azedarach* se mostraram eficientes no controle desse inseto.

TABELA 2. Valores médios para os caracteres consumo médio de dieta por indivíduo (C) em mg de matéria seca, sobrevivência de lagartas (S) em porcentagem, peso médio de pupas (P) em mg e viabilidade de pupas (V) em porcentagem, de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório. 2005.

Tratamentos	C **	S**	P**	V ^{ns}
Testemunha	283 abc	97,5 a	227,5 abcd	100,0
Arruda	266,75 abcd	92,5 a	206,8 cd	97,5
Aroeira-precoce	261 abcd	92,5 a	215,8 abcd	100,0
Aroeira-preta	272 abc	95,0 a	209,8 bcd	95,0
Alamandra	316,5 abc	92,5 a	240,8 a	97,5
Ariticum	322,25 abc	97,5 a	230,0 abcd	97,2
Angico-vermelho	260 abcd	92,5 a	228,5 abcd	97,5
Babosa	320 abc	100,0 a	232,5 abc	97,5
Cinamomo	162,5 d	0,0 b	-	-
Espirradeira	346,25 ab	92,5 a	201,25 d	86,4
Guaco	356 a	97,5 a	241,5 a	97,5
Mamona	295,5 abc	92,5 a	205,8 cd	95,0
Aveloz	241,25 bcd	92,5 a	230,0 abcd	97,5
Samambaia	332,25 ab	97,5 a	231,5 abcd	92,5
Salso-chorão	216,75 cd	90,0 a	238,8 ab	90,0
Média	283,5	-	224,3	-
Desvio padrão	42,4	-	12,2	-
C. V. %	15,0	16,0	5,4	17,6

** F-teste significativo a 1%

^{ns} F-teste não significativo a 5%

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos com o Bioteste 3, quando foram aplicados extratos de espécies vegetais na dieta artificial de lagartas *S. frugiperda* no quinto ínstar. Como mostram os resultados, as duas doses de nim (0,1250% e 0,0625%), além de determinarem os menores consumos de dieta, causaram efeitos drásticos na sobrevivência de lagartas, peso final de lagartas e viabilidade de pupas. Estes resultados confirmam os obtidos por outros autores, que atestam o poder de deterrente alimentar e de alta toxicidade por ingestão, do óleo de nim, principalmente em lepidópteros (SCHMUTTERER, 1988; ISMAN et al., 1990; SCHMUTTERER, 1990; WILPS et al., 1992; ADEL & SCHNAL, 2000; MORDUE & NISBET, 2000; TRINDADE et al., 2000; GELBIC & NEMEE, 2001; MARTINEZ & EMDEN, 2001; MANCEBO et al., 2002; LIANG et al., 2003).

Dentre os demais extratos avaliados, somente o de *E. citriodora* destacou-se. Apesar de não causar efeitos deletérios significativos, mesmo que valores médios para sobrevivência de lagartas, peso de pupas e viabilidades de pupas tenham sido menores, o consumo de dieta foi significativamente menor que a testemunha, denotando ação repelente ou de deterrência alimentar. Provavelmente os efeitos deletérios se acentuariam se o experimento fosse elaborado a partir de instares mais precoces. Extratos de eucalipto têm sido relatados como tóxicos a insetos, inclusive lepidópteros (COITINHO et al. 2004; MENEGATT et al., 2004; OLIVEIRA et al. 2004).

TABELA 3. Valores médios para os caracteres consumo médio por parcela (C) em gramas, sobrevivência de lagartas (S) em porcentagem, peso médio de pupas (P) em mg e viabilidade de pupas (V) em porcentagem, de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório. 2005.

Tratamentos	C**	S**	P**	V
1) Testemunha	150,5 a	91,7 a	201,0 a	100
2) Capim-santo	134,2 a	87,5 a	199,0 a	95,2
3) Cipreste	144,2 a	91,7 a	196,5 a	100
4) Eucalipto	87,2 bc	79,2 a	188,2 a	94,7
5) Capim-cidró	140,2 a	83,3 a	192,2 a	100
6) Jurubeba	132,1 a	87,5 a	198,2 a	95,2
7) Nim 0,125%	67,5 c	0,0 b	-	-
8) Nim 0,0625%	100,6 b	8,3 b	10,5 b	0
Média	119,5	-	-	-
C. V. %	10,2	26,8	5,5	-

** F-teste significativo a 1%

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

O Bioteste 4 (Tabela 4) tem como diferença na elaboração, relativamente ao Bioteste 3, apenas o número de repetições (cinco) e o estágio das lagartas de *S. frugiperda* tratadas, que estavam no segundo instar. Como era de se esperar, pela maior sensibilidade nos estádios iniciais, as duas doses de nim (0,1250 e 0,0625%) tiveram efeitos mais drásticos ainda, de tal forma que nenhum inseto sobreviveu (0%). Igualmente, corroborando com resultados obtidos por outros autores (COITINHO et al. 2004; MENEGATT et al., 2004; OLIVEIRA et al. 2004), *E. citriodora* determinou sobrevivência zero em *S. frugiperda*. Cumpre ainda ressaltar que o extrato de *Solanum paniculatum* (jurubeba) promoveu efeitos deletérios nos caracteres peso e viabilidade de pupas, este último alcançando o valor médio de apenas 44%.

TABELA 4. Valores médios para os caracteres sobrevivência de lagartas (S) em porcentagem, peso médio de pupas (P) em mg e viabilidade de pupas (V) em porcentagem, de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de espécies vegetais, na concentração de 1/3 (p/v), em laboratório. 2005.

Tratamentos	S**	P**	V**
1) Testemunha	94,0 a	218 a	86 a
2) Capim-santo	92,0 a	218 a	78 a
3) Cipreste	90,0 a	204 a	74 a
4) Eucalipto	0,0 b	-	-
5) Capim-cidró	90,0 a	226 a	68 ab
6) Jurubeba	86,0 a	150 b	44 b
7) Nim 0,125%	0,0 b	-	-
8) Nim 0,0625%	0,0 b	-	-
Média	-	203,2	-
Desvio padrão	-	21,1	-
C. V. %	9,6	10,4	19,2

** F-teste significativo a 1%

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

6.5. Conclusões

Os experimentos realizados permitem concluir que:

✓ O óleo de *Azadirachta indica*, mesmo em doses relativamente baixas (0,1250% e 0,0625%), adicionado à dieta de *S. frugiperda*, em laboratório, é extremamente tóxico a esta espécie, até mesmo em estádios (ínstares) de desenvolvimento mais avançados.

✓ O extrato aquoso de folhas de *Melia azedarach*, na concentração de 1/3 (p/v), adicionado à dieta de *S. frugiperda*, em laboratório, é tóxico a este inseto-praga, mesmo em sendo aplicado em estádios ou instares de desenvolvimento larval mais avançados.

- ✓ O extrato aquoso de folhas de *Eucalypto citriodora*, na concentração de 1/3 (p/v), adicionado à dieta de *S. frugiperda*, em laboratório, é tóxico a este inseto-praga, quando aplicado em estádios iniciais de desenvolvimento, como no segundo instar.
- ✓ O extrato aquoso de folhas de *S. paniculatum*, na concentração de 1/3 (p/v), adicionado à dieta de *S. frugiperda*, em laboratório, promove efeitos deletérios nesta espécie, quando aplicado no segundo instar de desenvolvimento larval.
- ✓ A presença de agentes inseticidas em alguns extratos, detectados nos experimentos, através da metodologia utilizada e que se mostrou eficiente, permite concluir que há um imenso potencial a explorar nas espécies vegetais, na busca por uma agricultura mais sustentável.

7. AVALIAÇÃO DA AÇÃO INSETICIDA DO EXTRATO DE *Melia azedarach* L. VAR. UMBRACOLIFERA (KNOX) REHDER (MELIACEAE) EM LAGARTAS DE *Spodoptera Frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

Visando avaliar o efeito de *Melia azedarach* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*, doses do extrato aquoso de folhas desta meliácea (0; 0,31; 0,52; 0,62; 1,04; 1,25; 2,02; 2,50; 4,17; 5,00; 8,33; 16,67 e 33,33%, p/v) foram testadas em lagartas desta espécie, em três experimentos, no laboratório (fotofase natural, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $65 \pm 10\%$) do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS), no período de março a dezembro de 2003. Preliminarmente todo o material foi desinfetado com hipoclorito de sódio a 0,5%, por um minuto e lavado após com água potável. Após trituração e filtragem, o extrato aquoso foi incorporado a 25% nas dietas fornecidas às lagartas, visando simular o consumo no campo, quando aplicado sobre folhas de milho (*Zea mays*). As lagartas foram sempre mantidas individualmente em frascos de plástico de 100 mL, com as respectivas dietas (em torno de 3 a 4 gramas). Em dois bioensaios as dietas contendo as diversas doses de extrato de *M. azedarach* foram oferecidas às lagartas na forma crônica. Noutro bioensaio, os insetos consumiram dietas com tratamento apenas por cinco dias. Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso com quatro repetições, 24 lagartas por tratamento no primeiro bioensaio e 80

lagartas por tratamento nos demais. A partir dos dados de observação coletados (sobrevivência de lagartas, consumo de dieta, peso de lagartas, peso de pupas e viabilidade de pupas), submetidos à análise estatística, foi possível alcançar os objetivos propostos neste trabalho. Nos dois testes com fornecimento de dieta tratada durante todo o tempo de experimentação, mesmo as concentrações menores, como as de 0,52 e 0,31%, tiveram efeitos deletérios drásticos sobre *S. frugiperda*, inviabilizando totalmente o ciclo de vida do inseto. Até mesmo no experimento onde o consumo de dieta tratada foi temporário, apesar do número relativamente alto de pupas viáveis, as mariposas oriundas não conseguiram proliferar. Concluiu-se que o extrato de *Melia azedarach* contém componentes extremamente tóxicos e antialimentares à *Spodoptera frugiperda*, o que torna esta espécie mais promissora que o nim (*Azadirachta indica*) para a Região Sul do Brasil, pela maior disponibilidade de material para preparação de extratos, pela maior adaptação dessa espécie e pela maior sustentabilidade que significa a coleta de folhas, sem comprometimento da planta.

Abstract

With the objective of evaluating the effect of *Melia azedarach* on *Spodoptera frugiperda*, doses from aqueous extract of this Meliaceae (0; 0.31; 0.52; 0.62; 1.04; 1.25; 2.02; 2.50; 4.17; 5.00; 8.33; 16.67 and 33.33%, w/v) were tested on larvae, by three experiments in the laboratory (natural photophase, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, HR $65 \pm 10\%$) at Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil), from March to December 2003. The extract was included in diets at 25%, simulating field conditions, when the liquid is sprayed on leaves of *Zea mays*. The worms were maintained individually in flasks of 100 mL, containing the diets (about 3 or 4 g). In two bioassays the doses of extract were always present in diet. In another,

insects were in contact with the extract by five days. Preliminary, all the material was disinfected with sodium hypochlorite at 0.5%, for one minute. The experiments were conducted in randomized complete block, four repetitions, 24 (one bioassay) and 80 (two bioassay) larvae by treatment. From the observations collected (larval survival, consumption dry matter of diet, larval weight, pupal weight and pupal viability), submitted to statistical analysis, it was possible to get the objectives proposed in this work. In two tests with chronic treatment, including the lower doses (0.52% and 0.31%), all characters analyzed on *S. frugiperda* were affected, reducing the pupal viability to zero. In the bioassay with temporary treatment even under lower dose (0.52%) adult insects didn't produce descendants. Hence, *Melia azedarach* certainly contains extremely toxic and deterrent compounds to *Spodoptera frugiperda*. Due *M. azedarach* having more adaptation to South Region of Brazil than *Azadirachta indica*, in addition to more availability of material (plants and leaves) and the use of leaves for making extracts, it's possible to affirm that this species is more promising than nim and more adequate for a more sustainable agriculture.

7.1. Introdução

Muito antes dos inseticidas sintéticos, os produtos ou extratos de vegetais, já eram utilizados no controle de pragas de lavouras, principalmente nos países tropicais, onde este problema sempre tem sido mais sério, mas ao mesmo tempo, e exatamente por isso, a disponibilidade de espécies contendo metabólitos de defesa é muito maior, comparativamente com regiões mais frias da Terra. De acordo com LAGUNES & RODRIGUES (1989) os primeiros inseticidas de origem vegetal que se tem notícia são principalmente a nicotina, a piretrina, a rotenona e a sabadilha.

Os inseticidas vegetais foram superados pelos produtos sintéticos pela maior eficiência e economicidade destes, quando ainda então não se tinha conhecimento dos efeitos que os novos defensivos agrícolas tinham na saúde e no ambiente. Se a tecnologia anterior estava defasada e necessitava inexoravelmente ser substituída pela nova tecnologia dos produtos da química moderna, esta, por sua vez, também está completando seu ciclo, para dar espaço a uma nova era tecnológica. O princípio do movimento recursivo (MATURANA, 2001) também aqui se aplica, quando os extratos vegetais voltam à cena, mas num novo patamar. Os antibióticos, os agrotóxicos, enfim, os biocidas atuais não mais satisfazem as necessidades da medicina, da agricultura ou mesmo da indústria. Como instrumentos que são, os agrotóxicos na agricultura estão no fim da sua vida útil. Os extratos vegetais voltam novamente a serem estudados, mas com outros objetivos: municiar a química ultramoderna e a biotecnologia, respectivamente, com novas estruturas moleculares modelos para a síntese de derivados e com novos genes de resistência, que com o fim da barreira entre as espécies, alcançado pela ciência, passa a ser uma nova arma na defesa dos cultivos agrícolas contra as pragas.

O presente trabalho pretendeu avaliar a bioatividade em laboratório do extrato de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*) fornecido na dieta artificial de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), visando fornecer subsídios a novas avaliações a partir do fracionamento de compostos, bem como para a realização de ensaios de campo, no controle de lepidópteros pela aplicação direta dos extratos de folhas. Os bioensaios foram realizados nos laboratórios do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS), 2003.

7.3. Revisão de literatura

As famílias das Meliaceae, Asteraceae, Labiaceae, Aristolochiaceae e Annonaceae têm sido as principais fontes de metabólitos secundários com potencial de causar efeitos no crescimento e desenvolvimento de insetos e outras pragas (SCHMUTTERER, 1990).

Resultados obtidos nos últimos anos têm elevado a família Meliaceae a um grau de destaque importante, principalmente para o controle de insetos mastigadores, especialmente lepidópteros (VENDRAMIM & SCAMPINI, 1997).

Dentre as espécies vegetais mais estudadas atualmente, o nim (*Azadirachta indica*) da família das meliáceas, tem sido a principal. Estudos a partir do nim têm sido os grandes responsáveis pelo interesse na busca de novas moléculas praguicidas a partir das plantas, principalmente pelo fato da azedaractina ter ação comparável a muitos inseticidas sintéticos e ação muito específica em processos bioquímicos e de desenvolvimento muito peculiares dos insetos (KLOCKE, 1987). Certamente isto também provocou o interesse de pesquisas em outras espécies da família das meliáceas como *Melia azedarach* e *Trichillia spp.*

Usada há muitos anos principalmente na Índia, para muitíssimas finalidades (inseticida, nematicida, vermífugo, bactericida, fungicida e outros), essa espécie encontra-se disseminada por várias regiões do mundo, principalmente de clima tropical e algumas de clima subtropical (SCHMETTERER, 1990; MARTINEZ, 2002). No Brasil o nim encontra-se distribuído principalmente do Paraná para cima (MARTINEZ, 2002; NEVES & NOGUEIRA, 1996). Entretanto, em regiões mais frias do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, esta espécie não deve adaptar-se bem, já que temperaturas abaixo de 4 °C podem levar à morte principalmente as plantas mais jovens (MARTINEZ, 2002).

Os resultados obtidos com *A. indica* foram tão promissores pelo número de pragas controladas por seus extratos, principalmente insetos

(VENDRAMIM & SCAMPINI, 1997; BOGORNI, 2003), que houve um crescimento muito grande do interesse inclusive por outras espécies da família das meliáceas, principalmente o cinamomo (*M. azedarach*) e triquília (*T. palida*).

Os problemas de adaptação de *A. indica* em regiões de clima subtropical não se limitam somente às baixas temperatura, mas também relativamente a outros caracteres. Tanto isto é verdade, que o Instituto de Pesquisas Agronômicas do Paraná (IAPAR) realiza atualmente pesquisas no sentido de enxertar ramos de nim sobre *M. azedarach*, visando maior precocidade e produtividade (MARTINEZ, 2002), prejudicadas pela falta de adaptação de *A. indica* em regiões mais frias.

A espécie *M. azedarach* está muito bem adaptada ao Sul do Brasil e poderia certamente ser uma alternativa mais viável que o próprio nim, se seus extratos forem quase ou tão eficientes quanto este. Acrescente-se que o cinamomo é largamente distribuído no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, tanto que poderia ser utilizado quase que de imediato, da mesma forma que é utilizado o nim, que praticamente não está disponível aos nossos agricultores e indústria desta região.

Trabalhos científicos com extratos de *Melia azedarach* ainda são poucos quando comparados com o que se dispõe atualmente sobre *Azadirachta indica*, mas atestam a eficiência dessa espécie como promissora enquanto excipiente de aleloquímicos poderosos no controle de pragas. Dentre os reagentes mais utilizados, *Spodoptera frugiperda* têm sido o mais comum, provavelmente pelas menores dificuldades nas criações artificiais e pela importância deste inseto como praga agrícola.

Um dos trabalhos científicos mais antigos que se dispõe na literatura talvez seja o de McMILLIAN et al. (1969) que adicionaram extratos de folhas de cinamomo à dieta artificial (1% e 3%) provocando mortalidade de 90 e 100% em lagartas de *Spodoptera frugiperda*, respectivamente, além de afetarem significativamente outros caracteres como peso, tamanho e taxa de alimentação das lagartas.

No Brasil cresce cada vez mais o interesse por *Melia azedarach* e avolumam-se estudos sobre o potencial inseticida desta espécie.

RODRIGUES & VENDRAMIM (1997) testaram extratos de folhas e ramos de cinamomo a 1%, que fornecidos às lagartas, incorporados à dieta, provocaram mortalidade de 100% em *Spodoptera frugiperda*. Os mesmo autores (RODRIGUES & VENDRAMIM, 1998) avaliaram novamente extratos de cinamomo adicionados à dieta de lagartas de *S. frugiperda* demonstrando que os componentes dos extratos dessa meliácea inibem a ingestão de alimento, resultando em menor peso e alongamento da fase larval.

O interesse despertado no Brasil na família das meliáceas pode ser comprovado pelo último Congresso Brasileiro de Entomologia (2004). Diversos autores apresentaram trabalhos, onde extratos de *Trichillia* spp. e de *M. azedarach* foram testados contra insetos, com eficiência, comparativamente com outros extratos, inclusive com o de nim.

VENDRAMIM & BOGORNI (2004) avaliaram extratos de seis espécies de *Trichillia* spp. contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* no primeiro instar. Todos os extratos mostraram diversos graus de eficiência, com efeitos deletérios mais notórios para *T. pallida* e *T. pallens*, que afetaram diversos parâmetros analisados. Extratos de *T. pallida*, por sua vez, aplicados também sobre *S. frugiperda*, causaram mortalidade de 84% (ROCHA et al., 2004). A partir do fracionamento destes, foram identificados três limonóides, avaliados em novo bioensaio, causando os seguintes índices de mortalidade em lagartas tratadas no primeiro instar: Gedunina, 69%; 22-desacetilgedunina, 78%; e limonina, 92%. Tais resultados comprovaram a atividade inseticida dos limonóides isolados de frutos de *Trichillia pallida* para *Spodoptera frugiperda*. Em outro experimento, extratos de *T. pallida*, desta vez aplicados em *Tuta absoluta*, provocaram mortalidade larval de 93% aos 10 dias após a infestação, em avaliações realizadas por CUNHA et al. (2004).

No Congresso Brasileiro de Entomologia de 2004, PARUSSOLO et al. (2004) apresentaram trabalho demonstrando a eficiência do cinamomo (*M. azedarach*) sobre *S. frugiperda*, quando extratos a 1% desta meliácea mostraram eficiência acima de 80% no controle de lagartas. No mesmo evento, SILVEIRA et al. (2004) relataram experimento a campo na cultura do milho, onde extratos vegetais de nim (*Azadirachta indica*), cinamomo (*Melia azedarach*) e *Trichillia pallida* foram aplicados sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Os autores concluíram que estes extratos vegetais, com uma só aplicação, determinaram uma menor infestação da praga, mas não o suficiente como único método de controle, mas que aplicações sucessivas podem trazer resultados mais promissores. De qualquer forma, o extrato de cinamomo, apresentou resultados semelhantes ao de nim e triquília.

Os extratos de cinamomo têm sido testados também contra outros insetos importantes, como pragas agrícolas.

SOUZA & VENDRAMIM (2000) demonstraram a eficiência de extratos de frutos verdes de *M. azedarach* contra ninfas de *Bemisia tabaci*, apesar dos índices de mortalidade serem inferiores aos obtidos com extratos de *A. indica* e *T. pallida*. TORRES et al. (2001) também avaliaram a ação inseticida do extrato de frutos verdes de cinamomo, mas contra *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas), comparativamente com óleo de nim (*A. indica*). Quando a eficiência do óleo de nim chegou a 100% de mortalidade de larvas deste inseto, o extrato de frutos de cinamomo a 10% (p/v) alcançou 96% de lagartas mortas. GAJMER et al. (2002) trabalhando com extratos metanólicos de sementes de nim e de cinamomo no controle de *Earias vittella* inferiram que ambas as espécies contêm componentes importantes com efeitos adversos sobre o crescimento e desenvolvimento deste inseto, com ação mais severa dos extratos de *A. indica*. Por outro lado, BRUNHEROTO (2000), testando extratos de diferentes estruturas vegetais de cinamomo contra *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro), comparativamente com extrato de nim,

concluiu que os extratos de folhas são mais eficientes que as demais partes da planta, de tal forma que a concentração de 0,1% (p/v) foi considerada adequada para estudos de bioatividade de *M. azedarach*. Na mesma concentração (0,1%), o extrato de sementes de *A. indica* mostrou maior atividade inseticida que o de folhas de cinamomo. Entretanto isto não deve significar obrigatoriamente maior eficiência dos metabólitos contidos numa ou outra espécie vegetal, já que componentes, com maior ou menor atividade inseticida, diferem de espécie para espécie e ainda podem estar em maior ou menor concentração nos extratos.

O crescente interesse em pesquisar extratos de cinamomo começou a surtir efeito também na área de química, objetivando desvendar estruturas moleculares de compostos bioativos presentes nesta espécie, que a se julgar pelo nim, devem também ser às dezenas. Se o nim apresenta vantagens como a baixa toxicidade a mamíferos e degradação rápida em contato com os componentes ambientais (SCHMUTTERER, 1990), é de se esperar condições semelhantes dos extratos de cinamomo, pelo menos em relação à segurança ambiental, já que relativamente pouco se sabe sobre os componentes desta espécie e sua toxicidade.

HUANG et al. (1995) Isolaram uma nova meliacarpinina, seis trichilinas e três azedaractinas, azedaractina a, 12-O-acetilazedaractina A e 12-O-acetilazedaractina B, como agentes antialimentares em cinamomo. Em continuidade a tais estudos, os autores isolaram outro importante limonóide antialimentar, batizado como azedaractina C, diferente dos demais, por ter um oxigênio sem função no carbono 12. Mais tarde HUANG et al., (1996), com uma equipe maior, isolaram outros dois importantes limonóides antialimentares, salanal e meliacarpinina, em *Melia azedarach*, entre quatro limonóides já conhecidos, salanina, deacetilsalanina, nimbolinina B e nimboldina B.

Três anos depois, BOHNENSTENGEL et al. (1999) desvendaram as estruturas moleculares de três novas meliacarpinas, denominadas 1,3-dicinamoil-11-hidroxi meliacarpina, 1-cinamoil-3-metacrilil-11

hidroximeliacarpina e 1-cinamoil-3-acetil-11-hidroximeliacarpina, como principais constituintes inseticidas e reguladores (desruptores) do crescimento de folhas de cinamomo. Estas propriedades foram comprovadas contra *Spodoptera littoralis* e comparáveis com a azedaractina do nim, quando incorporadas na dieta artificial e oferecidas a larvas, em ensaio crônico de alimentação.

Assim, se as propriedades dos extratos de cinamomo são semelhantes aos do nim, cresce em importância avançar nos estudos de *M. azedarach*, objetivando oferecer aos nossos produtores e indústria uma opção mais viável economicamente. Mesmo em regiões do Brasil onde o nim se adapta melhor, não há ainda matéria-prima suficiente, o que determina o encarecimento do produto. Na Região Sul, acrescenta-se ainda a falta da adaptação de *A. indica*, enquanto que o cinamomo, bem adaptado e de rápido crescimento, é ainda fartamente distribuído nesta região. E se as propriedades inseticidas mais importantes estão nas folhas, como tudo indica, a disponibilidade de matéria-prima torna-se ainda maior, tanto em quantidade, quanto no período de coleta.

7.3. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, 2003).

A partir de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em diversos ínstares, criadas em dieta artificial desenvolvida no Departamento de Defesa Fitossanitária (PARRA,1996, modificada), diversas doses de extrato aquoso de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*) foram incorporadas na dieta, visando avaliar o efeito do mesmo no crescimento e desenvolvimento desses insetos.

Os extratos brutos frescos foram preparados a partir de folhas verdes trituradas em liquidificador doméstico por dois minutos e depois coadas através de tecido de algodão. Preliminarmente todo o material foi desinfetado com hipoclorito de sódio a 0,5%, por um minuto. Os extratos foram incorporados a 25% nas dietas fornecidas às lagartas, visando simular o consumo no campo, quando aplicado sobre folhas de milho (*Zea mays*). As lagartas foram sempre mantidas individualmente em frascos de plástico de 100 mL, com as respectivas dietas preliminarmente pesadas (matéria seca).

A partir dos dados de observação colhidos (sobrevivência de lagartas, consumo de dieta, peso de lagartas, peso de pupas e viabilidade de pupas), em experimentos fatoriais conduzidos em blocos ao acaso submetidos à análise estatística de acordo com o pacote estatístico NTIA/EMBRAPA (Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia, cedidos pela EMBRAPA 1986, 1988, 1989) foi possível alcançar os objetivos propostos no trabalho.

Os biotestes realizados tiveram as seguintes características:

Bioteste1

Diversas doses de extrato aquoso de cinamomo, especificadas abaixo, foram adicionadas à dieta artificial e fornecidas a lagartas no terceiro ínstar de maneira crônica. Experimento em blocos ao acaso, com quatro repetições e 6 lagartas por parcela (24 lagartas por tratamento), realizado no dia 15 de março de 2003.

Tratamentos

- 1 - Testemunha ou água destilada (0)
- 2- 1/192 ou 0,52% (p/v)
- 3- 1/96 ou 1,04% (p/v)
- 4- 1/48 ou 2,02% (p/v)
- 5- 1/24 ou 4,17% (p/v)
- 6- 1/12 ou 8,33% (p/v)

7- 1/6 ou 16, 67% (p/v)

8- 1/3 ou 33,33% (p/v)

Bioteste 2

Similarmente ao ensaio anterior, o experimento, em blocos ao acaso, com quatro repetições, teve 80 lagartas no segundo ínstar por tratamento (20 por parcela) e foi realizado dia 20 de junho de 2003.

Tratamentos:

1- Testemunha ou água destilada (0)

2- 1/320 ou 0,31% (p/v)

3- 1/160 ou 0,62% (p/v)

4- 1/80 ou 1,25% (p/v)

5- 1/40 ou 2,50% (p/v)

6- 1/20 ou 5,00% (p/v)

Bioteste 3

Diversas doses (especificadas a seguir) de extrato aquoso de *M. azedarach* foram fornecidas á dieta artificial de lagartas *S. frugiperda* no segundo ínstar, por cinco dias. A partir de então, aos insetos foi oferecida dieta normal (a mesma da testemunha). Experimento conduzido em blocos ao acaso com quatro repetições e 20 lagartas por parcela (80 por tratamento), realizado no dia 04 de dezembro de 2003.

Tratamentos:

1 - Testemunha ou água destilada (0)

2- 1/192 ou 0,52% (p/v)

3- 1/96 ou 1,04% (p/v)

4- 1/48 ou 2,02% (p/v)

5- 1/24 ou 4,17% (p/v)

6- 1/12 ou 8,33% (p/v)

7- 1/6 ou 16, 67% (p/v)

8- 1/3 ou 33,33% (p/v)

7.4. Resultados e discussão

Os efeitos de doses de extrato de *M. azedarach*, adicionado à dieta de *Spodoptera frugiperda*, sobre o crescimento e desenvolvimento de lagartas desta espécie, em três biotestes, são apresentados nas tabelas a seguir.

Na Tabela 1 são expressos os valores médios para diversos caracteres analisados no Bioteste 1. Fornecidas na dieta das lagartas, as sete doses de extrato de *M. Azedarach* (de 33,33% a 0,52%) acabaram determinando mortalidade total dos insetos, mesmo que sob doses menores estes tenham resistido por mais tempo. Sob a dose de 0,52% ainda sobreviveram e chegaram a formar pupas 8,3% de lagartas, após 50 dias de ciclo; entretanto estas poucas pupas formadas foram totalmente inviáveis. Oferecidos os tratamentos de forma crônica, há que se indagar se o fornecimento por um tempo limitado de extrato, poderia determinar a recuperação das lagartas sob determinadas doses. Há que se acrescentar que para todas as doses o consumo de dieta foi extremamente inferior ao da testemunha.

Noutro experimento (Bioensaio 2, Tabela 2) as doses de extrato de folhas de *M. azedarach* variaram de 5,00% a 0,31%. De forma semelhante ao que aconteceu no Bioteste 1, no Bioteste 2 não houve praticamente sobrevivência de lagartas para todos as doses testadas. Mesmo na dose de 0,31% as lagartas (13,8%) sobreviventes aos 40 dias não conseguiram gerar pupas viáveis. Isto era de se esperar, pois como pode ser observado na Tabela 2, as lagartas tratadas com 0,31% de extrato de *M. azedarach* alcançaram o peso médio de 76,9 mg, enquanto que na testemunha o valor médio alcançado foi de 294,2 mg. Compare-se também o consumo de dieta em matéria seca que chegou a 644,2 mg na testemunha, contra 55,0 mg no tratamento referido. Resta também saber

se os tratamentos não fossem aplicados de forma crônica, qual seria a capacidade de recuperação desses insetos.

No Bioteste 3, apresentado nas Tabela 3 e Tabela 4, foi possível uma resposta parcial a esta questão, já que os tratamentos, adicionados às dietas foram fornecidos apenas por cinco dias, para lagartas no segundo instar. Somente para a dose de 0,52% houve a formação de pupas viáveis. Entretanto, de 23,8% de sobrevivência de lagartas aos 65 dias da instalação do ensaio, ou seja, 19 de 80 lagartas sobreviveram para formar pupas, com peso médio de 164,3 mg, contra 240,4 da testemunha. Destas pupas, 12 transformaram-se em mariposas. Estas mariposas, conduzidas para reproduzir coletivamente, não produziram prole. Neste experimento, como pode ser observado na Tabela 4, não foi detectado consumo de dieta normal (sem extrato, do sexto dia em diante), a partir da dose de 2,02% e mesmo para os tratamentos com 0,52 e 1,04% este consumo foi muito pequeno (89,1 e 11,4 mg, respectivamente), comparativamente com a testemunha (520,5). O consumo de dieta tratada em cinco dias foi tão pequeno que não foi possível detectar nada para nenhuma das doses, com exceção da testemunha, cujo consumo chegou a 10,6 mg de matéria seca por lagarta.

Estes resultados corroboram com os obtidos por todos os autores que trabalharam com extratos de *M. azedarach* em *S. frugiperda* (McMILLIAN et al., 1969; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1997; RODRIGUES & VENDRAMIM, 1998; PARUSSOLO et al., 2004; SILVEIRA et al., 2004) e que demonstram a alta eficiência também contra outras pragas (SOUZA & VENDRAMIM, 2000; BRUNHEROTO, 2000; TORRES et al., 2001; GAJMER et al., 2002), comparável aos extratos de nim (*A. indica*).

O extrato de *M. azedarach*, como demonstram os resultados constantes na Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 4, além de extremamente tóxico a *S. frugiperda*, parece ter ação anti alimentar (deterrente alimentar), mesmo sob concentrações relativamente baixas. Esta ação deterrente parece ser tão eficiente que mesmo no experimento em que o

extrato de cinamomo foi oferecido às lagartas por apenas 5 dias, a volta à dieta normal não só não significou uma melhora na performance dos insetos devido à toxidez dos componentes do referido extrato, como também não determinou uma melhora significativa no consumo final de dieta, como também foi observado por RODRIGUES & VENDRAMIM, 1998. A ação anti alimentar e a toxidez de *M. azedarach* parece também estar de acordo com os resultados obtidos por HUANG et al. (1995) e HUANG et al. (1996), que identificaram diversos compostos tóxicos anti alimentares, inclusive semelhantes àqueles encontrados em *A. indica*. BOHNENSTENGEL et al. (1999), igualmente desvendaram as estruturas moleculares de três novas meliacarpinas, como principais constituintes inseticidas e reguladores (desruptores) do crescimento de folhas de cinamomo, comparáveis à azedaractina do nim.

Devido aos efeitos drásticos, mesmo de doses mais baixas do extrato de cinamomo em diversos caracteres avaliados, tornou desnecessário estabelecer curvas de regressão, demonstrando a necessidade de utilização de concentrações ainda mais baixas nos bioensaios.

A família Meliaceae, a qual pertence *M. azedarach* tem sido muito promissora (VENDRAMIM & SCAMPINI, 1997) no controle de insetos mastigadores. A eficiência do extrato de *M. azedarach* ganha mais importância ainda quando os compostos mais tóxicos aos insetos, ou pelo menos em maior concentração, estão nas folhas (McMILLIAN et al., 1969; BRUNHEROTO, 2000, tornando mais sustentável a utilização do cinamomo, pois a coleta dessas estruturas, além da maior quantidade e por mais tempo, não comprometeria a sobrevivência da árvore. BRUNHEROTO (2000) ainda acrescenta que a concentração de 0,1% (p/v) foi adequada para estudos de bioatividade de *M. azedarach*, o que ratifica as avaliações feitas por outros autores citados anteriormente e neste trabalho de pesquisa. A maior adaptação de *M. azedarach*, comparativamente com *A. indica*, que não suporta temperaturas abaixo de 4 °C (MARTINEZ, 2002), muito comuns na Região Sul do Brasil, coloca o

cinamomo numa situação promissora ímpar, sugerindo maior ênfase do uso dessa meliácea em pesquisas científicas. Diante de todas estas evidências, *M. azedarach* parece ser mais promissora do que *A. indica* no Sul do Brasil.

TABELA 1. Valores médios para os caracteres sobrevivência aos 5 dias (S5), 10 dias (S10), 15 dias (S15), 20 dias (S20) e final (Sf) em porcentagem; viabilidade de pupas (V) em porcentagem e consumo de matéria seca de dieta em miligramas por parcela, de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*), em diversas doses (p/v), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S5**	S10**	S15**	S20**	Sf**	V**	C**
0,00	100,0	100,0	91,7	91,7	91,7	90,9	603,3
0,52	91,7	91,7	62,5	37,5	8,3	0,0	25,0
1,04	83,3	79,2	45,8	16,7	0,0	0,0	26,1
2,02	75,0	66,7	20,8	0,0	0,0	0,0	29,7
4,17	58,3	54,2	0,0	0,0	0,0	0,0	35,8
8,33	50,0	45,8	0,0	0,0	0,0	0,0	32,2
16,67	45,8	45,8	0,0	0,0	0,0	0,0	22,5
33,33	41,7	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	23,6
C. V. %	19,2	19,1	24,1	35,8	66,1	53,6	19,2

** F-teste significativo a 1%

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

Observações: Empupamento na testemunha aos 15 dias da instalação do experimento e nos demais tratamentos, quando ocorreu, chegou até 50 dias.

TABELA 2. Valores médios para os caracteres sobrevivência aos 5 dias (S5), 10 dias (S10), 15 dias (S15), 20 dias (S20) e 40 dias (S40) em porcentagem; peso de lagartas aos 15 dias (P15) em mg, peso de lagartas aos 20 dias (P20) e consumo de matéria seca de dieta em mg por parcela (C), de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*), em diversas doses (p/v), em laboratório. 2005.

Dose%	S5 ^{ns}	S10 ^{**}	S15 ^{**}	S20 ^{**}	S40 ^{**}	P15 ^{**}	P20 ^{**}	C ^{**}
0,00	98,8	97,5	97,5	97,5	97,5	294,2	294,2	644,2
0,31	97,5	95,0	90,0	67,5	13,8	57,4	76,9	55,0
0,62	98,8	93,8	85,0	60,0	0,0	37,2	37,2	32,5
1,24	98,8	93,8	85,0	63,8	0,0	28,0	24,2	30,2
2,50	95,0	83,8	83,8	31,2	0,0	21,8	24,9	46,5
5,00	96,2	72,5	40,0	3,8	0,0	13,0	13,0	23,0
C.V.%	7,6	10,7	9,6	19,4	22,9	19,9	22,9	17,8

** F-teste significativo a 1%

^{ns} F-teste não significativo a 5%

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

Observações: Empupamento aos 18 dias na testemunha.

TABELA 3. Valores médios para os caracteres sobrevivência aos 5 dias (S5), 10 dias (S10), 15 dias (S15), 20 dias (S20), 40 dias (S40) e 65 dias (S65) em porcentagem; e viabilidade de pupa (V) em porcentagem, de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*), em diversas doses (p/v), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	S5**	S10**	S15**	S20**	S40**	S65**	V**
0,00	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	95,0
0,52	95,0	91,2	86,2	76,2	55,0	23,8	66,7
1,04	96,2	90,0	75,0	52,5	12,5	3,8	0,0
2,02	96,2	53,8	25,0	8,8	1,2	0,0	0,0
4,17	93,8	41,2	12,5	2,5	0,0	0,0	0,0
8,33	96,2	30,0	11,2	1,2	0,0	0,0	0,0
16,67	97,5	17,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
33,33	97,5	28,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C. V. %	8,1	9,5	17,2	24,2	21,8	29,0	71,0

** F-teste significativo a 1%

^{ns} F-teste não significativo a 5%

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si (teste Tukey 5%)

Observações: Empupamento na testemunha aos 19 dias.

TABELA 4. Valores médios para os caracteres peso final de lagartas (PI) em mg, peso de pupas em mg, consumo de matéria seca de dieta em mg por parcela aos 5 dias (5d) de tratamento e consumo total de dieta normal, de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda*, tratadas com extratos frescos aquosos de folhas de cinamomo (*Melia azedarach*), em diversas doses (p/v), em laboratório. 2005.

Dose (p/v)	PI**	Peso pupas**	Consumo 5d**	Consumo total**
0,00	454,4	240,4	10,6	520,5
0,52	59,0	164,3	0	89,1
1,04	16,8	-	0	11,4
2,02	-	-	0	0
4,17	-	-	0	0
8,33	-	-	0	0
16,67	-	-	0	0
33,33	-	-	0	0
C. V. %	13,5	17,2	32,8	24,5

** F-teste significativo a 1%

7.5. Conclusões

Os resultados obtidos nas condições deste experimento permitem concluir que:

✓ O extrato de *Melia azedarach* tem características tóxicas e antialimentares a *Spodoptera frugiperda*.

✓ A ação semelhante de extratos de *M. azedarach* e *Azadirachta indica* coloca a primeira como mais promissora por ser uma espécie adaptada à Região Sul do Brasil.

✓ Por estarem nas folhas o compostos inseticidas mais importantes ou em maior concentração nestas estruturas, torna a espécie *M. azedarach* ainda mais promissora que *A. indica*, pela maior disponibilidade de material para preparação de extratos e pela maior sustentabilidade de sua retirada sem comprometimento da planta.

8. AVALIAÇÃO DA AÇÃO INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Rollinia silvatica* (St. Hil.) Mart. (ANONACEAE) NO CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

Visando avaliar o potencial inseticida de *Rollinia silvatica* (ariticum), extratos de folhas desta espécie foram testados no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, em bioensaios realizados no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria- UFSM (Santa Maria- RS), no período de maio de 2003 a abril de 2004. Doses de óleo essencial (0; 1,25%; 2,50; 5,00 e 10,00%, v/v) e de destilado (0; 12,5%; 25,0; 50,0 e 100,0%, v/v) foram adicionadas à dieta artificial e pulverizadas sobre *S. frugiperda*. Os extratos de folhas frescas foram obtidos a partir da combinação dos processos de hidrodestilação e destilação a vapor. O óleo essencial se constituiu na camada sobrenadante do balão coletor e o restante correspondeu ao destilado. O delineamento experimental utilizado nos diversos experimentos foi blocos ao acaso, com quatro repetições e 40 lagartas por tratamento (fotofase natural, temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR 65 ± 10). O óleo essencial se mostrou efetivo estatisticamente só a 10%, com apenas 35% de controle, enquanto que o destilado apresentou eficiência de 82,5% em sua versão mais concentrada, sem que em nenhuma situação, outros caracteres, além de sobrevivência, fossem significativamente afetados. Por outro lado, os resultados permitem

concluir que comprovadamente extratos de *R. silvatica* contém um ou mais compostos com potente atividade inseticida.

Abstract

Aiming to test the potential as insecticide of *Rollinia silvatica*, extracts of leaves from this plant were applied on larvae of *Spodoptera frugiperda*, through bioassays at laboratory, at Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil (2003 and 2004). Some doses of essential oil (from 1.25% to 10%, v/v) and distilled (from 12.5% to 100%) were added in artificial diet and sprayed on *S. frugiperda*. Both, essential oil and distilled, were obtained from distillation of leaves, respectively by separating the upper part from the rest of the liquid. The experimental design adopted was the randomized complete block, five and six treatments, with four repetitions and 40 worms by treatment, natural photofase and $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Only 10% of essential oil and pure distilled showed significance, but with low levels of larval control (35% and 82.5%, respectively). On the other hand, the results permit to conclude there are one or more compounds in extracts of *R. silvatica*, with potent insecticidal activity.

8.1. Introdução

A história da botânica é, em grande parte, a luta do homem para adaptar-se à natureza, utilizando as plantas na medicina, indústria e agricultura. As defesas fitoquímicas contra pragas, principalmente para o controle de insetos, são conhecidas pela humanidade desde a antigüidade (GALLUN & KHUSH, 1984), apesar da aplicação dos

conhecimentos estar ainda na sua fase inicial (NORRIS & KOGAN, 1984).

As pragas fitófagas tem sido inegavelmente o maior problema que a humanidade tem enfrentado na produção de alimentos (FRANKEL, 1977), causando desde pequenas e grandes perdas localizadas, até enormes prejuízos em vastas extensões de terra (ALLARD, 1960; DAHMS, 1967; ELLIOT, 1967; BREWBACKER, 1969).

Sulfato de nicotina do fumo (*Nicotiana tabacum*, L.); rotenona de *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. (diversos timbós); piretrina, retirada do *Crysanthemum cinerariaefolium* e vários alcalóides da sabadilha (*Schoenocaulon officinale*) são alguns exemplos da utilização de plantas inseticidas de forma sistemática (LAGUNES & RODRIGUES, 1989) e que foram substituídos pelos inseticidas sintéticos, pela relativa maior eficiência e economicidade destes.

A retomada da pesquisa de produtos bioativos de espécies vegetais, entretanto, faz-se atualmente à luz dos novos conhecimentos, nas diversas áreas do conhecimento, visando uma agricultura mais adequada às necessidades e exigências da humanidade. Metabólitos de defesa das plantas, desvendadas suas estruturas químicas, podem servir como molde a novas moléculas sintéticas e contribuir para a descoberta de novos genes de resistência a pragas.

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de extratos (óleo essencial e destilado) de *Rollinia silvatica*, como inseticida, a partir de bioensaios em laboratório com *S. frugiperda*, para fornecer subsídios às áreas de química e biologia molecular, além da possibilidade de utilização direta destes produtos de origem vegetal em pequena escala, com a extensão das avaliações em experimentos de campo.

8.2. Revisão de literatura

O uso de plantas inseticidas e de plantas resistentes a fitófagos tem uma base comum, que é o emprego de aleloquímicos presentes na planta, como proteção (VENDRAMIN & CASTIGLIONI 2000) e que são extremamente importantes na busca de uma agricultura mais sustentável.

Os produtos derivados de metabólitos secundários provenientes de vegetais, mais aceitos pelos consumidores, por terem menor impacto ambiental e por serem menos tóxicos aos mamíferos, têm sido investigados mais intensivamente pela indústria atual (WEDGE & CAMPER, 2000).

As plantas têm sido a fonte mais comum de pesquisas na avaliação de produtos naturais e têm contribuído enormemente na produção de produtos farmacêuticos modernos. Mesmo assim, a imensa maioria, de aproximadamente 250 a 500 mil espécies de plantas superiores no mundo, ainda não foi avaliada e o pouco que já foi testado (5 a 15%) se restringiu apenas a alguns poucos alvos terapêuticos (MILLER & GEREAU, 2000; ECHEVERRIGARAY et al., 2001).

Dentre as plantas inseticidas, talvez não haja atualmente no mundo nenhuma mais conhecida e popular do que a *Azadiracta indica* (árvore do nim), cujo extrato já é inclusive comercializado em diversos países. Estima-se que mais de 200 espécies de insetos podem ser controladas com o composto ativo do nim, a azadiractina, além de atuar como fungicida e nematicida (BURG & MAYER, 1998). Muito conhecido no Brasil, o cinamomo (*Melia azedarach*), da mesma família do *nim*, também é conhecido há vários anos como planta inseticida.

JULKUNEN-TIITTO et al. (1993) avaliaram diversos compostos fenólicos de *Salix myrsinifolia* (Salisb.) com efeito inseticida, os quais mostraram diferenças relativas em seus conteúdos, em função de variações ambientais. Igualmente, JOHNSON et al.(2000) observaram

grande variação no conteúdo de acetogeninas (inseticida e anti-tumoral) em *Asimina triloba* (L.) Dunal, conforme a estação do ano. Diferentemente, (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1995) avaliaram a variação de terpenos em *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae), na defesa contra herbívoros, observando que as diferenças ambientais não possuem forte efeito sobre a herbivoria nessa espécie, mas que a variabilidade genética na composição química foi a estratégia mais importante na defesa contra herbívoros, reduzindo-lhes a sobrevivência e a eficiência. Acrescente-se ainda que a produção de metabólitos secundários de defesa das plantas pode ser de natureza constitutiva (presentes independentemente da ocorrência ou não de estresses) e de expressão ativada, regulada pela ação de estresses bióticos (TAIZ & ZEIGER, 1998; GERSHENZON et al., 2000; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002; McKAY et al., 2003; MARTIN et al., 2003).

Quando uma planta é investigada, não é descartada a possibilidade de haver mais de um alvo terapêutico, tanto que na busca por agentes anti-tumorais tem-se descoberto novos antibióticos, fungicidas, bactericidas e até inseticidas.

Em trabalho cooperativo entre diversos países, no Suriname, KINGSTON et al.(2000), buscando agentes anti-cancerígenos, relatam diversas espécies de plantas, onde foram encontrados compostos importantes, com potencial inseticida: *Renealmia alpinia*(rott) Maas (Zingiberaceae), *Eclipta Alba* (L.) Hassk, *Himatanthus fallax* (Muell.Arg.) Plumel, *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) e *Miconia lepidota* DC (Melastomataceae), dentre outras.

Diversos gêneros da família das anonáceas são conhecidos, inclusive no Brasil, por apresentarem espécies popularmente usadas como plantas medicinais e pelos frutos comestíveis, muito apreciados principalmente pelas populações rurais (LORENZI, 1998; JOHNSON et al., 2000; DAMASCENO et al., 2002; PIMENTA et al, 2003). Até hoje já

foram isolados perto de 400 compostos dessa família, considerados entre os mais potentes conhecidos inibidores do Complexo I (NADH: ubiquinona oxireductase), nos sistemas de transporte de elétrons da mitocôndria e da NADH:oxidase da membrana plasmática, que induzem apoptose (morte programada da célula), talvez como consequência da privação de ATP, tendo, portanto, um ótimo potencial na aplicação como praguicida ou antitumoral (JOHNSON et al., 2000). Os referidos autores citam a asimicina o bulatacim e o trilobacim (dentre mais de 40) como acetogeninas altamente bioativas e os gêneros Uvária, Asimina, Annona, Goniiothallamus, Rollinia e Xylopia como os mais promissores para a pesquisa agrícola. As acetogeninas são ácidos graxos de cadeia longa (politerpenos) com 32 ou 34 carbonos (JOHNSON et al., 2000), encontradas exclusivamente nas anonáceas, que podem ser extraídas da casca, ramos, frutos verdes e sementes, através de solventes orgânicos como etanol, diclorometano, hexano e metanol.

As acetogeninas com potencial inseticida, contidas na graviola (*Annona muricata*), por exemplo, podem ser 10 mil vezes mais potentes que a adriamicina no combate a diversos cânceres (MOSS, 2003). Vários estudos realizados em populações que consomem plantas anonáceas (frutos e chás) com certa regularidade relacionam este hábito com diversos males, inclusive com o parkinsonismo (CAPARROS-LEFEBVRE & ELBAZ, 1999; LITVAN et al, 1999). Em diversos países, algumas anonáceas são utilizadas, pelas populações rurais, como controladoras da fertilidade, para produzir esterilidade temporária, sendo muito comum, inclusive no Brasil, o uso de extrato de sementes de *Annona squamosa* (fruta-do-conde) como abortivo (DAMASCENO et al., 2002).

Por causa desse potencial tóxico em geral das acetogeninas, contidas nas espécies da família das anonáceas, é que até hoje ainda não foi possível lançar no mercado nenhum inseticida derivado das mesmas (NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002). Pelo seu mecanismo de

ação, inibindo o Complexo I NADH da mitocôndria, impedindo assim o transporte de elétrons até a ubiquinona (LEHNINGER et al, 1995), de forma semelhante a rotenona (YAMAMOTO, 1970), mas várias vezes mais potentes que a mesma (JOHNSON et al., 2000), as acetogeninas com ação neurotóxica, podem ser perigosas aos mamíferos, inclusive ao homem. Entretanto, avaliações no potencial existente nesta família têm sido cada vez mais intensificadas, já que a descoberta de moléculas novas pode levar à síntese de compostos inseticidas neuroativos, mas que atuem em novos sítios-alvos (CASIDA & QUISTAD, 1998), e portanto mais específicos e seguros.

Nesses gêneros mais promissores, da família das anonáceas, encontramos no Brasil, principalmente, *Annona crassiflora* Mart., *Rollinia mucosa* (Jacquin) Baill., *R. sericea* (R. E. Fries) R. E. Fries e *Xylopia frutescens* Aubl. (LORENZI, H., 1998).

8.3. Material e métodos

O presente trabalho, foi desenvolvido no período de maio de 2003 a abril de 2004, no Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS), em laboratório, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase natural e UR $65 \pm 10\%$.

8.3.1. Coleta, estocagem do material vegetal e preparação de extratos vegetais

As coletas de folhas de *Rollinia silvatica* (St. Hil) Mart. (Annonaceae) foram efetuadas durante todo o período de realização dos experimentos, com mais freqüência de setembro a maio, visando utilização imediata dos extratos vegetais. Foi utilizado material de apenas uma planta de *R. silvatica*, isolada, com mais de trinta anos de idade, cujos extratos

mostraram preliminarmente ação inseticida contra *S. frugiperda*. As folhas foram coletadas do terço inferior, na base da planta, em toda a sua volta. Em função dos objetivos a alcançar, preferiu-se trabalhar a partir de folhas frescas, imediatamente processadas ou estocadas em congelador a -20°C, quando não era possível a sua utilização imediata.

Da destilação (combinação de destilação a vapor com hidrodestilação) das folhas frescas ou congeladas, resultaram no óleo essencial e no destilado. 750 gramas de folhas frescas foram colocados, parte (aproximadamente a metade) em contato com água (1,5 litros) e parte em contato com vapor d'água, para efetuar a destilação, em caldeira com 5 litros de capacidade (panela de pressão doméstica). Depois de recolhido 1 litro de líquido destilado, separou-se o material sobrenadante (óleo essencial) do restante (destilado). Os óleos essenciais e destilados foram estocados em frascos de vidro e mantidos no escuro, a -20°C, sendo os últimos também em refrigerador a + 3°C, por no máximo uma semana.

8.3.2. Material reagente, manejo e aplicação dos tratamentos

Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda*, como material reagente, criadas em laboratório com dieta artificial.

Posturas da criação artificial, foram colocados sobre a dieta, em recipientes de plástico, de 250 ml. Larvas de primeiro ínstar foram individualizadas e transferidas para recipientes transparentes de plástico de 100 ml, com cubos de aproximadamente 4 gramas de dieta. A partir deste momento, as lagartas estavam prontas para serem utilizadas.

Visando simular as condições em ambiente natural, no que tange ao consumo de produto aplicado sobre a parte aérea de plantas, foram feitos testes preliminares, com mistura de água e espalhante adesivo, até imediatamente antes do ponto de escurimento. A partir desta relação, calculou-se a participação dos extratos no peso das dietas

artificiais das lagartas testadas, para os bioensaios, verificando-se o efeito por ingestão.

Para a aplicação dos extratos (contato) as lagartas foram colocadas em coador doméstico, de náilon, e mergulhadas rapidamente (3s) no líquido do respectivo tratamento. Escorridos os excessos de líquido, os insetos (lagartas) foram recolocados de volta nos seus respectivos recipientes.

Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso, com 4 repetições. Cada unidade experimental constou de 10 lagartas no terceiro instar e recebeu um cubo da respectiva dieta, com massa aproximada de 4 gramas.

Os principais dados de observação coletados foram o número de lagartas mortas, número de pupas e número de adultos, oriundos dos tratamentos. As leituras foram feitas diariamente, até o último estágio larval.

8.3.3. Análise estatística

Os procedimentos de análise e interpretação de experimentos foram realizados usando o pacote estatístico NTIA/EMBRAPA (Centro de Ciências Rurais- Departamento de Fitotecnia, cedidos pela EMBRAPA 1986, 1988, 1989). Os dados para índice de mortalidade e viabilidade de pupas, nas análises estatísticas, foram transformados em arco-seno da raiz quadrada da proporção de insetos mortos ou viáveis, respectivamente, para insetos (lagartas ou pupas) originalmente presentes.

8.3.4. Biotestes

Bioteste 1. Efeito de doses de óleo essencial, nas concentrações de 0; 1,25; 2,50; 5,00 e 10,00% (v/v) e de destilado puro de *Rollinia silvatica* (ariticum), por contato, no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*, (05/2003).

O óleo essencial de ariticum foi diluído em água e o restante (destilado) compôs outro tratamento. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo (produto comercial) a 0,1%.

Bioteste 2 e bioteste 3. Efeito de doses de destilado de *Rollinia silvatica*, por contato, nas concentrações de 0; 12,5%; 25,0; 50,0 e 100% (v/v) , no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* (07/2003 no bioteste 2 e 04/2004 no bioteste 3).

Os tratamentos foram obtidos através da diluição em água destilada. A testemunha se constituiu em água destilada. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo (produto comercial) a 0,1%.

Bioteste 4- Efeito de doses de destilado de *R. silvatica* (ariticum), por ingestão, nas concentrações de 0; 12,5; 25,0; 50,0 e 100% (v/v), no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* (04/2004).

Os tratamentos, incluindo a testemunha, foram adicionados à dieta artificial das lagartas.

8.4. Resultados e discussão

Bioteste 1. Efeito de doses de óleo essencial e destilado de ariticum (*Rollinia silvatica*), por contato, em diversas concentrações, no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*, UFSM, 2003.

No referido bioteste (Tabela 1a e 1b) observou-se que apenas a dose de 10% de óleo essencial de *R. silvatica* afetou a sobrevivência e o peso de pupas, determinando, respectivamente, um índice de mortalidade final de 35%, com pequena redução no peso de pupas (apesar de estatisticamente significativa), o que, provavelmente por esta razão, não afetou a viabilidade de pupas. Dentre os tratamentos testados, o destilado foi o que causou níveis de mortalidade mais altos (82,5%, em média) das lagartas, sugerindo que os compostos bioativos,

com maior eficiência inseticida, extraídos de *R. silvatica*, estejam contidos no destilado e que não puderam ser separados por diferença de densidade.

Na família das anonáceas, a qual pertence *R. silvatica*, já foram identificados e isolados centenas de compostos com potente ação inibidora do Complexo I da mitocôndria, que potencialmente podem agir como inseticidas (JOHNSON et al., 2000). Desta forma, o óleo essencial e o destilado de *R. silvatica* devem conter, certamente, diversos compostos bioativos. Por outro lado, as acetogeninas, ácidos graxos terpenóides com 32 ou 34 carbonos devem estar contidos principalmente no destilado, na forma de emulsão, já que normalmente são extraídos através de solventes orgânicos. O óleo essencial, como material sobrenadante, obtido por destilação, provavelmente deve conter teores relativamente baixos de acetogeninas e mais elevados de monoterpenos e sesquiterpenos, com 10 e 15 carbonos, respectivamente (TAIZ & ZEIGER, 1998), que também podem possuir atividade inseticida (RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002). Entretanto, somente conhecendo o teor de cada um desses componentes é que será possível determinar quais moléculas são mais promissoras.

Além da maior mortalidade determinada pelo destilado de *R. silvatica*, observa-se na Tabela 1a uma ação mais rápida do mesmo, comparativamente com as doses de óleo essencial. Nas primeiras 24 horas, por exemplo, o tratamento destilado de *R. silvatica* determinou o nível médio de mortalidade de 62,5%, ou seja, o equivalente a 76% da mortalidade acumulada até a fase de pupa, enquanto que para o tratamento com 10% de óleo essencial esta relação foi de 43%. Entretanto, dadas a alta variedade de compostos bioativos (JOHNSON et al., 2000), provavelmente existentes na espécie avaliada, e a ação de diversos ingredientes ativos até o nível de partes por bilhão (MOSS, R. W., 2003), não se pode afirmar que moléculas mais promissoras estejam

no óleo essencial ou no destilado. Outro aspecto a se levar em consideração é que, imediatamente à aplicação dos tratamentos, todas as doses de óleo essencial e a dose única de destilado promoveram ação paralisante nas lagartas. A referida ação foi revertida parcialmente principalmente nos insetos onde o tratamento foi com óleo essencial. Entretanto, ficou evidente a presença em todos os tratamentos, com exceção da testemunha, de substâncias, no mínimo, com efeito neurotóxico (SALAZAR, 1998; NAUEN & BRETSCHNEIDER, 2002), em função dos sintomas observados. Não pode deixar de ser evidenciado que o efeito paralisante pela aplicação de óleo essencial puro causou letalidade de 100%, nos testes preliminares.

Os testes de hipóteses de regressão das doses de óleo essencial para os caracteres mortalidade e peso médio de pupa determinaram, respectivamente, uma equação do terceiro e do primeiro grau (Figura 1) com ajuste significativo.

TABELA 1. Valores médios para índice de mortalidade (%), peso de pupas (mg) e viabilidade de pupas (%) de *S. frugiperda*, tratadas com doses de óleo essencial (OE) em % (v/v) e destilado (D) de *Rollinia silvatica*, em experimento (bioteste 1) realizado em laboratório, em laboratório. 2005.

1 a)

Tratamentos	Mortalidade (%)		
	24 h	48 h	72 h
Testemunha	0,0 c	0,0 c	2,5 c
OE 1,25%	0,0 c	5,0 bc	15,0 bc
OE 2,5%	7,5 bc	10,0 bc	12,5 bc
OE 5%	5,0 bc	7,5 bc	12,5 bc
OE 10%	15,0 b	22,5 b	30,0 b
Destilado	62,5 a	67,5 a	80,0 a
CV %	54,8	54,7	42,0

1 b)

Tratamentos	Mortalidade/ Lagartas (%)	Peso de pupas (mg)	Viabilidade de pupas (%)
Testemunha	5,0 c	235,0 a	94,7
OE 1,25%	15,0 bc	239,0 a	94,1
OE 2,5%	17,5 bc	222,5 ab	97,2
OE 5%	15,0 bc	221,8 ab	94,4
OE 10%	35,0 b	214,5 b	96,4
Destilado	82,5 a	-	-
C. V. %	24,4	3,7	14,4

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey

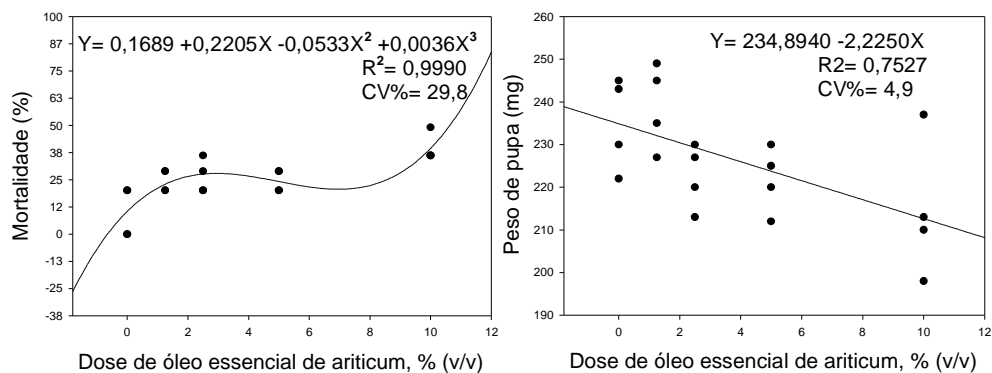


FIGURA 1. Mortalidade final (%) e peso médio de pupas (mg) de lagartas de *S. frugiperda* submetidas a diversas concentrações (v/v) de óleo essencial de *R. silvatica*. 2005.

Biotestes 2, 3 e 4. Efeito de doses de destilado de *Rollinia silvatica* (ariticum), por contato e ingestão, em diversas concentrações, no crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*.

Em nenhum desses experimentos foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre doses de destilado, para os diversos caracteres avaliados, comparativamente com o tratamento testemunha. No bioteste 2 e bioteste 3 o valor médio para o índice de mortalidade da testemunha (dose de 0%) foi de 5,0% e 2,5%, respectivamente, não havendo diferença significativa com as demais doses testadas. A coleta de outros dados de observação não foi necessária. No bioteste 3, onde o extrato de *R. silvatica* foi fornecido de forma crônica, através das dietas, foram feitas todas as coletas previstas. Mais uma vez não houve diferenças significativas entre os tratamentos, com a testemunha apresentando os valores médios de 2,5% para mortalidade, 472 mg para peso de lagartas em pré-pupa, 241 mg para peso de pupa e 100% para viabilidade de pupas. No bioteste 2 foram utilizados destilados a partir de folhas estocadas (congeladas) por dois meses, diferentemente do

bioteste 1, onde foram preparados destilados de folhas frescas, recentemente colhidas (mês de maio de 2003). Devido à provável instabilidade das moléculas bioativas (JOHNSON et al, 2000; KINGHORN et al, 2000; WEDGE & CAMPER, 2000), deduziu-se que provavelmente o tempo de estocagem tenha influenciado, anulando o efeito inseticida do destilado. No ano de 2004 (mês de abril), o bioteste foi repetido (bioteste 3) com destilados a partir de folhas frescas. Entretanto, mais uma vez os resultados não permitiram encontrar diferenças significativas entre os tratamentos. A conhecida maior resistência e capacidade de adaptação de *S. frugiperda* pode explicar em parte tais resultados, apesar da sensibilidade apresentada ao destilado na versão mais concentrada, no bioteste 1. A isto é possível se adicionar os supostamente baixos teores dos ingredientes ativos nos extratos, às variações por fatores ambientais e relativos à própria fisiologia da planta, comuns na maioria das espécies vegetais (JULKUNEN-TIITTO et al 1993) e para os conteúdos das acetogeninas contidas nas anonáceas (JOHNSON et al. 2000). Os compostos de defesa de expressão ativada são também fatores complicadores na composição dos extratos vegetais, continuamente alterada, conforme a ação dos agentes bióticos agressores.

Entretanto, é necessário também se levar em consideração que a ação por ingestão pode ser minimizada pelo consumo de dieta em pequenas quantidades, resultando provavelmente em concentrações muito menores dos ingredientes ativos no organismo do inseto, comparativamente com a ação por contato, em que o animal recebe a dose de uma só vez. Em adição, outro fator a ser considerado é que os extratos foram retirados das folhas, onde a concentração dos mesmos é menor (JOHNSON et al, 2000).

8.5. Conclusões

De acordo com o estabelecimento, condução e avaliação dos experimentos, os dados obtidos permitem concluir que:

✓ Comprovadamente, extratos de *Rollinia silvatica* apresentam potente ação inseticida, cujos compostos contidos, após fracionamento, poderão ser melhor avaliados em biotestes mais específicos.

✓ Os sintomas apresentados pelos insetos tratados com os extratos avaliados permitem concluir que moléculas com efeitos neurotóxicos estão presentes no conjunto dos metabólitos que os compõem.

✓ Pelo mecanismo de ação das substâncias neurotóxicas, pelo menos diversas outras espécies, principalmente da família Lepidopterae devem ser afetadas por extratos de *R. silvatica*.

✓ O uso de destilado de folhas de *R. silvatica* pode ser muito útil na agricultura em pequena escala, desde que a coleta do material vegetal não venha comprometer a planta doadora.

✓ Trabalhos mais aprofundados no gênero *Rollinia* podem ser muito úteis no sentido de detectar moléculas inseticidas altamente eficientes, que podem servir de moldes para a síntese de análogos mais adequados às novas exigências da sociedade, em termos de saúde e ambiente. Os avanços podem ainda atingir, a médio e longo prazos, a área de biologia molecular, ou mais propriamente da engenharia genética, na identificação, seqüenciamento e clonagem de novos genes de interesse agronômico.

9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Rollinia silvatica* (St. Hil.) Mart. (ANNONACEAE) NO CONTROLE DE *Ascia monuste orseis* (Latr., 1819)

Resumo

Visando pesquisar o potencial inseticida de *Rollinia silvatica* (ariticum), extratos de folhas desta espécie foram testados em lagartas de *Ascia monuste orseis* (lagarta-da-couve ou curucurê-da-couve), em três bioensaios no laboratório do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria-RS), em abril de 2004. As lagartas foram criadas a partir de coletas de posturas a campo e alimentadas com folhas de couve-comum. Para a aplicação dos extratos, folhas de couve e lagartas com aproximadamente 2 cm, foram imersas por cinco segundos no líquido do respectivo tratamento (doses de 1/1 a 1/8, v/v). Escorridos os excessos de líquido, os insetos foram colocados sobre as folhas, devolvidos às caixas tipo *germbox*, de forma coletiva (10 lagartas por repetição) até o final do experimento. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com 4 repetições e 40 lagartas por tratamento, com fotofase natural, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. e UR $65 \pm 10\%$. Resultados promissores foram obtidos no controle da lagarta-da-couve, quando todas as doses de destilado mostraram eficiência em laboratório. Desta forma, podem ser encontrados em extratos de *R. silvatica* um ou mais compostos com potente atividade inseticida, à disposição das áreas de química e engenharia genética. Os resultados

obtidos também apontam para a possibilidade de utilização direta de extratos de *R. silvatica* (ariticum) na agricultura familiar.

Abstract

With the objective of investigating the potential insecticidal of *Rollinia silvatica*, leaf extracts of this specie were tested against larvae of *Ascia monuste orseis*, by three bioassays at laboratory (natural photophase, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, RH $65 \pm 10\%$) at Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil), during April 2004. The worms emerged from eggs collected in field were artificially maintained at laboratory, on leaves of *Brassica oleracea*. At the moment of installation of the experiments, the worms (2 cm of length) and the leaves were immersed by five seconds in the extracts (doses from 1/1 to 1/8, v/v). After drip-dry the material, larvae and leaves were placed in germbox (11X11 cm) collectively (10 worms per germbox). The experimental design adopted was the randomized complete block, four repetitions, and 40 worms per treatment. Promising results were obtained on *A. monuste orseis* control, since all doses of distilled of *R. silvatica* show efficiency at laboratory. Certainly extract of *R. silvatica* is source of one or more insecticidal compounds, that must be studied by others scientific areas. The results at laboratory also suggest the possibility of direct use of extract by farmers in organic agriculture.

9.1. Introdução

A contaminação de alimentos por microorganismos causadores de doenças infecto-contagiosas e por produtos químicos tóxicos ao homem e outros animais é infelizmente uma realidade crucial no Terceiro Mundo. Centenas de milhares de pessoas têm sido vítimas de infecções e

intoxicações, que se não levam à morte, podem deixar seqüelas por toda a vida. Esta situação deveria ser considerada como inaceitável por nossos governantes, já que no Primeiro Mundo tais questões já foram ultrapassadas, relativamente, há muito tempo. Se por um lado os países ricos utilizam os artifícios mais variados para que continuemos consumindo insumos já ultrapassados ou mesmo proibidos naquelas nações, por outro lado, o baixo nível de educação de nosso povo permite que perdure esta situação verdadeiramente catastrófica em termos de saúde e ambiente.

O presente trabalho visou avaliar o potencial de extratos da espécie *Rollinia silvatica*, como inseticida, em bioensaios de laboratório contra lagartas de *Ascia monuste orseis*, fornecendo subsídios a outras áreas, no sentido de promover a síntese de novos compostos inseticidas, além de remeter à prospecção de novos genes de resistência, como propostas a médio e longo prazos. A curto prazo, o objetivo do trabalho foi o de avaliar a possibilidade de utilização direta desses produtos de origem vegetal na agricultura familiar, com o aprimoramento das avaliações em experimentos de campo. *R. silvatica* pertence a família das anonáceas, muito comum no Brasil, onde se encontram diversas outras espécies utilizadas na medicina popular, cujos frutos são também comestíveis (LORENZI, 1998; JOHNSON et al., 2000; DAMASCENO et al., 2002; PIMENTA et al, 2003), onde já foram identificados centenas de compostos bioativos, alguns provavelmente com potencial inseticida.

9.2. Revisão de literatura

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e por falta de assistência técnica, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os agricultores geralmente aplicam agrotóxicos em excesso (AMBIENTEBRASIL, 2002). São os casos do

tomate e morango, onde são aplicados de 30 a 40 kg/ha de agrotóxicos por ciclo, quando se sabe que esta quantidade poderia ser bem menor sob assistência técnica. Com isto, além dos consumidores, os próprios agricultores passam a ser vítimas, pela exposição que sofrem aos produtos tóxicos. A REVISTA GALILEU (2002) denunciou os altos índices de suicídios em municípios agrícolas do Rio Grande do Sul, como sendo conseqüência do uso indevido de agrotóxicos. Em 2001 tais índices chegaram a 21 por 100 mil na Região de Santa Cruz, quando a média brasileira foi de quatro suicídios por 100 mil habitantes. Em 1996 o problema teve destaque especial no município de Venâncio Aires, quando a taxa de suicídio chegou à incrível marca de 37,22 por 100 mil habitantes. O Governo Federal está investigando o assunto, sem nenhuma conclusão até o momento. Entretanto, se sabe que, por coincidência ou não, o problema dos altos índices de suicídio no Brasil tem correspondido às regiões onde mais se aplicam agrotóxicos.

As intoxicações de agricultores por agrotóxicos têm feito em torno de 300 mil vítimas por ano no Brasil (GAZETA MERCANTIL, 2001), provocando a morte de 2 a 3 mil pessoas anualmente. A Universidade de São Paulo (USP) aponta que além do descuido no uso dos agrotóxicos, em torno de 17% dos produtos comerciais utilizados são classificados como extremamente tóxicos.

Se para os agricultores o problema de intoxicação por uso indevido de agrotóxicos é muito grave, não é menor para os consumidores, que estão ingerindo quantidades inacreditáveis de resíduos tóxicos, acima do permitido por lei e do recomendado pela Organização Mundial da Saúde.

Algumas tentativas para minimizar o problema, como o aprimoramento da legislação ambiental e do próprio Receituário Agrônômico, já foram feitas, sem grande impacto, a não ser por fazer desnudar o verdadeiro caos que existe nesta área. Análises têm sido feitas esporadicamente e todas só conseguiram mostrar parte desse

grande *iceberg*, que esconde uma situação que deveria envergonhar a todos, principalmente aqueles que têm poder e conhecimento da situação.

Desde o ano de 2001 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) tomou para si a responsabilidade e finalmente começaram as análises periódicas, que em 2003 passaram a incluir o Rio Grande do Sul e que em 2004 já abrangeram todo o Brasil.

Os resultados disponíveis na ANVISA (2004) demonstram que morango, tomate e batata foram os produtos mais contaminados no período de 2001 e 2002, com 46%, 26% e 22% de amostras, respectivamente, fora dos padrões sanitários exigidos por lei. Os dados mostram também, de uma maneira geral, que 83% de hortifrutigranjeiros tinham resíduos de agrotóxicos e que 22,17% estavam com excesso desses produtos químicos. Preocupante é também o fato de que, além de índices de contaminação acima do permitido em lei, muitos produtos encontrados não são permitidos para uso na respectiva cultura. Morangos estavam contaminados com endossulfam e tetradifom; mamão com dicofol e metamidofós; alface com ditiocarbamatos e clorotalonil. Em 2003, novamente o morango foi o hortifrutigranjeiro mais contaminado com o altíssimo índice de 72,8% das amostras analisadas. Seguiu-se, em ordem de contaminação, a maçã, com 24,80% e o mamão, com 11,90% de amostras contaminadas. Em 2004, as análises de amostras do primeiro trimestre demonstram que 12% estavam fora dos padrões exigidos por lei. Estas menores contaminações, entretanto, provavelmente são resultantes de problemas climáticos, ou seja, seca e excesso de chuvas, respectivamente nas Regiões Sul e demais regiões do Brasil.

As análises da ANVISA, entretanto, são realizadas apenas em nove produtos da “cesta básica” dos brasileiros, dentre os mais consumidos, tendo como representante das hortaliças folhosas apenas a alface, quando o problema é bem mais abrangente, como se sabe. O Governo do Rio de Janeiro, por exemplo, constatou (AMBIENTEBRASIL, 2002) que salsa (42%), agrião (29%), alface (18%), espinafre (13%), couve (11%) e

brócolis (5%), estavam significativamente contaminadas com agrotóxicos acima do permitido em lei.

Não é preciso, portanto, reafirmar que o problema do uso de agrotóxicos no Brasil e a contaminação dos alimentos pelos mesmos é um verdadeiro descalabro.

Entretanto a situação ainda deve ser bem mais grave do que parece. Infelizmente a ANVISA, provavelmente por questões de ordem financeira, deixou de incluir nas análises os metais pesados e organoclorados. Mesmo proibidos no Brasil há vários anos, sabe-se que os organoclorados ainda têm possibilidade de entrar no país via contrabando e outros ilícitos.

O chamados “defensivos naturais”, pela Agricultura Orgânica e pela Agricultura Agroecológica, contêm, dentre outros materiais, diversos sais de metais pesados (cobre, manganês, zinco, cobalto e outros), que são aplicados diretamente sobre as plantas (BURG & MAYER, 1998; CLARO, 2001). Essas práticas podem trazer sérios problemas de saúde e ambiente, contaminando diretamente os alimentos, poluindo os solos, pois os metais podem ser adsorvidos pelas substâncias húmicas (CANELLAS et al. 1999), e as águas, distribuindo-se pelo ambiente. Alguns metais pesados, além de altamente tóxicos, como os sais de cobre (ANVISA, 2004), podem ser biocumulativos e biomagnificantes, acumulando-se na cadeia alimentar (FOSTIER, 1998; CALEFFI, 2000; FERREIRA et al. 2000; LAILSON-BRITO et al., 2000; MAZUTTI et al., 2000).

Desta forma, as novas opções, que a moderna sociedade impõe como soluções aos problemas de contaminação dos alimentos e do ambiente pela agricultura convencional, não passam pelas chamadas agricultura orgânica e agroecológica, como têm sido propostas pelos seus principais adeptos do ambientalismo. Apontando para uma agricultura pré capitalista e avesso aos avanços dos novos conhecimentos, principalmente da biologia molecular, o ambientalismo ultraconservador é

uma proposta utópica, adjetivo utilizado pelos seus próprios defensores, quando conceituam a si mesmo (PINHEIRO et al., 1985).

Dentre as diversas alternativas que estão sendo propostas pela pesquisa atual, a descoberta de moléculas e derivados de estudos dos metabólitos de defesa das plantas, ou aleloquímicos presentes, como proteção (VENDRAMIN & CASTIGLIONI, 2000) parecem ser extremamente importantes no avanço rumo a uma agricultura que vise principalmente a segurança alimentar e ambiental. Produtos derivados de plantas certamente são mais aceitos pela sociedade, por causarem menor impacto ambiental e por serem menos tóxicos aos mamíferos, sendo por isto atualmente os mais intensivamente estudados pela indústria (WEDGE & CAMPER, 2000).

Entretanto, para se evitar cair novamente nos erros do passado, quando se acreditou sempre em soluções definitivas, que inexistem, é preciso levar em consideração que os vegetais podem conter substâncias tão ou mais tóxicas do que os próprios agrotóxicos convencionais mais modernos. Mesmo entre as plantas pesquisadas atualmente, muitas tidas como promissoras, contêm compostos altamente tóxicos aos mamíferos (CAPARROS-LEFEBVRE & ELBAZ, 1999; LITVAN et al., 1999; DAMASCENO et al., 2002). Algumas acetogeninas encontradas na família das anonáceas, segundo NAUEN & BRETSCHNEIDER (2002), só não foram industrializadas até agora devido ao alto grau de toxicidade aos mamíferos, inclusive ao homem. Entretanto, de uma maneira geral, as substâncias bioativas de espécies vegetais, inclusive com ação inseticida, no seu estado natural, não trazem riscos significantes para o ambiente, devido a rápida degradação na natureza (JOHNSON et al., 2000), nem para a saúde humana, quando obedecidos os períodos de carência, geralmente muito curtos ou mesmo para quem aplica o produto com os devidos cuidados.

9.3. Material e métodos

O presente trabalho, foi desenvolvido no ano 2004, no Departamento de Defesa Fitossanitária do Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, em laboratório com temperatura de $25 \pm ^\circ\text{C}$, fotofase natural e UR $65 \pm 10\%$.

As coletas do material reativo, ou seja folhas de *Rollinia silvatica* (St. Hil.) Mart. (Annonaceae), foram realizadas durante o período de realização dos experimentos, visando utilização imediata dos extratos vegetais.

As folhas frescas foram imediatamente processadas ou estocadas em congelador a -20°C , quando não foi possível a utilização imediata.

Para se processar a destilação, 750 gramas de folhas frescas foram colocados, parte (aproximadamente a metade) em contato com água (1,5 litros) e parte em contato com vapor d'água, em caldeira com 5 litros de capacidade (panela de pressão doméstica). Da destilação (combinação de destilação a vapor com hidrodestilação) das folhas frescas ou congeladas, resultou o destilado (D), que correspondeu ao conjunto líquido obtido em balão de vidro, homogeneizado com espalhante adesivo comercial a 0,1%.

Como material reagente foram utilizadas lagartas de *A. monuste orseis* oriundas de posturas em folhas de couve-comum, coletadas no campo.

Para a aplicação dos extratos (contato) as lagartas foram colocadas em coador de náilon doméstico e molhadas rapidamente (5s) nos líquidos dos respectivos tratamentos. Escorridos os excessos de líquido, os insetos foram colocados sobre folhas de couve-comum, igualmente tratadas. Cada folha comportou 10 lagartas, ambas contidas em caixas tipo *germbox*.

Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso, com 4 repetições. Cada unidade experimental constou de 10 lagartas de 2 cm de comprimento, aparentemente no terceiro ínstar.

O único dado de observação coletado foi o índice de mortalidade. As leituras foram realizadas nas 24, 48, 96 e 120 horas, até o empupamento ou mortalidade total das lagartas tratadas com os extratos.

A análise da variância e a regressão foram determinadas pelo pacote estatístico SOC (Centro de Ciências Rurais- Departamento de Fitotecnia, cedidos pela EMBRAPA 1986, 1988, 1989). Os dados para índice de mortalidade nas análises estatísticas, foram transformados em arco-seno da raiz quadrada da proporção de insetos mortos para insetos (lagartas) originalmente presentes.

Experimentos conduzidos:

Biotestes 1, 2 e 3. Efeito de doses de destilado de ariticum, por ingestão e contato, em diversas concentrações (volume/volume de 1/1 a 1/8) no crescimento e desenvolvimento da lagarta-da-couve (04/2004).

Com exceção para o bioteste 1, os tratamentos constaram de 5 doses de destilado (volume/volume), além da testemunha (1/1, 1/2, 1/4 e 1/8). Folhas de couve-comum e lagartas foram molhadas com os extratos e água destilada (testemunha) com 0,1% de espalhante adesivo. Cada repetição constou de uma folha de couve com 10 lagartas, acondicionadas em uma caixa tipo *germbox*.

9.4. Resultados e discussão

Biotestes 1, 2 e 3. Efeito de doses de destilado de ariticum, por ingestão e contato, em diversas doses (volume/volume, 0, 1/8, 1/4, 1/2 e 1/1) no crescimento e desenvolvimento da lagarta-da-couve, *Ascia monuste orceus* (04/2004).

Os testes de laboratório demonstraram alta eficiência do destilado de *R. silvatica* em todas as doses testadas (Tabela 1) no controle de *Ascia monuste orseis*, de tal forma, que não foi possível colher outros dados de observação, além do índice de mortalidade em todos os experimentos realizados. Nos bioteste 1 e 2, os dados indicaram que o acréscimo de uma dose mais baixa poderia ser suficiente para estabelecer curvas para diversos caracteres, além do índice de mortalidade, já que a mortalidade de 80% nas 48 horas e 85% nas 120 horas para a dose de 1/4, correspondeu também ao índice final em ambos os ensaios. Assim, a dose de 1/8, incluída no bioteste 3, deveria preencher perfeitamente as necessidades para se alcançar os objetivos do projeto. Entretanto, como pode ser observado, todas as doses (de 1/1 a 1/8) foram altamente eficientes no controle das lagartas, inviabilizando inclusive a condução do experimento até o final do ciclo de vida dos insetos. A instabilidade das moléculas que compõem o destilado, as condições ambientais (inclusive do manejo do experimento), como se refere ampla literatura a respeito, poderiam explicar, em parte, algumas discrepâncias nos resultados no bioteste 3, onde a dose mais baixa (1/8) chegou a superar as doses de 1/2 e 1/4. A relativa alta sensibilidade de *Ascia monuste orseis* aos componentes do extrato de *R. silvatica* pode também ser um dos fatores responsáveis por estas divergências. Isto tudo sugere outros procedimentos na condução de novos biotestes, inclusive havendo necessidade de fracionar os componentes bioativos para utilização nos experimentos.

A atividade inseticida de extratos de *R. silvatica* já era esperada. JOHNSON et al. (2000), pesquisando acetogeninas em *Asimus triloba* refere-se a *Rollinia* como um dos possíveis gêneros com diversas espécies contendo substâncias com potencial praguicida, como asimicina, bulatacina e trilobacina. Nos ensaios, a ação paralisante e os sintomas em geral provocados pelos extratos de *R. silvatica* sobre *A. monuste orseis*, sugere a presença de substâncias neurotóxicas e que atuam de

forma semelhante à rotenona (YAMAMOTO, 1970), mas várias vezes mais potentes que a mesma (JOHNSON et al., 2000), que podem inclusive ser tóxicas aos seres humanos. Estes mesmo autores, entretanto, sugerem o uso direto desses extratos pelos produtores rurais e CASIDA & QUISTAD, (1998) levantam ainda a possibilidade de que a descoberta de moléculas novas pode levar à síntese de compostos inseticidas neuroativos, mas que atuem em novos sítios-alvos, portanto mais específicos e seguros.

TABELA 1. Valores médios para índice de mortalidade em porcentagem para lagartas de *Ascia monuste orceus*, tratadas com doses de destilado de *Rollinia silvatica*, para os bioteste 1, 2 e 3, em laboratório. 2005.

Dose (v/v)	Bioteste 1		Bioteste 2		Bioteste 3		
	24 h	48 h	48 h	120 h	24 h	48 h	96 h
0	17,5 b	17,5	2,5 c	2,5 c	0,0 b	0,0 b	0,0 c
1/8	-	-	-	-	67,8 a	95,0 a	100,0 a
1/4	77,5 a	80,0	57,5 b	85,0 b	70,6 a	82,5 a	97,5 a
1/2	100,0 a	100,0	90,0 a	97,5 a	53,8 a	95,0 a	90,0 b
1/1	100,0 a	100,0	82,5 a	92,5 ab	62,5 a	95,0 a	100,0 a
F trat	24,37**	-	112,26**	107,43**	31,27**	54,99**	347,52**
C.V(%)	19,6	-	12,1	12,1	20,8	15,4	6,2

** F-teste significativo a 1%

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey.

9.4. Conclusões

A análise dos resultados permite concluir que:

✓ Extratos *Rollinia silvatica*, oriundos da destilação de folhas desta espécie, comprovadamente apresentam ação inseticida altamente eficiente no controle da lagarta-da-couve, *Ascia monuste orseis*.

✓ Os sintomas apresentados pelos insetos tratados com os extratos avaliados permitem sugerir que moléculas com efeitos neurotóxicos (ação paralisante) estão presentes no conjunto dos metabólitos que os compõem.

✓ O rendimento de extratos obtidos da destilação de folhas de *R. silvatica* sugere ser plenamente viável a utilização direta do composto no seu estado natural em pequenos cultivos, sem prejuízo à planta doadora.

✓ Trabalhos mais aprofundados no gênero *Rollinia* podem ser muito úteis visando a síntese de análogos ou derivados mais adequados às novas exigências da sociedade, em termos de saúde e ambiente. Os avanços podem ainda atingir, a médio e longo prazos, a área de biologia molecular, na busca de novos genes de resistência.

10 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

✓ A metodologia desenvolvida neste trabalho, em bioensaios básicos, com apenas a dose de 1/3 (p/v) por extrato, mostrou-se eficiente na detecção de extratos de espécies vegetais promissoras, tanto como excipientes de agentes tóxicos, quanto de agentes bioestimulantes. Até mesmo o desenvolvimento de biotestes básicos de alelopatia sem desinfecção dos materiais mostrou-se eficiente para leituras até cinco dias da instalação dos experimentos, tempo plenamente suficiente para alcançar os objetivos propostos, proporcionando a que se possa conduzir tais tipos de experimentos *in loco*.

✓ A alelopatia é uma regra geral entre as espécies vegetais, tanto que, com raras exceções, de uma forma ou de outra, praticamente todos os extratos vegetais aquosos, na concentração de 1/3 (p/v), aplicados sobre sementes e plântulas de *Lactuca sativa*, provocaram efeitos significativos na manifestação de um ou mais caracteres nesta espécie reagente, tanto inibindo, quanto estimulando os mesmos.

✓ O extrato de *Cymbopogon citratus* (capim-cidrô) mostrou-se altamente alelopático em bioensaios de laboratório contra sementes e plântulas de *Lactuca sativa*, *Bidens pilosa* e *Triticum aestivum*, demonstrando que contém diversos compostos promissores, que podem ser pesquisados pela área de química e biologia molecular, visando uma agricultura mais sustentável.

✓ O extrato de *C. citratus* mostrou-se altamente tóxico aos materiais reagentes, prenúncio de que possa conter agentes de controle de pragas. A ocorrência de efeitos horméticos sugere a presença de compostos herbicidas nesse extrato, dada a similaridade das curvas de dose-resposta com a de ensaios convencionais com herbicidas.

✓ O extrato de *Achyrocline satureioides* (marcela) mostrou-se altamente bioativo, quando testado contra *L. sativa*, *B. pilosa* e *T.*

aestivum, com proeminência para as propriedades bioestimulantes, capazes de ativar o crescimento de plântulas, principalmente relativamente ao caráter estatura de plântula, com reflexos positivos nos níveis de matéria seca das raízes e parte aérea.

▼ *A. satureioides* provavelmente contém também agentes tóxicos ou inibidores do crescimento, além de um ou mais agentes protetores contra estresse térmico, que claramente mostram interagir nos bioensaios de alelopatia.

▼ A presença de agentes inseticidas em extratos de *Rollinia silvatica*, *Melia azedarach*, *Eucalyptus citriodora* e *Solanum paniculatum*, detectados nos experimentos, através da metodologia utilizada e que se mostrou eficiente, permite concluir que deve haver um imenso potencial a explorar nas espécies vegetais, na busca por uma agricultura mais sustentável.

▼ Pela ação inseticida semelhante do extrato de *Melia azedarach*, comparativamente com *Azadirachta indica*, e por essa espécie ser melhor adaptada à Região Sul do Brasil, além do fato de que o uso de folhas para preparação de extratos apresenta mais características de sustentabilidade, pode-se inferir que esta meliácea, de farta distribuição nesta Região, é mais promissora do que o nim, nestas condições.

▼ O uso de destilado de folhas de *R. silvatica* pode ser muito útil como inseticida na agricultura em pequena escala, desde que a coleta do material vegetal não venha comprometer a planta doadora.

▼ Trabalhos mais avançados no gênero *Rollinia* podem ser muito úteis visando a síntese de análogos ou derivados mais adequados às novas exigências da sociedade, em termos de saúde e ambiente. Os avanços podem ainda atingir, a médio e longo prazos, a área de biologia molecular, na busca de novos genes de resistência.

▼ Os modelos logístico e polinomial, utilizados concomitantemente, mostraram-se ambos eficientes para explicar matematicamente as curvas de dose-resposta nos bioensaios para testar efeitos inibidores de extratos

de *C. citratus*. Já nos bioensaios com extrato de *A. saturoioides*, onde foram avaliados os efeitos indutores do crescimento, o modelo polinomial mostrou-se bem mais adequado para explicar matematicamente os fenômenos biológicos.

▼ A espécie *T. aestivum*, cultivar RS-8, mostrou-se satisfatoriamente sensível como material reagente em ensaios de alelopatia, além de tornar possível a elaboração de experimentos relativamente mais precisos, pela uniformidade das reações, certamente devida à pureza genotípica característica das variedades de trigo disponíveis no mercado.

▼ A espécie *L. sativa* mostrou-se adequadamente sensível como material reagente nos bioensaios de alelopatia, mas a aparente variabilidade genética das variedades encontradas no mercado muitas vezes conduziu à obtenção de experimentos pouco precisos. Recomenda-se então a seleção de linhagens de *L. sativa*, especificamente para a realização de ensaios de alelopatia, com germinação e crescimento e desenvolvimento de plântulas mais uniformes.

▼ A integração com outros departamentos da Universidade Federal de Santa Maria, a partir deste trabalho, e a evolução do processo de cooperação e interconexão com de outras áreas, como a bioquímica e a biologia molecular, visando a elaboração de um projeto mais amplo, a nível institucional, ou mesmo interinstitucional, pode significar o caminho para a auto-suficiência institucional.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, G. O.; ODESOLA, B. A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.37, p.81-84, 1996.

ADEL, M. M.; SCHNAL, F. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. **Journal of insect Physiology**, v.46, p.267-274, 2000.

AGROL. Intoxicação por agrotóxicos: definição e classificação dos agrotóxicos. **Agropecuária on line**. Disponível em:<<http://www.activenet.com.br/pessoais/PChomepage/toxico.htm>> Acesso em 18 de agosto de 2001.

ALBERNAZ, K. C.; BARROS, R. G.; TAKATSUKA, F. S.; PEREIRA, M. B.; CZEPAK, C.; OLIVEIRA FILHO, J. F. Efeito repelente do extrato alcoólico de folhas de louro (*Laurus nobilis* L.) sobre adultos de *Blattella germanica* L. . IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.281.

ALLARD, R. W. **Principles of Plant Breeding**. Toppan Company Ltda, 1960, 485p.

ALMEIDA, F. S. **A Alelopatia e as Plantas**. Londrina: IAPAR, 1988. 60p.

ALTIERI, A. & NICHOLLS, C. I. Resgatando a agricultura orgânica a partir de um modelo industrial de produção e distribuição. **Ciência e Ambiente**. Santa Maria, v.27, n. 2, p.141-152, 2003.

AMBIENTEBRASIL. Pesquisa revela contaminação de legumes, verduras e frutas por agrotóxicos. **AmbienteBrasil**. 05 de abril de 2002. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/agenda?index.php3?action=ler&id=4095>> Acesso em: 11 abril 2004.

AMBIENTEBRASIL. Agricultores aplicam agrotóxicos em excesso. **AmbienteBrasil**. 29 de junho de 2002. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/noticias/?action=ler&id=4977>> Acesso em: 11 abril 2004.

AMORIM, L. L.; THOMAZINI, M. J.; ALBUQUERQUE, E. S.; CALVALCANTE, A. S. S. Efeitos de óleos essenciais de piperáceas sobre ovos de *Ceraeochrysa cubana*. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.295.

ANDRADE, R. S.; CURADO, D. L. A.; CAIXETA, D. F.; CZEPAK, C.; PARUSSOLO, T. A.; TAKATSUKA, F. S. Avaliação em laboratório de extratos vegetais alcoólicos para controle do pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*).). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.546.

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos. Relatório 2001/2002 e Relatório 2002/2003. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Abril de 2004. Disponível em: <www.anvisa.org.br>. Acesso em: 11 de abril de 2004.

AUSEMUS, E. R.; McNEAL, F. H.; SCHMIDT, J. W. **Genetics and inheritance** In: Wheat and Wheat Improvement, K. S. Quisenberry & L. P. Reitz eds., Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc., 1967, p. 225-259.

VERY, L. & WASSERMAN, S. Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies. **Trends Genet.**, n.8, p.312-316, 1992.

AZEVEDO, A. I. B.; LUCENA, W. A.; SOUZA JÚNIOR, J. D. A.; MOREIRA, M D.; SANTOS, J. B.; MIRANDA, J. E. Efeitos do extrato de sisal sobre o curucurê (Lepidoptera: Noctuidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.311.

AZEVEDO, J. L. Controle biológico de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L., eds., Controle Biológico, V.1, JAGUARIÚNA: EMBRAPA, 1998, p.69-96.

AZEVEDO, J. L. O uso dos fungos na biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L., coord., **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. Cap. 1, p.93-152.

BALAGUÉ, C.; LIN, B.; ALCON, C.; FLOTTESA, G.; MALMSTROM, S.; KOHLER, G.; NEUHAUSC, PELLETIERD, G.; GAYMARD, F.; ROBY, D. HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. **Plant Cell**, v.15, p.365-379, 2003.

BARBIERI, C. P. & FIUZA, L. M. Bioatividade de extratos vegetais à *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.317.

BARREIRO, E. J. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Mediciniais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.237-296

BARTH, C.; MOEDER, W.; KLESSIG, D. F.; CONKLIN, P. L. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. **Plant Physiology**, v.134, p.1784-1792, 2004.

BECK, S. D.; SCHOONHOVEN, L. M. Conducta de los insectos y resistencia vegetal In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos**. México, D.F: Editorial Limusa S. A., 1984, p. 135-154.

BEEMAN, R. W. Recent advances in mode of action of insecticides. **Ann. Rev. Entomol.**, v.27, p.253-281, 1982.

BERGEY, D. R.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, n.93, p.12053-12058, 1996.

BERLITZ, D. L. & FIUZA, L. M. Citotoxicidade de plantas medicinais às lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.313.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA. A.; SOLANO, R. Constitutive expression of ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **Plant J.**, v.29, p.32-32, 2002.

BESERRA, E. B.; DANTAS, J. P.; SILVA, A. C.; SOUSA, N. A.; MELO, A. J. M.; ALMEIDA NETO, J. X. Avaliação do uso de extratos vegetais e biofertilizante para o controle de pragas do repolho, *Brassica oleraceae*. IN: CONGRESSO

BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...**
Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004a, p.547.

BESERRA, E. B.; DANTAS, J. P.; SOUSA, N. A.; SILVA, A. C.; ALMEIDA NETO, J. X.; MELO, A. J. M. Utilização de extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* em milho.). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...**
Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004b, p.547.

BLAS, L. **Química de los insecticidas**. Madrid: Aguilar, S. A. de ediciones. 1951, 208p.

BLUM, U. The use of plant-microbe-soil model systems for characterizing allelopathic interactions involving mixtures of phenolic acids and/or other compounds, **J. Nematol.**, **28**, **259**, 1996.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. In: INDERJIT, DAKHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, p.17-23

BODE, H. B. & MÜLLER, R. Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. **Plant Physiol.**, v.132, p.1153-1161, 2003.

BOGORNÍ, P. **Efeito de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**.2003, 65p.Tese (Doutorado em Entomologia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

BOHNENSTENGEL, F. I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVATAVA, R. P.; PROKSCH, P. Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, n.50, p.977-982, 1999.

BOSTOK, R. M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, v.55, p.99-109, 1999.

BRADER, G.; TAS, E.; PALVA, E. T. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen, *Erwinia carotovora*. **Plant Physiol.**, v.126, p.849-860, 2001.

BRAIN, P. & COUSENS, R. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. **Weed Res.** v.29, p.93-96, 1989.

BREWBACKER, J. L. **Genética na Agricultura**. São Paulo, SP: Editora Polígono S. A., 1969, 217 p.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines- linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiol**, v.1124, p.507-514, 2000.

BRITO, G. G. **Efeitos de doses do óleo de nim (*Azadirachta indica*) A. Juss (Meliaceae) sobre *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

BRUNHEROTO, R. **Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (meyrich, 1917) (Lep.: Gelechiidae) criadas em diferentes genótipos de tomateiro**. 2000. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Entomologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BURG, I. C.; MAYER, P. H. **Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. Francisco Beltrão: Gráfica e Editora Grafite, 1998, 137p.

CABRERA, A. L. Compositae. **Flora de la Provincia de Buenos Aires**. Buenos Aires: INTA, parte 6, 1963, 443 p.,

CALEFFI, S. Impacto do uso de sulfato de cobre sobre o zooplâncton na represa de Guarapiganga In. **Ecotoxicologia, Perspectivas para o Século XXI**. Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira-Neto, A. L., eds. São Carlos, SP: RiMa, 2000, p.3-14

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Medicinalis Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.77-99.

CANELLAS, L. P.; NELSON, G. A. S.; SOBRINHO, M. B. A.; MORAES, A. A.; RUMJAMEK, V. M. Adsorção de Cu^{2+} e Cd^{2+} em ácidos húmicos extraídos de resíduos orgânicos de origem urbana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 21-26, 1999.

CANUTO, J. C. A pesquisa e os desafios da transição ecológica. **Ciência e Ambiente**. n. 27, v. 2, p.133-140, 2003.

CAPARROS-LEFEBVRE, D. & ELBAZ, A. Possible relation of typical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **The Lancet**, v.354, i9175, p281.

CASIDA, J. E. & QUISTAD, G. B. Gold age of insecticide research: past, present, or future. **Ann. Rev. Entomol.** V.43, p.1-16, 1998.

CARVALHO, D. M. F. Luxo no lixo. **Cultivar**, Pelotas, RS, n.9, p. 18-19, 1999.

CASTRO, L. O. & CHEMALE, V. M. **Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas: Descrição e cultivo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda, 1995. 196p.

CECHINEL-FILHO, V. & YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica: obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.47-75.

CENTRO de SAÚDE AMBIENTAL. Aspectos epidemiológicos e clínicos das intoxicações por agrotóxicos. **Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, Instituto de Saúde do Paraná**, 1997. Disponível em <www.saude.pr.gov.br/saude_ambiental/aspectos_epidemiologicos.htm> Acesso em 25 de agosto de 2001.

CHAPMAN, R. F. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.48, p.455-484, 2003.

CHON, S. U.; KIM, Y. M.; LEE, J. C. Herbicidal potencial and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed Research**, v.43, n.6, p.444-450, 2003.

CLARO, S. A. **Referenciais tecnológicos para a agricultura familiar ecológica: a experiência da Região Centro-Serra do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2001, 250 p.

COBB, A. **Herbicides and plant physiology**. London: Chapman & Hall, 1992, 176 p.

COITINHO, R. L. B. C.; OLIVEIRA, J. V.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; CÂMARA, C. A. G. Determinação de concentrações e tempos letais 50 de óleos vegetais sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Mots., 1865 (Coleoptera: Corculionidae) em grãos de milho *Zea mays* L. armazenados. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.591.

COSTA, E. C. Situação florestal entomológica do Rio Grande do Sul. In. **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Ed. Pallotti, Santa Maria, 2000, p. 227-234

COSTA, S. O. P. As bactérias em biotecnologia. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L., coord., **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. Cap.1, p.75-91.

CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Março 2001. Disponível em: < site <http://www.biotecnologia.com>> Acesso em 08/04/2001.

CUI, J.; JANDER, G.; RACKI, L. R.; KIM, P. D.; PIERCE, N. E. ; AUSUBEL, F. M. Signals involved in Arabidopsis resistance to *Trichoplusia nu* caterpillars induced by virulent and avirulent strains of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Physiol.**, v.129, p.551-564, 2002

CUNHA, U. S.; ROCHA, W. C.; VENDRAMIM, J. D.; VIEIRA, P. C. Busca de substâncias de *Trichillia pallida* (Meliaceae) com atividade sobre a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrich, 1917) (Lep.: Gelechiidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.583.

DAHMS, R. G. Insect attacking wheat In., K. S. Quisenberry & L. P. Reitz eds., **Wheat and Wheat Improvement**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Inc., 1967, p. 411-443.

DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L.; INDERJIT. Allelopathy: one component in a multifaceted approach to ecology. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. CRC Press LLC, 1999, p. 3-14.

DAKSHINI, K. M. M.; INDERJIT. Bioassays for allelopathy: interactions of soil organic and inorganic constituents. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. CRC Press LLC, 1999, p. 35-44.

DALTON, B. R. The occurrence and behavior of plant phenolic acids in soil environments and their potential involvement in allelochemical interference interactions: methodological limitations in establishing conclusive proof of allelopathy. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. CRC Press LLC, 1999, p. 57-74.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; SARTORI, T. C. F.; RODRIGUES, P. F.; PERIN, E. A.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Effects of *Annona squamosa* extract on early pregnancy in rats. **International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v.9, p.667- , 2002.

DANGL, J. L. & JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense response to infection. **Nature**, n. 411, p. 826-833, 2001.

De BORTOLI, S. A.; THULER, R. T.; ALBERGARIA, N. M. M. S.; DÓRIA, H. O. S.; De BORTOLI, S. L. P. Toxicidade do extrato etanólico de castanha de caju para traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). IN:

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado.
Anais... Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.339.

De JESUS, F. G.; PORTILHO, T. G.; MARUYAMA, L. C. T.; FIGUEIREDO FILHO, H. G. Estudo da ação de produtos químicos, biológicos e plantas inseticidas no controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho, *Zea mays* L. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.273.

DESPRÈS, C.; CHUBAK, C.; ROCHON, A.; CLARK, R.; BETHUNE, T.; DESVEAUX, D.; ROBERT, P. R. The Arabidopsis NPR1 disease resistance is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. **Plant Cell**, v.15, p.2181-2191, 2003.

DÍAZ, J.; HAVE, A. T.; Van KAN, J. A. L. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*, **Plant Physiology**, v.129, p.1341-1351, 2002.

DIMITRI, M. J. **Enciclopédia Argentina de agricultura e jardineria**. Buenos Aires: ACME, 1980, p. 1040.

DOWD, P. F. Enhanced maize (*Zea mays* L.) pericarp browning: associations with insect resistance and involvement of oxidizing enzymes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 11, p. 2777 – 2803, 1994.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE L.V.; DELAMARE, A. P. L.; ZENI, A. L. B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia**

na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2001. Cap. 7, p.257-278

ECKARDT, N. A.; CHO, H.; PERRIN, R. M.; WILLMANN, M. R. Meeting report – plant biology 2001. **The Plant Cell**, v.13, p.2165-2173, 2001.

ECKARDT, N. A. Aminotransferases confer “enzymatic resistance” to downy mildew in melon. **Plant Cell**, v.15, p.1-4, 2004

ELAKOVICH, S. D. Bioassays applied to allelopathic herbaceous vascular hydrophytes. In: INDERJIT, DAKHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology.** CRC Press LLC, 1999, p. 45-56.

ELLIOT, F. C. **Mejoramiento de Plantas e Citogenética.** México, D.F: Compañía Editorial Continental S. A., 1967, 474 p.

ELLIS, C. & TURNER, J. G. The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. **Plant Cell**, v.13, p.1025-1033, 2001.

FDA. Poisonous plant bibliography. **U. S. Food & Drug Administration.** 2001. Disponível em:< <http://www.vm.cfsan.fda.gov>> Acesso em 25 de abril de 2001.

FEPAGRO. Anotações de Campo-Arquivo Coleção.doc. **Centro de Pesquisas de Florestas e Conservação do Solo** , Santa Maria: FEPAGRO, 1999.

FERNANDES, E. A.; CZEPAK, C.; CAIXETA, D. F.; BARROS, R. G.; RIBEIRO, N. M. M. Avaliação da repelência alimentar e da mortalidade provocadas por diferentes extratos vegetais sobre o percevejo pequeno (*Piezodorus guildinii*). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.539.

FERREIRA, A. G.; MACHADO, A. L. S.; ZALMON, E. R. Metais pesados em moluscos bivalves no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro In. **Ecotoxicologia, Perspectivas para o Século XXI**. Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira-Neto, A. L., eds. São Carlos, SP: RiMa, 2000, p. 167-182

FORBES, V. E. Is hormesis na evolutionary expectation? **Functional Ecology**, v.14, p.12-22, 2000.

FOSTER, S. P.; HARRIS, M. O.; Behavioral manipulation methods for insect pest-management. **Ann. Rev. Entomol.**, v.42, p.123-146, 1997.

FOSTIER, A. **Mercúrio nos peixes e nas águas da bacia do Piracicaba**. In. NOTÍCIAS PIRACENA, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, n. 27. 1998. On line. Disponível: <<http://www.cena.usp.br/piracena/html/noticias/noticias27.htm>>. Acesso em 22 de agosto de 2001.

FOY, C. L. How to make bioassays for allelopaty more relevant to field conditions with particular reference to cropland weeds. In: INDERJIT, DAKHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. CRC Press LLC, 1999, p. 25-33.

FRANKEL, O. H. **Genetic resources as the backbone of plant protection** In. Induced Mutations Against Plant Diseases (Proceedings of a Symposium, Vienna, 1977) IAEA, Vienna, 1977, p.3-12

GAJMER, T.; SINGH, R.; SAINI, R. K.; KALIDHAR, S. B. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach* L.) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.) (Lep., Noctuidae). **J. Appl. Ent.**, v.126, p.238-243, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. L. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVEZ, S. B.; VENDRAMIM, J. S. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 1988, 649 p.

GALLUN, G. L.; KHUSH, G. S. Factores genéticos que afectan la expresión y estabilidad de la resistencia In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos.**, México, D. F: Editorial Limusa S. A, 1984, p. 83 – 105.

GANG, D. R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; NAM, K. H.; SIMON, J. E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. Na investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiol.**, v.125, p.539-555, 2001.

GATEHOUSE, A. M. R.; HOWE, D. S.; FLEMING, J. E.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, J. A. Biochemical basis of insect resistance in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. **J. Sci. Food Agric.**, n. 55, p. 63-74, 1991.

GAZETA MERCANTIL. Intoxicação faz 300 mil vítimas por ano. **Gazeta Mercantil**. 10 de fevereiro de 2001. Disponível em: <[http:// www.gazetamercantildf.com.br/ms/jornal/9472.htm](http://www.gazetamercantildf.com.br/ms/jornal/9472.htm)> Acesso em: 5 abril 2004.

GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; ALEXANDRE, M. M. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**. v.50, p.477-480, 2004.

GELBIC, I.; NEMEC, V. Developmental changes caused by metyrapone and azadirachtin in *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) and *Galleria mellonella* (L.) (Lep.; Pyralidae). **J. Appl. Ent.**, v.125, p.417-422, 2001.

GERSHENZON, J.; McCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiol.**, v.122, p.205-214, 2000.

GILBERT, L. I.; RYBCZYNSKI, R.; WARREN, J. T. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. **Ann. Rev. Entomol.**, v.47, p. 883-916, 2002.

GLIESSMAN, S. R. Agroecología y agroecosistemas. **Ciência e Ambiente**. Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 107-120, 2003.

GOMES, J. C. C. Pluralismo epistemológico e metodológico como base para o paradigma ecológico. **Ciência e Ambiente**. Santa Maria, v.27, n.2, p. 121-132, 2003.

GONÇALVES, P. A. S. Extratos vegetais e substâncias alternativas no manejo de *Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera: Thripidae) e sirfídeos predadores em cebola orgânica). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.573.

GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; VANCONCELOS, G. J. N.; BARROS, R.; SILVA, F. R. Alternativa de controle de *Bemisa tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) com extratos aquosos no Arquipélago de Fernando de Noronha. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.551.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Ann. Rev. Entomol.**, v.43, p.701-725, 1998.

GRAHAM, J.; McNICOL, R. J.; GREIG, K. Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor gene. **Ann. Appl. Biol.**, n. 127, p. 163 – 173, 1995.

GRAINGE, M. & AHMED, S. **Handbook of plants with pest control properties.** New York: John Wiley, 1988. 470p.

GRIFFITHS, A.; BARRY, C.; ALPUCHE-SOLIS, A. G.; GRIERSON, D. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 335, p.793-798, 1999.

GU, Y.; YANG, C.; THARA, V. K.; ZHOU, J.; MARTIN, G. B. *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. **Plant Cell**, v.12, p.771-786, 2000.

GU, Y.; WILDERMUTH, M. C.; CHAKRAVARTHY, S.; LOH, Y.; YANG, C.; HE, X.; HAN, Y.; MARTIN, G. B. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.14, p.817-831, 2002.

HANSEN, H. & GROSSMANN, K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiol.**, v.124, p.1437-1448, 2000.

HAO, L.; WANG, H.; SUNTER, G.; BISARO, D. M. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. **Plant Cell**, v.15, 1034-1048, 2003.

HARTMANN, T.; WITTE, L.; EHMKE, ^a; THEURING, C.; ROWELL-RAHIER, M.; PASTEELS, J. M. Selective sequestration and metabolism of plant derived

pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles. **Phytochemistry**, v. 45, n. 3, p. 489 – 497, 1997

HERTWIG, I. F.V. **Planta Aromáticas e Medicinais**. São Paulo: Icone Editora Ltada, 1986, 449 p.

HOFFMAN, T.; SCHMIDT, J. S.; ZHENG, X.; BENT, A. F. Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. **Plant Physiol.** n.119, p935-950, 1999.

HOMMA, A. K. O. Patrimônio genético da Amazônia, como proteger da biopirataria? In: **Seminário Internacional sobre Biodiversidade e Transgênicos**. Brasília: Senado Federal. 1999, p.95-109.

HORBER, E. Tipos y clasificación de la resistencia In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos**. Editorial Limusa S. A, México, D. F., 1984, p. 35-41.

HUANG, R. C.; TADERA, K.; YAGI, F.; MINAM, Y.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; NAKATANI, M. Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v.43, n.3, p.581-583, 1996.

HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K.; NAKATANI, M. Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v.38, n.3, p.593-594, 1995.

HUGOT, K.; RIVIÈRE, M.; MOREILHON, C.; DAYEM, M. A.; COZZITORTO, J.; ARBIOL, G.; BARBRY, P.; WEISS, C.; GALIANA, E. Coordinated regulation of genes for secretion in tobacco at late developmental stages: association with resistance against oomycetes. **Plant Physiol.**, v.134, p.858-870, 2004.

HUNT, D. L & BOWMAN, D. A parametric model for detecting hormetic effects in developmental toxicity studies. **Risck Analisis**, v.24, p.65-72, 2004.

IKUTA, A. R. Y. Estudos sobre propagação de marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. In: MING, L. C. et al. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998, p. 23-42.

INDERJIT & DAKSHINI, K. M. M. Bioassays for allelopathy: interactions of soil organic and inorganic constituents. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. CRC Press LLC, 1999, p. 35-44.

ISMAN, M. B.; KOUL, O.; LUCZYNSKI, A.; KAMINSKI, J. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. **J. Agric. Food. Chem.**, v.38, p.1406-1411, 1990.

JEZOVSEK, G. K. Uma nova proposta para o controle das ervas daninhas: o uso de plantas transgênicas. In: I SIMPÓSIO SOBRE HERBICIDAS E PLANTAS DANINHAS. **Resumos**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997, p. 62-74.

JOHNSON, H. A.; ORBELIES, N. H.; ALALI, F. Q.; McLAUGHLIN, J. L. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.173-184.

JULKUNEN-TIITTO, R.; TAHVANAIENEN, J.; SILVOLA, J. Increased CO₂ and nutrient status changes affect phytomass and the production of plant defensive secondary chemicals in *Salix myrsinifolia* (salisb.) *Oecologia*, n. 95, p. 495 – 498, 1993

KACHRO, A.; LAPCHYK, L.; FUKUSHIGE H.; HILDEBRAND, D.; KLESSIG, D.; KACHROO, P. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid and jasmonic

acid-mediated defense pathways in the *Arabidopsis* ssi2 mutant. **Plant Cell**, v.15, 2952-2965, 2003.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.**, n. 44, p.283-307, 1993.

KIEBER, J. J. The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, n. 48, p.277-296, 1997.

KINGHORN, A. D.; CUI, B.; ITO, A.; CHUNG, H. S.; SEO, E.; CHANG, L. C. Fractionation of plants to discover substances to combat cancer. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.17-24.

KINGSTON, D. G. I.; ABDEL-KADER, M.; ZHOU, B. ... Biodiversity conservation, economic development, and drug discovery in Suriname. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.39-59.

KITAMURA, P. C. Agricultura sustentável no Brasil- avanços e perspectivas. **Ciência e Ambiente**. Santa Maria, v. 27, p. 8-28, 2003.

KLOCKE, J. A. Natural plant compounds useful in insect control. In: WALLER, G. R. eds. **Allelochemicals: role in agriculture and forestry**. Washington: American Chemical Society, p.396-415, 1987.

KORVES, T. M. & BERGELSON, J. A developmental response to pathogen infection in *Arabidopsis*. **Plant physiol.**, v.133, p.339-347, 2003.

KRUSE, N. D. **Análise da associação de metribuzin e clomazone como modelo para o estudo do sinergismo entre herbicidas**. 2002. 111 f. Tese

(Doutorado em Fitotecnia, Área de Concentração Plantas de Lavoura)-
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

KUS, J. V.; ZATON, K.; SARKAR, R.; CAMERON, R. K. Age-related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell**, v.14, p.479-490, 2002.

KOUL, O.; ISMAN, M. B.; KETKAR, C. M. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. **Canadian Journal of Botany**, v.68, n.1, p. 1-11, 1990.

LAGUNES, T. A.; RODRIGUEZ, H. C. **Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas**. Chapingo: CONACYT-CP, 1989, 150 p.

LANDOLT, P. J. Host plant influences on sex hormone behavior of phytophagous insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.42, p.371-391, 1997.

LAWTON, K.; WEYMANN, K; FRIEDRICH, L; VERNOOIJ, B.; UKNES, S.; RYALS, J. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.8, n.6, 863-870, 1995.

LEHMAN, M. E. & BLUM, U. Debris effects on weed emergence as modified by environmental factors. **Allelopathy j.**, v.4, p.69,1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 1995, 839 p.

LEVY, Y. Y. & DEAN, C. The transition to flowering. **Plant cell**, v.10, p.371-382, 1998.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y, KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D. M. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**. v.81, n.1, p.35-39, 1998.

LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E. T. The WRKY70 transcription factor : a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **Plant Cell**, v.16, p319-331, 2004.

LIANG, G.; CHEN, W.; LIU, T. Effects of three neem-base insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: plutellidae). **Crop Protection**, v.22, p.333-340, 2003.

LITVAN, I.; CAPARROZ-LEVEBVRE, D.; LEES, A.; COLLINS, M. A.; STEELE, J. C.; MORRIS, H. R.; PEREZ-TUR, J.; McGEER, P. Atypical parkinsonism in the French West Indies. **The Lancet**, v.354, i9188, 1999. p1472

LIU, X.; SHIOMI, S.; NAKATSUKA, A.; KUBO, Y.; NAKAMURA, R.; INABA, A. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. **Plant Physiol.**, v. 121, 1999, 1257-1265.

LOGAN, J. W. M; COWIE, R. H.; WOOD, T. G. Termite (isoptera) control in agriculture and forestry by no-chemical methods: a review. **Bulletin of Entomological Research**, v.80, n.3, p.309-330, 1990.

LOGEMANN, E.; PAMISKE, M.; HAHLBROCK, K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.5905-5909, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de indentificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. V.2, 2. ed., Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1998.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 131-132, 2002.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, v.15, p.165-178, 2003.

LU, H., RATE, D. N.; SONG, J. T.; GREENBERG, J. T. ACD6, a novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the Arabidopsis defense response. **Plant Cell**, v. 15, 2408-2420, 2003

LU, S.; XU, R.; JIA, J.; PANG, J.; MATSUDA, S. P. T.; CHEN, X. Cloning and functional characterization of a –pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. **Plant Physiol.**, v.130, p477-486, 2002.

LUCKER, J.; SCHWAB, W.; Van HAUTUM, B.; BLAAS, J.; Van der PLAS, L. H. W.; BOUWMEESTER, H. J.; VERHOEVEN, H. A. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. **Plant Physiol.**, v.134, p.510-519, 2004.

LUMMIS, S. C. R.; GALIONE, A.; TAYLOR, C.W. Transmembrane signalling in insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.35, p.345-377, 1990.

MackENZIE, D. R. El problema de la varidad de plagas In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos**. México, DF: Editorial Limusa S. A, 1984, p. 203-350

MAFFEI, M.; BOSSI, S.; SPITELLER, D.; MITHOFER, A.; BOLAND, W. Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretion, and regurgitate components. **Plant Physiology**, v.134, p.1752-1762, 2004.

MALECKA, K.; NEUENSCHWANDER, U.; CADEA, R. M.; DIETRICH, R. A.; DANGL, J. L.; RYALS, J. A. Isolation and characterization of broad-spectrum disease-resistant Arabidopsis. **Genetics**, v. 160, p.1661-1671, 2002.

MALHEIROS, A. & PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Mediciniais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.503-523.

MANCEBO, F.; HILJE, L.; MORA, G. A.; SALAZAR, R. Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. **Crop Protection**, v.21, p.1070-112, 2002.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas, Volume I: defensivos**. São Paulo: Nobel. 1981.

MARTIN, D. M.; GERSHENZON, J.; BOHLMENN, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of norway spruce. **Plant Physiol.**, v.132, p.1586-1599, 2003.

MARTINEZ, S. S. **O nim, *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. 142p.

MARTINEZ, S. S.; EMDEN, H. F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Nocuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.113-125, 2001.

MASUTTI, M. B.; PANITZ, C. M. N.; PEREIRA, N. C. Biodisponibilidade e bioconcentração de metais-traço no Manguezal do Itacorubi (Florianópolis, SC) In. **Ecotoxicologia, Perspectivas para o Século XXI**. Espíndola, E. L. G.; Botta-Paschoal, C. M. R.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira-Neto, A. L., eds. São Carlos, SP, RiMa, 2000, p. 207-219.

MATURANA, R. H. **Cognição, ciência e vida cotidiana**. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2001. 203p.

MAYROSE, M.; BONSHTIEN, A.; SESSA, G. LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.15, p.14819-14827, 2004.

MAZZONETTO, F. Efeito repelente e de toxicidade de substâncias de origem vegetal sobre *Zabrotes subfaciatus* (Boh.) (Coleoptera:Bruchidae) em feijão armazenado.). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.569.

McCURDY, C. R.; MILLER, R. L.; BEACH, W. A natural product with high affinity for neuronal nicotinic receptors and a vast potencial for use in neurological disorders. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.151-162

McKAY, S. A. B.; HUNTER, W.L.; GODARD, K.; WANG, S. X.; MASRTIN, D. M.; BOHLMANN, J.; PLANT, A. L. Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of (–)-pinene synthase in sitka spruce. **Plant Physiol.**, v.133, p.368-378, 2003.

McMILLIAN, W.W.; BOWMAN, M.C.; BURTON, R. L.; STARKS, K.J.; WISEMAN, B.R. Extracts of chinaberry leaf as a feeding deterrent and growth retardant for larvae of the corn earworm and fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**. v.62, n.3, p.708-710, 1969.

MENEGATT, C.; RESTELLO, R. M.; MOSSI, A. J. Uso de óleos essenciais no controle de *Sithophilus zeamais* (Most, 1855) (Insecta: Coleoptera) em milho armazenado. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.291

MENGISTE, T.; CHEN, X.; SALMERON, J.; DIETRICH, R. The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.15, 2551-2565, 2003.

MILLER, J. S.; GEREAU, R. E. Therapeutic potential of plant-derived compounds:realizing the potential. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.25-37.

MONGE, A. Patentes e contratos no descobrimento de medicamentos nos países em desenvolvimento: uma reflexão da perspectiva do investigador. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.335-349.

MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*; its actions against insects. **An. Soc. Entomol. Brasil.**, v.29, n.4, p.615-632, 2000.

MOSCARDINI, F. O controle de pragas agrícolas e a sustentabilidade ecológica. **Ciência e Ambiente**. Santa Maria, v. 27, n. 2, 2003, p. 67-84

MOSS, R. W. The war on cancer. **Townsend Letter for Doctors and Patients**. Internet (18 de maio de 2004. www.cancerdecisions.com). Nov 2003, i244, p 34 (2).

MÜLLER-SCHARER, H.; SCHEEPENS, P. C.; GREAVES, M. P. Biological control of weeds in European crops; recent achievements and future work. **Weed Research**, v.40, p.83-98, 2000.

NANDIA, A.; KROTHAPALLIA, K. BUSEMANA, C. M.; LI, M.; WELTIA, R.; ENYEDIC, A.; SHAH, J. Arabidopsis sfd mutants affect plastidic lipid composition and suppress dwarfing, cell death, and the enhanced disease resistance phenotypes resulting from the deficiency of a fatty acid desaturase. **Plant Cell**, v.15, p.2383-2398, 2003.

NAUEN, R. & BRETSCHNEIDER, T. New odesof action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v.13 , p.241-245, 2002.

NICOLA, E.; GALLO, M.; IACARINO, M.; MERIC, S.; ORAL, R.; RUSSO, T.; SORRENTINO, T.; TÜNAY, O.; VUTTARIELO, E.; WARNAU, M.; PAGANO, G. Hormetic versus toxic effects of vegetable tannin in a multitest study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.46, n.3, p.336-344, 2004.

NIINEMETS, U.; REICHSTEIN, M.; STAUDT, M.; SEUFERT, G.; TENHUNEN, J. D. Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*., **Plant physiol.**,v.130, p.1371-1385, 2002.

NEVES, B. P. & NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss)**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1996, 32p. (Circular Técnica, 28).

NOLTE, D. L.; MOSON, J. R.; LEWIS, S. L. Tolerance of bitter compounds by a herbivore, *Cavia porcellus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 2, p. 303–308, 1994.

NORRIS, D. M.; KOGAN, M. Bases bioquímicas y morfológicas de la resistencia In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos**. México, DF: Editorial Limusa S. A, 1984, p. 43-80.

NORRIS, R. F.; CASWELL-CHEN, F. P.; KOGAN, M. **Concepts in integrated pest management**. New Jersey: Prentice Hall, 2003, 586p.

O'DONNELL, P. J.; JONES, J. B.; ANTOINE, F. R.; CIARDI, J.; KLEE, H. J. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. **Plant J.**, v. 25, p.315-323, 2001.

O'DONNELL, P. J.; SCHMELZ, E. A.; MOUSSATCHE, P.; LUND, S. T.; JONES, J. B.; KLEE, H. J. Susceptible to intolerance; a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. **Plant J.**, v.33, p.245-257, 2003.

OLIVEIRA JR., R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR., R. S., CONSTANTINI, J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Editora Agropecuária, 2001, Cap. 7, p. 206-260.

OLIVEIRA, J. V.; FRANÇA, S. M.; FERREIRA, R. C. F.; ESTEVES FILHO, A. B. Atividade inseticida de óleos vegetais na mortalidade de adultos, postura e emergência de *Callosobruchus maculatus* Fabr. (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de Caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. . IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE

ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.591.

OLSON, D.L.; NECHOLS, J.R.; SCHURLE, B.W.. Comparative evaluation of population effect and economic potential of biological suppression tactics versus chemical control for squash bug (Heteroptera: Coreidae) management on pumpkins. **J.econ.entomol**, v.89, n.3, p. 631-639, 1996

ORTMAN, E. E.; PETERS, D. C. Introducción In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos.**, México, D. F: Editorial Limusa S. A, 1984,, p. 21-32

PAIVA, M. R. & PEDROSA-MACEDO, J. H. **Feromonas de insetos.** Curitiba: Fundação Universidade Federal do Paraná, 1985, 94 p.

PALHANO, F. L.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; ORLANDO, M. T. D.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.61-66, 2004.

PARK, J. M.; PARK, C; LEE, S.; HAM, B.; SHIN, R.; PAEK, K. Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. **Plant Cell**, v.13, p.1035-1046, 2001.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico.** Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1996, 137p.

PARUSSOLO, T. A.; VIDAL, N. H.; CZEPAK, C.; ATAÍDE, F. F.; TAKATSUKA, F. S. Efeito de extratos aquosos de vegetais sobre o desenvolvimento inicial da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE

ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.537

PASTORI, G. M.; KIDDLE, G.; ANTONIW, J.; BERNARD, S.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; VERRIER, P. J.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. **Plant Cell**, v.15, p.939-951, 2003.

PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S; RYAN, C. A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v.253, p.895-898, 1991.

PENNINCKX, I. A.; THOMMA, B. P.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. P.; BROEKAERT, W. F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensive gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.10, p.2103-2113, 1998.

PEREIRA, A. I. A.; RAMALHO, F. S.; COELHO, R. R.; ZANUNCIO, J. C. Hormetic effects of gamma cyhalothrin on the nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.277.

PETERSEN, M. *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. **Cell**, v. 103, p.1111-1120, 2000.

PIETERSE, C. M.; Van WEES, S. C.; Van PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; Van LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.10, 1571-1580.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of annonaceous brasilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). (Short communication). **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**. 2003, p. 209 (4)

PINHEIRO, S.; AURVALLE, A.; GUAZZELLI, M. J. **Agroecologia Sem Veneno**. Porto Alegre: L & PM Editores Ltda, , 1985, 128 p.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. V. 5, 1974, 687p.

POWELL, G.; HARDIE, J.; PICKETT, J. A. Behavioural evidence for detection of the repellent polygodial by aphid antennal tip sensilla. **Physiological Entomology**, n. 20, p. 141 – 146, 1995.

PRASHARA, A.; HILI, P.; VENESSA, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*, **Phytochemistry**, v.63, n.5, p.569-575, 2003.

PRATES, H. T.; SANTOS, J. P. Produtos naturais ajudam o agricultor. **Cultivar**, Pelotas, RS, n. 18, p. 38-41, 2000.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKETKUMNUEN, U.; NAKA, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v.183, n.1. p.9-15, 2002.

PUSZTAI, A.; EWEN, S.W.B.; GRANT, G.; BROWN,-D.S.; STEWART, J.C.; PEUMANS, W.J.; DAMME, E.J.M.-VAN.; BARDOCZ, S. Antinutritive effects of

wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. **Br. J. Nutr.**,v. 70, n. 1, p. 313-32, 1993

PUSZTAI, A.; KONINKX, J.; HENDRIKS, H.; KOK, W.; HULSCHER, S.; DAMME, E. J. M. VAN.; PEUMANS, W. J.; GRANT, G.; BARDOCZ, S. Effect of the insecticidal *Galanthus nivalis* agglutinin on metabolism and the activities of brush border enzymes in the rat small intestine. **J.nutr. biochem**, v. 7, n.12, p. 677-682, 1996.

QASEM, J. R. & HILL, T. A. On difficulties with allelopathy methodology, **Weed Res.**, 29, p.345, 1989.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; STUBBLEBINE, W. H.; SHEPHERD, G. Variação de terpenos em *Hyptis suaveolens* e seu papel na defesa contra herbívoros. **Bragantia**, v. 54, n.2, p.217-235, 1995.

RAJA, N.; ALBERT, S.; IGNACIMUTHU, S.; DOM, S. Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. **Journal of Stored Products Research**. v.37, n.2., p.127-132, 2001.

RAJAPAKSE, R.; Van EMDEN, H. F. Ecologically safe alternative for the control of stored-product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.33, n.1, p.59-68, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2001, 906 p.

RAZ, V. & FLUHR, R. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. **Plant Cell**, v. 5, p.523-530, 1993.

RENOU, M. & GUERRERO, A. Insect parapheromones im olfaction research and semiochemical-based pest control strategies. **Ann. Rev. Entomol.**, v.45, p.605-630, 2000.

REVISTA GALILEU. A última colheita. **Revista Galileu**. Agosto de 2002. Disponível em: <<http://www.revistagalileu.globo.com/Galileu/0,6993, ECT35671-1706,00.html>> Acesso em: 5 abril 2004.

ROCHA, W. C.; BOGORNI, P. C.; VIEIRA, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Atividade inseticida de limonóides isolados de frutos de *Trichillia pallida* frente a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.586.

RODRIGUEZ, H. C. **Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Piracicaba, 1996, 100p.Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

RODRIGUES , H. C.; VENDRAMIM, J. D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Revista de Agricultura**, v.72, n.3, p305-318, 1997.

RODRIGUES , H. C.; VENDRAMIM, J. D. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistatico de extractos de meliáceas sobre *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Plagas**, v.48, p.11-18, 1998.

RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. & BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and

plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant physiol.**, v.130, p.1079-1089, 2002.

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

ROSA, P. C. F. **Aplicação de agrotóxicos**. Porto Alegre: FARSUL/ SENAR-RS, 1996, 50p.

ROSA, Z. M. Compostas medicinais. **Natureza em revista**. Porto Alegre, v. 2, 1977, p. 32-37.

RUSHTON, P. J.; REINSTADLER, A.; LIPKA, V.; LIPPOK, B.; SOMSSICH, E. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. **Plant Cell**, v.14, 749-762, 2002.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, n.8, 1809-1819, 1996.

SACHS, E. S.; BENEDICT, J. H.; TAYLOR, J. F.; STELLY, D. M.; DAVIS, S. K; ALTMAN, D. W. Pyramiding CryIA (b) insecticidal protein and terpenoids in cotton to resist tobacco budworm (Lepitoptera: Noctuidae). **Environ. Entomol.** V. 25, n. 6, p. 1257 – 1266, 1996.

SALAZAR, E. C. Inseticidas e Acaricidas. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1998, 646p.

SANTOS, O. S.; SCHMIDT, D.; NOGUEIRA FILHO, H.; LONDERO, F. A. **Cultivos sem solo: hidroponia**, SANTOS, O. ed., Santa Maria: CCR / UFSM, 2000, 107 p.

SAUPE, A. C. O chá de macela *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. no controle do pulgão verde *Myzus persicae* em cultivo protegido: uma alternativa aos agrotóxicos. Florianópolis, 2002. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

SAYED, K. A.; DUNBAR, D. C.; BARTYZEL, P.; ZJAWIONY, J. K.; DAY, W.; HAMANN, M. T. Marine natural products as leads to develop new drugs and insecticides. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active natural products: pharmaceuticals**, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p.233-264.

SCHABENBERGER, O; THARP, B. E.; KELLS, J. J. ; PENNER, D. Statistical tests for hormesis and effective dosages in herbicide dose response. **Agron. J.** v.91, p.713-721, 1999.

SCHALLER, A. & OECKING, C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. **Plant Cell**, v.11, p.263-272, 1999.

SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **J. insect Physiol.**, v.34, n.7, p.713-719, 1988.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Ann. Rev. Entomol.**, v.35, p.271-297, 1990.

SCHNEE, C.; KOLLNER, T. G.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The maize gene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-farnesene, (E)-Nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. **Plant Physiol.**, v.130, p.2049-2060, 2002.

SECRETARIA da SAÚDE de SÃO PAULO Ação residual dos organoclorados. **Governo do Estado de São Paulo**. 2001. disponível em:< www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap12cla.pdf>. Acesso em: 22 de agosto de 2001.

SEEFELDT, S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technol.**, v.9, p.218-227, 1995.

SILVEIRA, J. C. L.; ROEL, A. R.; ARRUDA, E. J.; CASADEI, J. M.; BARBOSA NETO, F. O. Avaliação de produtos vegetais no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em cultura de milho sob adubação orgânica e química. . IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.605.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, p.108-109, 1986.

SMITH, C. M.; KHAN, Z. R.; PTHAK, M. D. **Techniques for Evaluating Insect Resistance in Crop Plants**. Boca Ratón, Florida: CRC Pres, Inc, 1994, 320 p.

SEO, S.; SETO, H.; KOSHINO, H. YOSHIDA, S.; OHASHI, Y.; A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. **Plant Cell**, v.15, p.863-873, 2003.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L., coord.,

Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2001.
Cap. 1. p. 25-74.

SODERLUND, D. M. & BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Ann. Rev. Entomol.**, v.34, p.77-96, 1989.

SOUZA, A. P.; FERREIRA, F. A.; DA SILVA, A. A.; CARDOSO, A. A.; RUIZ, H. A. Uso da equação logística no estudo de dose-resposta de glyphosate e imapapyr por meio de bioensaios. **Planta Daninha.** v.18, n.1, 17-28, 2000.

SOUZA, G. M. & SILVA, A. M. A cana-de-açúcar na era genômica. **USP-SUCAST.** 2001. Disponível em:<<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/private/mining-reports/QG/QG-mining.htm>>. Acesso em: 15 de setembro de 2001.

SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia Tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, n.59. v.2, p.173-179, 2000.

STANGARLIN, J. R.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.11, n.4, p. 16-21, 1999.

STOEWSAND, G. S.; ANDERSON, J. L.; BROWN, S. K. Blood cholinesterase in rats fed on insect resistance apple clone containing a natural cholinesterase inhibitor. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, n. 41, p. 121 – 127, 1994.

SUSUKI, H. S.; WIA, Y.; CAMERON, R.; SHADLE, G.; BLOUNT, J.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. **Journal of Experimental Botany**, v33, n.395, p.169-179, 2003.

TABASHNIK, B. E. Seeding the root of insect resistance to transgenic plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, 1997, p. 3488 – 3490. Disponível em: <<http://www.pnas.org>>. Acesso em 12 de agosto de 1999.

TALER, D.; GALPERIN, M.; BENJAMIN, L.; COHEN, Y.; KENIGSBUCH, D. Plant enzymatic resistance (eR) genes encoding for photorespiratory enzymes confer resistance against disease. **Plant Cell**, v.16, p.172-184, 2004.

TANIMOTO, M; ROBERTS, K; DOLAN, L. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*, **Plant J.**,v.8, p.943-948, 1995.

TAIZ, L. & ZEIGER, F. **Plant Physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cumming Publishing. 1998. 565 p.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium, p. 211-212, 1997.

THOMMA, B. P.; EGGERMONT, K.; TIERENS, K. F.; BROEKAERT, W. F. Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance in *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiol.** n.121, p.1092-1102, 1999.

THULER, R. T.; BORLOLI, S. AS.; LOPES, B. S. Toxicidade de inseticidas vegetais e químicos para *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.338.

TIDEI, C. A.; BASTOS, E.; TAVEIRA, E. S. N.; RUEGG, E. G.; PUGA, F. R.; CAJUEIRO, I. V. M.; ROCHA, M. T.; SOUZA, M. C. M.; SANTOS, M. R. M.; UNGARU, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; ALMEIDA, W. F.; YOKOMIZO, Y. Pragas, doenças, tecnologia. **Manual Brasil Agrícola**, V. 9. São Paulo: Ícone, 1986, 424p.

TINGEY, W. M.; SINGH, S. R. Factores ambientales que influyen en la magnitud y expresión de la resistência. In. **Mejoramiento de Plantas Resistentes a Insectos**. México, D.F: Editorial Limusa S. A, 1984, p. 107- 133.

TOMIZAWA, M. & CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Ann. Rev. Entomol.**, v.48, p.339-364, 2003.

TON, J.; DAVISON, S.; Van WEES, S. C.; Van LOON, L.; PIETERSE, C. M. The *Arabidopsis* *isr1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. **Plant Physiol.**, v.125, 652-661, 2001.

TORRES, A. L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no *Plutella wylostella* (L.) (Lepidóptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.151-156, 2001.

TRINDADE, R. C. P.; MARQUES, I. M.; XAVIER, H. S.; OLIVEIRA, J. V. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, v.57, n.3, p.407-413, 2000.

TSUNECHIRO, A.; FERREIRA, C. R. R. P. T. Defensivos: mercado em alta **Cultivar**, Pelotas, RS, n. 22, p. 22-24, 2000

USDA. Relatório, 2001. **Reports** (USDA). Disponível em:< <http://www.usda.gov>>. Acesso em 25 de abril de 2001.

Van WEES, S. C.; SWART, E. A., Van PELT, J. A.; Van LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.97, 8711-8716.

VENDRAMIM, J. D. & BOGORNI, P. C. Efeito de extratos aquosos de *Trichillia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.577.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas In: **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Pallotti , ed., 2000, p. 113-128.

VENDRAMIM, J. D.; SCAMPINI, P. J. Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em dois genótipos de milho. **Revista de Agricultura**, v.72, n.2, p.159-170, 1997.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADOBLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, n.18, p.779-783, 2000.

VIANA, G. S. B.; VALE, T. G.; PINHO, R. S. N.; MATOS, F. J. A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.323-327, 2000 .

VIANA, P. A. & PRATES, H. T. Efeito da aplicação de extratos de nim utilizando diferentes bicos e número de aplicações para o controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, no milho. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10, Resumos, 2004. Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p.559.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In FERREIRA, J. T.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. eds. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. São Carlos: EdUFSCar. 2001, p.23-46.

VINCENT, C.; HALLMAN, G.; PANNETON, B.; FLEURAT-LESSARD, F. Management of agricultural insects with physical control methods. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 48, p.261-281, 2003.

WAGNER, R.; KOGAN, M.; PARADA, A. M. Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays l.*). **Weed Biology and Management**, v.3., n.4, p.228-233, 2003.

WALLER, G. R.; GENG, M.; FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganismis, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT, DAKHINI, K. M. N., FOY, C. L., eds. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, p.17-23

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell** n.14, 2002. S131-S151.

WANG, H.; HAO, L; SHUNG, C.; SUNTER, G.; BISARO, D. M. Adenosine quinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Plant Cell**, v.15, 3020-3032, 2003.

WARE, G. W. An introduction to herbicide. **University of de Minnesota**. 2000. Disponível em:<[http:// ipmworld.umn.edu/ chapters/wareherb.htm](http://ipmworld.umn.edu/chapters/wareherb.htm)>. Acesso em 16 de fevereiro de 2002.

WEDGE, D.; CAMPER, N. D. Connections between agrochemicals and pharmaceuticals. In: CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G., ed., **Biologically active**

natural products: pharmaceuticals, Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000, p. 1-16.

WEIDENHAMER, J. D., HARTNETT, D. C.; ROMEO, J. T. Density-dependent phytotoxicity distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. **J. Hist. Biol.**, 18, 71, 1985.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Medicinai Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.317-349.

WILLIS, R. J. The historical bases of the concept of allelopathy, **J. Hist. Biol.**, v.18, p.71, 1985.

WILPS, H.; KIRKILIONIS, E.; MUSCHENICH, K. The effects of neem oil and azadirachtin on mortality, flight activity, and energy metabolism of *Schistocerca gregaria* Forskal – A comparison between laboratory and field locusts. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.102c, n.1, p.67-71, 1992.

WINTERINGHAM, F. P. W. Mechanisms of selective insecticidal action. **Ann. Rev. Entomol.**, v.14, p.409-442, 1969.

WINZ, R. A. & BALDWIN, I. T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca Sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. **Plant Physiol.**, v.125, p.2189-2202, 2001.

WU, H.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; HAIG, T. Crop cultivars with allelopathic capability. **Weed Research**, v.39, p.171-180, 1999.

XU, D.; XUE, Q.; MAWAL, Y.; HILDER, V. A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests **Molecular Breeding**, n. 2, p. 167-173, 1996.

YAMAMOTO, Y. Mode of action of pyrethroids, nicotinoids, and rotenoids. **Ann. Rev. Entom.**, v. 15, p. 257-272, 1970.

YOSHIOKA, H.; NUMATA, N.; NAKAJIMA, K.; KATOU, S., KAWAKITA, K.; ROWLAND, O.; ROWLAND, O.; JONES, J. D. G.; DOK, N. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. **Plant cell**, v. 15, p.706-718, 2003.

YUNES, R. A.. & CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Mediciniais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.17-46.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. eds. **Planta Mediciniais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos. 2001, p.435-479.

ZAHA, A. Controle da expressão gênica. In. ZAHA, A. coord. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, p. 275-289, 1996.

ZHANG, S. & KLESSIG, D. F. MAPK cascades in plant defense signaling. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 11, p. 520-526, 2001.

ZANETTI, G. D. **Sobre Plantas Mediciniais: Manual Prático**. Santa Maria: Eventos Promoções Culturais. 1999, 60p.

ZHAO, J.; ZHENG, S.; FUJITA, K.; SAKAY, K. Jasmonate and ethylene signaling and their interaction are integral parts of the elicitor signaling pathway leading to β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.399, p.1003-1012, 2004.

ZUBIETA, C.; ROSSA, J. R.; KOSCHESKIA, P.; YANG, Y.; PICHERSKY, E.; NOEL, J. P. Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. **Plant Cell**, v.15, p.1704-1716, 2003.