

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Toxicidade de extratos de timbós (*Derris* spp.) sobre *Tetranychus*
desertorum (Acari: Tetranychidae) em folhas de pimentão.**

RAQUEL DA SILVA CORRÊA

Manaus

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RAQUEL DA SILVA CORRÊA

**Toxicidade de extratos de timbós (*Derris* spp.) sobre *Tetranychus*
desertorum (Acari: Tetranychidae) em folhas de pimentão.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pesquisa e Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração Conservação e uso de recursos genéticos vegetais da Amazônia.

Orientador: Dr. Jamal da Silva Chaar

Co-Orientador: Dr. Neliton Marques da Silva

Manaus

2011

*Ao meu filho Lucas e ao pai dele,
Geraldo Vasconcelos, preciosidades da
minha vida.*

A estes dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir maravilhas em minha vida. Ao meu querido companheiro, Geraldo Vasconcelos, presente precioso de Deus, pela valiosa ajuda, pela força e conhecimentos repassados. Ao meu lindo filho Lucas, meu grande amor, minha fortaleza e inspiração. À minha mãe Maria de Fátima e ao meu pai Cleto Antunis, pelo carinho e principalmente pela educação que me deram. Aos meus irmãos Ana Cristina, Lionela e Cleiton, pelo apoio e compreensão. Ao meu orientador, professor Jamal da Silva Char, pelos conhecimentos trocados e pela compreensão diante das muitas dificuldades vividas durante a execução deste trabalho. Ao meu querido e amigo Co-orientador, professor Neliton Marques da Silva, pelos conhecimentos, amizade, compreensão e pelo dom de saber tranquilizar-nos em momentos tão difíceis. Ao meu grande amigo Jerfferson, por está ao meio lado sempre, mesmo sendo tão ocupado. Às minhas alunas Rainiellen Galvão e Natália, pela ajuda na coletas de dados e por suportarem meus momentos de estresse. A todos os amigos do Laboratório de Entomologia e Acarologia Agrícola (LEA) da UFAM, especialmente a Márcia e ao Clóvis, pela presença constante e por todos os conhecimentos trocados. À doutora Fátima Vieira, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela parceria no projeto. Ao professor Jerferson Rocha, a Dominique Moura e ao Júnior, do Laboratório de Cromatografia-UFAM, pela valiosa ajuda nas Análises Cromatográficas, sem eles seria impossível à realização desta etapa do projeto. Aos membros da banca de avaliação desta tese, pelas correções e contribuição. À UFAM, pela oportunidade e formação. A toda equipe do Programa Multi-Institucional de Pesquisa e Pós-graduação em Biotecnologia da UFAM, pelo grande apoio e acompanhamento desta jornada. Aos meus professores, por todo ensinamento e dedicação. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, pela bolsa concebida. Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta formação.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 Geral..... | 12 |
| 2.2 Específicos | 12 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 13 |
| 3.1 A cultura do pimentão..... | 13 |
| 3.2 Ácaros na cultura do pimentão | 14 |
| 3.4 Os timbós | 20 |
| 3.4.1 Descrição botânica..... | 21 |
| 3.4.2 Princípio ativo e toxicidade dos timbós | 25 |
| 3.4.3 Uso de timbó no controle de ácaros fitófagos | 27 |
| 3.4.4 Timbós em sistema de cultivo | 28 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 Produção das mudas de pimentão..... | 29 |
| 4.2 Coleta e criação de ácaros | 31 |
| 4.3 Coleta de timbó..... | 32 |
| 4.4 Obtenção dos extratos..... | 34 |
| 4.5 Análise de rotenona nos extratos..... | 35 |
| 4.6 Bioensaios com extratos | 38 |
| 4.7- Bioensaio com rotenona | 40 |
| 4.8 Análise de dados..... | 41 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 Teores de rotenona nos extratos | 42 |
| 5.2 Toxicidade dos extratos | 48 |
| 5.2.1 Toxicidade de <i>D. rariflora</i> e <i>D. floribunda</i> | 48 |
| 5.2.2 Toxicidade de extrato aquoso, acetônico e etanólico | 50 |
| 5.2.3 Toxicidade a diferentes concentrações dos extratos..... | 51 |
| 5.3 Concentração Letal Média dos extratos..... | 53 |
| 5.4 Toxicidade da rotenona sobre <i>T. desertorum</i> | 55 |
| 6 CONCLUSÃO | 58 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1- Fêmeas adultas e ovos de <i>Tetranychus desertorum</i> em folha de pimentão..... | 16 |
| Figura 2- Teias de <i>T. desertorum</i> sob folhas de pimentão..... | 16 |
| Figura 3- Detalhes do edeago de <i>T. desertorum</i> | 17 |
| Figura 4- Tíbia e tarso da fêmea <i>T. desertorum</i> . Fonte: Pritchard e Baker (1955). | 17 |
| Figura 5- <i>Derris rariflora</i> | 23 |
| Figura 6- <i>Derris floribunda</i> | 24 |
| Figura 7- Substâncias tóxicas dos timbós..... | 25 |
| Figura 8- Casa de vegetação utilizada para a produção de pimentão..... | 29 |
| Figura 9- Produção de mudas de pimentão em vasos plásticos de 5 litros..... | 30 |
| Figura 10- Tutoramento das mudas de pimentão com varetas de madeira..... | 30 |
| Figura 11- (A) Ácaros montados em lâminas de microscopia em meio Hoyer; (B) 31 Detalhes da fêmea <i>T. desertorum</i> em microscopia; (C) Detalhes do macho e edeago. | |
| Figura 12- Coleta de raízes de timbó com auxílio de enxada..... | 33 |
| Figura 13- Separação de raízes do caule da planta, com auxílio de facão..... | 33 |
| Figura 14- Exsicata de <i>Derris rariflora</i> | 34 |
| Figura 15- Exsicata de <i>Derris floribunda</i> | 34 |
| Figura 16- Timbó em pó armazenado em frasco de vidro rosqueável..... | 35 |
| Figura 17- Procedimento de filtração do extrato aquoso de timbó em papel filtro..... | 35 |
| Figura 18- Concentração do extrato em evaporador rotativo..... | 36 |
| Figura 19. Cromatógrafo DAD – Shimadzu SPD – M10Avp..... | 37 |
| Figura 20- Curva de calibração do padrão da rotenona e equação da reta para 38 quantificação de rotenona nos extratos de timbó. | |
| Figura 21- Discos de folhas de pimentão, imersos no extrato aquoso de timbó. | 39 |
| Figura 22- Discos de folhas de pimentão, sobre papel filtro e espuma de polietileno, 39 umedecidos. | |
| | 40 |
| Figura 23- Unidades experimentais em câmara climatizada tipo “B.O.D”. | |
| Figura 24- Pico cromatográfico do padrão da rotenona. | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 25- Cromatograma do extrato aquoso de <i>D. rariflora</i> | 43 |
| Figura 26- Cromatograma ma do extrato aquoso de <i>D. floribunda</i> | 44 |
| Figura 27- Cromatograma do extrato etanólico de <i>D. floribunda</i> | 45 |
| Figura 28- Cromatograma do extrato acetônico de <i>D. floribunda</i> | 45 |
| Figura 29- Cromatograma do extrato etanólico de <i>D. rariflora</i> | 46 |
| Figura 30- Cromatograma do extrato acetônico de <i>D. rariflora</i> | 46 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Áreas do pico cromatográfico e teores de rotenona dos extratos de timbó..... | 48 |
| Tabela 2- Mortalidade de <i>T. desertorum</i> sob diferentes concentrações do extrato aquoso, etanólico e acetônico de <i>D. rariflora e D. floribunda</i> | 53 |
| Tabela 3 - Concentração Letal Média dos extratos de timbó sobre <i>T. desertorum</i> | 55 |
| Tabela 4- Mortalidade de <i>T. desertorum</i> sob diferentes concentrações de rotenona..... | 56 |

Resumo

O pimentão é uma hortaliça de grande importância socioeconômica no Brasil. Está entre as dez hortaliças mais cultivadas no país. Assim como a maioria das plantas cultivadas, muitos artrópodes pragas estão associados a essa cultura, entre eles algumas espécies de ácaros, como *Tetranychus desertorum*, relatado infestando plantios no município de Manaus. Na maioria das vezes os ácaros são controlados por produtos químicos, que apesar de eficientes podem acarretar problemas tanto a saúde humana quanto ao meio ambiente. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo estudar a toxicidade dos extratos de *Derris rariflora* Benth. e *Derris floribunda* Benth. sobre *T. desertorum* em folha de pimentão, visando à oferta de produtos mais seguros, menos onerosos e de menor impacto ambiental. As plantas foram coletadas em áreas naturais, lavadas, desidratadas e moídas. Em seguida, foram diluídas em água destilada, álcool etílico e acetona, nas concentrações de 0,5, 1, 10, 20 e 30%, resultando no extrato aquoso, etanólico e acetônico, esses extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para os bioensaios, discos de folhas de pimentão foram tratados com os extratos por meio de imersão e em seguida cada disco recebeu 8 ácaros fêmeas. A rotenona comercial (98%) também foi testada sobre os ácaros, nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1%. Foi verificado que a rotenona não está presente nos extratos aquosos das espécies estudadas. Nos extratos acetônico e etanólico foi verificado um teor de rotenona de 4,5 e 4% para *D. floribunda* e 4,3 e 5% para *D. rariflora*, não diferindo entre si. A espécie *D. rariflora* foi mais tóxica para o ácaro quando comparada a *D. floribunda*. Entre os extratos, o etanólico foi o mais tóxico seguido do aquoso e acetônico. As concentrações de 20 e 30% causaram maior percentual de mortalidade. A menor CL₅₀ foi observada para o extrato etanólico de *D. rariflora*. A rotenona comercial não foi tóxica para *T. desertorum*. Contudo, com exceção ao extrato aquoso e acetônico de *D. floribunda*, que não atingiram 50% de mortalidade, os demais foram promissores para o controle de *T. desertorum* em folhas de pimentão.

Abstract

The pepper is a vegetable of great importance socioeconomic in Brazil. Is among the ten most vegetables grown in country. Like most crops, many arthropods pests are associated with that culture, including some species of mites such as *Tetranychus desertorum*, reported infesting crops in Manaus. In most cases the mites are controlled by chemicals, which although effective can lead to problems both human health and the environment. In that sense, this work aimed to study the toxicity of extracts of *Derris rariflora* Benth. and *Derris floribunda* Benth. on *T. desertorum* leaf Pepper, aiming to offer products safer, cheaper and with less environmental impact. Plants were collected in natural areas, washed, dried and ground. Were then diluted in water distilled ethanol and acetone at concentrations of 0.5, 1, 10, 20 and 30%, resulting in aqueous extract, ethanol and acetone, these extracts were analyzed by High Performance Liquid Chromatography Efficiency. For bioassays, discs of pepper leaves were treated with extracts by dipping each disk and then received eight female mites. The commercial rotenone (98%) was also tested on the mites in concentrations of 0.1, 0.5 and 1%. It was found that rotenone is not present in aqueous extracts of the species. The extracts acetone and ethanol was found a rotenone content of 4.5 and 4% for *D. floribunda* and 4,3 e 5% for *D. rariflora*, not among them. The species *D. rariflora* was more toxic to the mite when compared to *D. floribunda*. Among the extracts, the ethanol was the most toxic followed by and aqueous acetone. The concentrations of 20 and 30% caused more mortality rates. The lowest LC50 was observed for the extract ethanolic *D. rariflora*. Rotenone commercial was not toxic to *T. desertorum*. However, except the aqueous extract of acetone and *D. floribunda*, which failed to achieve 50% mortality, the others were promising for control of *T. desertorum* on pepper leaves.

1 INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma hortaliça de grande importância socioeconômica no Brasil. Está entre as dez hortaliças mais cultivadas no país (Halfeld-Vieira *et al.*, 2005). Assim como a maioria das plantas cultivadas, muitos artrópodes pragas estão associados a essa cultura (Barbosa *et al.*, 2008). Entre eles algumas espécies de ácaros (Souza, 2003), como *Tetranychus desertorum* Banks (Acari: Tetranychidae), que tem sido registrado infestando plantios na região de Manaus (Vasconcelos *et al.*, 2009), ocasionando perdas de produção. De modo geral, as folhas infestadas por ácaros tetraniquídeos apresentam manchas esbranquiçadas na face inferior e cloróticas na face superior. Quando intensamente infestadas estas podem secar e cair precocemente, levando a planta à morte (Flechtmann, 1977).

Esta praga é controlada, basicamente, com aplicação de acaricidas, que é o método de controle de populações de ácaros mais utilizado no mundo (Pallini *et al.*, 2007; Morais e Flechtmann, 2008). Apesar de eficientes, os agrotóxicos podem apresentar uma série de problemas, como contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, intoxicação de agricultores e consumidores, desequilíbrios biológicos devido à eliminação de inimigos naturais, e seleção de populações de pragas resistentes (Carvalho *et al.*, 2008).

Devido a tais problemas, a procura por formas alternativas de controle, como espécies vegetais com atividade acaricida tem aumentado nos últimos anos (Pontes *et al.*, 2007). Assim, o controle alternativo de ácaros com extratos de plantas vem sendo estudado, com alguns resultados promissores (Brito *et al.*, 2006). No entanto, ainda são poucas as informações encontradas na literatura sobre o uso de plantas tóxicas no controle de ácaros (Vieira *et al.*, 2006).

O uso de extratos de plantas apresenta diversas vantagens quando comparadas aos acaricidas sintéticos, pois normalmente têm persistência reduzida, o que evita acúmulo de

resíduo tóxico no meio ambiente, pode ser seletivo a inimigos naturais, são biodegradáveis e não apresentam os efeitos colaterais típicos dos acaricidas convencionais (Pontes *et al.*, 2007).

Algumas espécies de plantas têm ação acaricida comprovada (Brito *et al.*, 2006), como é o caso dos timbós (*Derris* spp.) (Pereira *et al.*, 2004), que tem como princípios tóxicos a rotenona, elliptona, sumatrol, malacol, toxicarol e deglelina (Corbett, 1940, Krieger, 2010, Mariconi, 1981 e Teixeira, 2003), porém a maioria dos trabalhos considera a rotenona mais tóxica em relação às demais. (Caminha Filho, 1940, Lôbo *et al.*, 2009). Essa substância é metabolizada pela via secundária das plantas, acumulando-se em pequenas proporções nos tecidos vegetais (Villalobos, 1996). A rotenona possui atividade inseticida e piscicida (Dzenda *et al.*, 2008), apresentando baixa toxicidade aguda a seres humanos (Robertson e Smith, 2008).

Em função da escassez de informações abrangendo estudos sobre uso de plantas acaricidas, fez-se necessário a realização do presente trabalho, visando comprovar a efetividade de extratos de timbós sobre *T. desertorum* e verificar se a toxicidade desses extratos é causada pela rotenona, cuja toxicidade principal é referenciada pela literatura. Além do mais não existe no mercado produtos alternativos para o controle deste ácaro, o que torna essas ações de pesquisa de suma importância, visando à oferta de produtos mais seguros, menos onerosos e de menor impacto ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a toxicidade dos extratos de *Derris rariflora* Benth. e *Derris floribunda* Benth. sobre *T. desertorum* em folha de pimentão .

2.2 Específicos

- Quantificar o teor de rotenona nos extratos aquoso, etanólico e acetônico de timbós;
- Comparar a eficiência de diferentes solventes na extração de rotenona em raízes de timbó.
- Comparar a toxicidade das plantas, dos extratos e das concentrações sobre a mortalidade de *T. desertorum*;
- Determinar o Tempo Letal Médio (TL₅₀) do extrato mais eficiente e respectiva concentração sobre *T. desertorum*.
- Determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) dos extratos sobre *T. desertorum*;
- Comprovar se a rotenona presente nos extratos está causando a mortalidade dos ácaros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cultura do pimentão

A espécie *C. annuum* é uma solanácea perene, de origem americana, ocorrendo formas silvestres desde o Sul dos Estados Unidos até o norte do Chile. Antes da colonização espanhola, o pimentão já era cultivado pelos indígenas (Filgueira, 2000). É uma cultura de clima tropical, que se desenvolve adequadamente em locais com temperatura média entre 20 a 30 °C. A época de plantio depende do clima da região. Em regiões baixas, com altitude menor que 400 m, e de inverno ameno, pode ser semeado o ano todo (Souza, 2003). A planta é arbustiva, atingindo 50-80 cm de altura. É cultivada como planta anual, porém, na ausência de patógenos pode permanecer como planta semi-perene.

O cultivo de pimentão é uma atividade significativa para o setor agrícola brasileiro, ocupando anualmente, cerca de 13.000 ha de área cultivada, com produção de aproximadamente 280.000 toneladas de frutos (Reifschneider, 2000), sendo uma das dez hortaliças mais cultivadas (Souza e Nannetti, 1998). Entre as solanáceas é a terceira mais cultivada, ficando abaixo apenas do tomate e da batata (Carmo, 2004). Segundo Reis e Madeira (2009), o estado do Amazonas produziu 3.651 toneladas de pimentão no ano de 2005, com uma área plantada de 199 ha, totalizando 1.207 produtores. Esta cultura também possui grande importância econômica no exterior, principalmente nos Estados Unidos, México, Itália, Japão e Índia (Fonseca, 1986). Os frutos podem ser consumidos na forma imatura (verdes) ou madura (vermelhos ou amarelos) (Souza e Nannetti, 1998).

A cultura do pimentão não se desenvolve em solos compactados, mal drenados, rasos ou salinos. Os solos indicados para o cultivo devem ser profundos, leves e bem drenados (Reifschneider, 2000). Esta espécie prefere solos areno-argilosos, com o pH variando de 5,5 a 6,8 (Filgueira, 2000).

O pimentão é geralmente cultivado em campo aberto, mas adapta-se bem ao cultivo protegido (Henz *et al.*, 2007). Neste tipo de ambiente, os produtores podem utilizar telas, visando maior proteção da cultura, principalmente de insetos pragas (Cardoso, 2007). Segundo Alessandro (2001), o cultivo protegido possui algumas vantagens, como maior segurança na produção, colheitas programadas e principalmente a qualidade dos frutos devido à proteção destes contra queimaduras do sol e chuvas fortes.

O hábito de consumir hortaliças vem crescendo no município de Manaus, que concentra quase a metade da população do estado do Amazonas (Rodrigues *et al.* 2007), isso devido ao aumento na oferta destes produtos pela incorporação da tecnologia de cultivo protegido que proporcionou um significativo aumento na área cultivada em casa de vegetação, principalmente pimentão. Em parte, este aumento do número de produtores e da produtividade é devido ao projeto de cultivo protegido de pimentão no Município de Iranduba, implantado pela EMBRAPA e governo do Amazonas (Gama *et al.*, 2008).

3.2 Ácaros na cultura do pimentão

Entre os ácaros, algumas espécies são pragas chave na cultura do pimentão, destacando-se: o ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari, Tarsonemidae) e o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (Acari, Tetranychidae), sobretudo em casa de vegetação (Zhang, 2003). Segundo Echer *et al.* (2002), o ácaro branco se destaca devido a sua freqüente e severa ocorrência em diversas áreas produtoras. Este ácaro causa grave danos à planta (De Coss-Romero e Peña, 1998), alimentam-se da superfície abaxial das folhas apicais atacando as células mais superficiais da epiderme (Gui *et al.*, 2001). As folhas apicais jovens são severamente danificadas, ficando torcidas, mais rígidas e com margem ondulada (Bassett, 1981). Os frutos atacados podem apresentar rachaduras e às vezes reticulações (Gerson, 1992). Em geral inibem o crescimento da planta (Peña e Bullock, 1994), podendo levá-la a

morte. Mesmo após a eliminação dos ácaros, as folhas jovens continuam, por alguns dias, apresentando os danos mencionados, sugerindo que estes possam ser proporcionados por toxinas injetadas pelo ácaro ao alimentar-se (Zhang, 2003).

Na região de Manaus além de *P. latus*, o ácaro vermelho, *T. desertorum* (Figura 1) tem sido relatada ocasionando problemas na cultura do pimentão (Vasconcelos *et al.*, 2009). Esta espécie foi descrita em 1900 nos Estados Unidos e foi relatada em mais de 180 hospedeiros nas Américas, Ásia e Oceania (Bolland *et al.*, 1998). Este ácaro pertence a família Tetranychidae e seu desenvolvimento passa pelos estágios de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adultos. As fêmeas tecem teias, recobrando parcialmente a superfície das folhas (Figura 2) (Flechtmann, 1977). Nos fios dessas teias, são depositados os ovos, pequenos, esféricos e brancos- amarelados (Figura 1) (Flechtmann, 1967). As larvas, ninfas e machos possuem coloração verde-amarelado, já as fêmeas são vermelho intenso (Flechtmann, 1977).

O desenvolvimento de *T. desertorum* é influenciado pela temperatura e umidade (Vacante, 2010). O tempo de desenvolvimento de ovo a adulto é relativamente curto, de 5,8 a 11,2 dias. A duração média na fase de ovo é de 3,3 dias, sendo 2 dias no verão e 4 a 5 dias no inverno. Cada estágio de desenvolvimento leva em torno de 1 a 1,5 dias no verão e 1,3 a 3 dias no inverno, para completar-se (Jeppson e Baker, 1975).



Figura 1- Fêmeas adultas e ovos de *Tetranychus desertorum* em folha de pimentão. Foto: Raquel Corrêa.



Figura 2- Teias de *T. desertorum* sob folhas de pimentão. Foto: Raquel Corrêa.

Para identificação, os ácaros são montados em lâminas para microscopia em meio de Hoyer (Krantz, 1975) e examinados ao microscópio óptico com contraste de fase. A espécie *T. desertorum* é caracterizada pelo edeago do macho, o qual apresenta na extremidade distal (“cabeça”) angulação posterior curvada ventralmente (Jeppson e Baker, 1975) (Figura 3). As fêmeas são maiores do que os machos e caracterizam-se por apresentarem a seta dúplice proximal do tarso I em alinhamento com as quatro setas táteis proximais (Flechtmann e Bastos, 1972) (Figura 4).

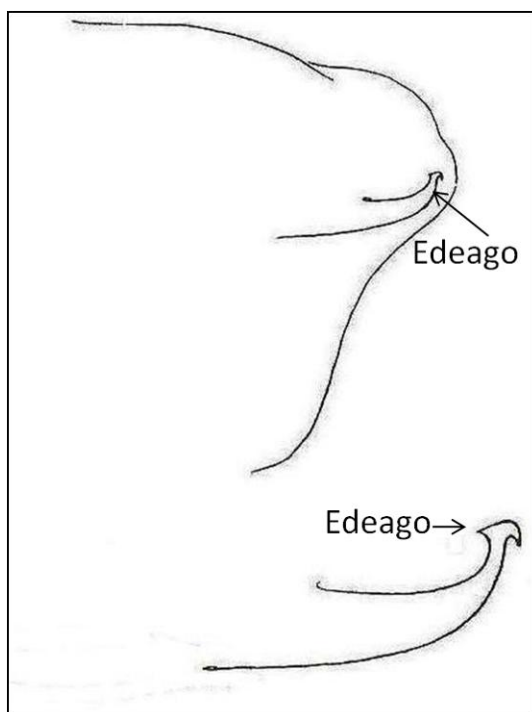


Figura 3- Detalhes do edeago de *T. desertorum*. Fonte: Pritchard e Baker (1955).

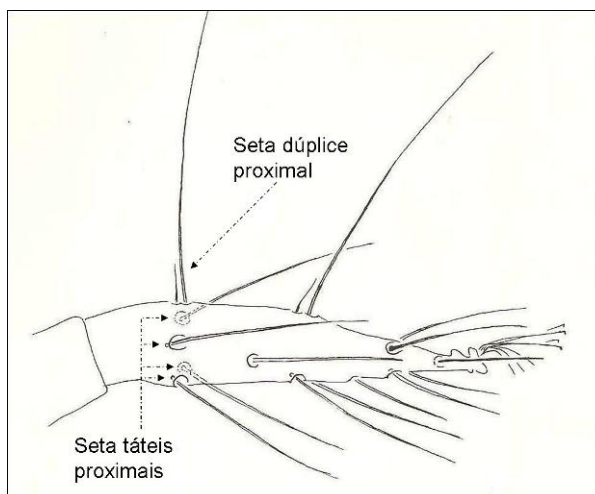


Figura 4- Tíbia e tarso da fêmea *T. desertorum*. Fonte: Pritchard e Baker (1955).

Quando infestadas por *T. desertorum*, as folhas de pimentão apresentam na face inferior manchas esbranquiçadas e na superior perda de brilho, clorose e pequenas manchas marrons. Dependendo do nível de infestação pode ocorrer a queda das folhas, ocasionando o

depauperamento das plantas. Os sintomas são ocasionados pela destruição das células vegetais (Bastos, 1981).

A espécie *T. desertorum* também é comumente encontrada infestando outras culturas de importância econômica, como por exemplo *Phaseolus vulgaris* L. (Rivero e Vásques, 2009), *Vitis vinifera* L. (Juarez e Botton, 2008), *Glycine max* L. (Guedes *et al*, 2007, Roggia *et al.*, 2008), *Fragaria vesca* L. (Damasceno, 2008), *Ipomea batatas* L. (Mineiro *et al*, 2007), *Passiflora edulis* Sims (Noronha, 2006), *Ficus carica* L. (Morais e (Flechtmann, 2008), *Lycopersicon esculentum* Mill (Luz *et al*, 2002), entre outras.

De forma geral, os ácaros praga são controlados mediante aplicação de acaricidas organossintéticos, não raro com aplicações preventivas ou excessivas. Porém, existem alternativas de controle de ácaros com destaque para: resistência de plantas, uso de produtos naturais, controle biológico, controle cultural e controle mecânico (Moraes e Flechtmann, 2008).

3.3. Uso de extratos de plantas para o controle de ácaros

De acordo com Brito *et al.* (2006), diversos compostos de origem vegetal têm ação acaricida devido a metabólitos secundários produzidos pela planta, como alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos. Estes compostos funcionam como defesa química das plantas, atuando quantitativamente, como redutoras da digestibilidade, ou qualitativamente, como toxinas para os artrópodes.

Os extratos vegetais constituem uma promissora alternativa de controle de ácaros fitófagos e atualmente tem sido alvo de estudos em centros de pesquisas (Gonçalves *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2006). Apesar de algumas espécies de plantas já possuírem ação acaricida comprovada (Brito *et al.*, 2006), no Brasil não há formulações comerciais de produtos de

origem vegetal disponíveis para combater esses ácaros (Gonçalves *et al.*, 2001), havendo poucas informações abrangendo tais estudos (Vieira *et al.*, 2006).

Segundo Ponteza *et al.* (2005), vários produtos de origem vegetal já foram avaliados para o controle de ácaros fitófagos, destacando-se *Azadirachta indica* A. Juss., *Datura stramonium* L., *Lupinus termis* Albus, *Lavandula angustifolia* Miller, *Lavandula latifolia* Vill, *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Salvia fruticosa* Mill, *Ocimum basilicum* L., *Abrus precatorius* L., *Ruta graveolens* L., *Dieffenbachia brasiliensis* Veitch, *Stryphnodendron barbatiman* Martius e *Solanum melogena* L, todos demonstraram resultados promissores.

Entre os trabalhos com extratos de plantas sobre ácaros fitófagos destacam-se: Gonçalves *et al* (2001) testaram o extrato aquosos de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) e cravo da índia (*Syzigium aromaticum* L.) sobre o ácaro verde da mandioca (*Mononychellus tanajoa* Bondar) e perceberam que estes causaram toxicidade para adultos, mas não afetaram a duração do período de incubação dos ovos. Mourão *et al.* (2004) avaliou a toxicidade aguda e crônica de extratos de óleo da torta de *A. indica* sobre fêmeas de *Oligonychus ilicis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) e verificaram que a taxa de populacional desses ácaros diminui à medida que as concentrações (0,075mg/ml a 144mg/ml) aumentaram, atingindo a mortalidade de 100%. Pontenza *et* (2006) verificaram que os extratos aquoso de *Dieffenbachia brasiliensis* Bull., *Ruta graveolens* L. e *Allium cepa* L., se mostraram eficientes no controle de *Tetranychus urticae* Koch, em casa de vegetação. Carvalho *et al.* (2008), verificaram que os extratos aquosos de *Annona squamosa* L., *Calendula officinalis* L., *Coffea arabica* L., *Ricinus communis* L., *Ginkgo biloba* L. e *Nepeta cataria* L. apresentaram percentuais significativos de mortalidade de *Oligonychus ilicis* McGregor (Acari: Tetranychidae).

A utilização de acaricidas à base de extratos de plantas tem se mostrado mais vantajosa em relação ao uso indiscriminado de agrotóxicos, nos aspectos de segurança ao aplicador, sendo menos persistente e acumulativo no ambiente e nos alimentos e mais seletivos a inimigos naturais (Lucini *et al.*, 20010, Vieira *et al.*, 2006; Potenza *et al.*, 2006).

3.4 Os timbós

O timbó é um grupo de planta da família Fabaceae, amplamente encontrada na região Amazônica, tanto em floresta primária como em áreas já desmatadas, os gêneros mais conhecidos é *Derris*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia* (Tozzi, 1998; Alécio, 2007). A palavra timbó tem origem Tupi, Ti = sumo, suco e mbo = cobra, significando, sumo de cobra, suco venenoso ou suco que mata (Costa, 1996). Durante as pescarias, os índios empregavam a raiz fresca desta planta, batendo-a e agitando-a na água, produzindo um líquido leitoso, com cheiro muito forte e peculiar. Sob a ação deste sumo, os peixes perdem o equilíbrio, subindo atordoados à superfície, onde nadam descontrolados, sendo capturados facilmente (Lima, 1987). Além da América do Sul, há registros da utilização desta prática por tribos indígenas da Ásia e África (Homma, 2007).

Caminha Filho (1940) cita as variedades de timbó mais conhecidas no Norte brasileiro, entre elas, *Lonchocarpus nicou* Benth (timbó macaquinho), *Lonchocarpus urucu* Killip (timbó vermelho), *Lonchocarpus floribundus* Benth (timbó venenoso), *Derris guianensis* Benth (timbó da mata), *Derris negrensis* Benth (timborana de Gurupá), *Tephrosia brevipes* Benth (timbó do campo) e *Tephrosia nitens* Benth (timbó ajaré). Outra espécie de timbó, *Ateleia glazioveana* Baillon, é citada por Anese *et al.* (2007), encontrada nas regiões noroeste do Rio Grande do Sul e Oeste de Santa Catarina.

O extrativismo da raiz de timbó teve importância econômica até a descoberta da atividade inseticida do DDT em 1939. O seu declínio também está relacionado com a redução dos estoques naturais que eram mais acessíveis nos Estados do Pará e Amazonas (Homma, 2007). Com a recente ascensão da agricultura orgânica e pressão socioambiental para redução do uso de agrotóxicos, o interesse por essa planta tem despertado a realização de pesquisas em centros de pesquisa e pós-graduação, resultando em dissertações e teses. Como por exemplo, os trabalhos de Costa (1996), que verificou o efeito da variabilidade de timbós de diferentes regiões da Amazônia sobre *Musca domestica* L. (Díptera: Muscidae), Correa (2006) que estudou a ação de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth sobre *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Sternorrhyncha: Aphididae) e Alécio (2007) que pesquisou o efeito de *Derris amazonica* Killip em população de *Cerotoma arcuatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). Porém, a descontinuidade destas pesquisas constitui um grande gargalo para os programas de aproveitamento da biodiversidade na Amazônia (Homma, 2007).

3.4.1 Gênero *Derris*

As plantas do gênero *Derris* pertencem a família Leguminosae ou Fabaceae, subfamília Papilionoideae (Firmino, 1998) e tribo Dalbergieae (McIndoo, 1919; Atchison, 1949 *apud* Saito e Lucchini, 1998).

Plantas deste gênero são encontradas na Malásia, na Índia e nas Filipinas. Foi citado pela primeira vez na literatura em 1747, pelos chineses, onde descreviam que as raízes de *Derris* spp. eram esmagadas em água, resultando em uma emulsão leitosa para pulverização de hortaliças. A observação dessas hortaliças chamou atenção de estudiosos que passaram a pesquisar as propriedades tóxicas dessas plantas (McIndoo, 1919 *apud* Saito e Lucchini, 1998).

As espécies que mais se destacam quanto à toxicidade são: *D. elliptica*, *D. urucu*, *D. nicou*, *D. sericea*, *D. amazonica*, *D. raiflora* e *D. floribunda* (Rocha e Zoghbi, 1982). As duas últimas espécies são endêmicas do Brasil, com pré dominância na Amazônia, principalmente no Estado do Amazonas (Tozzi, 2010).

A espécie *D. rariflora* Benth possui ramos escandecentes ou prostados, lenhosos, castanho avermelhados, cilíndricos, finamente estriados, esparso e obscuramente lenticelados, puberulentos a glabros, quando novos são flexíveis, angulosos, estriados, pubescentes, com estípulas lenhosas, deltóides. Folhas com 3 ou 5 folíolos, com estípelas rudimentares, pecíolos e raquis com estrias bem marcantes. A inflorescência é pseudo- racemosa e terminal, esparso fasciculada nos dois terços superiores e nua no terço inferior basal, mais longa que as folhas, com uma bráctea oval mínima na base (Tozzi, 1989) (Figura 5). Já a *Derris floribunda* Benth possui arbusto escandente, pequeno, rasteiro em lugares abertos e secos, na floresta atinge grandes dimensões, subindo em árvores altas. As flores são róseo- violáceas (Silva *et al.*, 1977). Folhas com 7 ou 9 folíolo (raramente 5 ou 11), estípulas ausentes, pecíolo estriado no geral com um sulco ventral, raquis semelhante ao pecíolo, sub- angular. Inflorescência ereta, pseudo- racemosa, auxiliar, multiflora e bractéolas (Tozzi, 1989) (Figura 6).

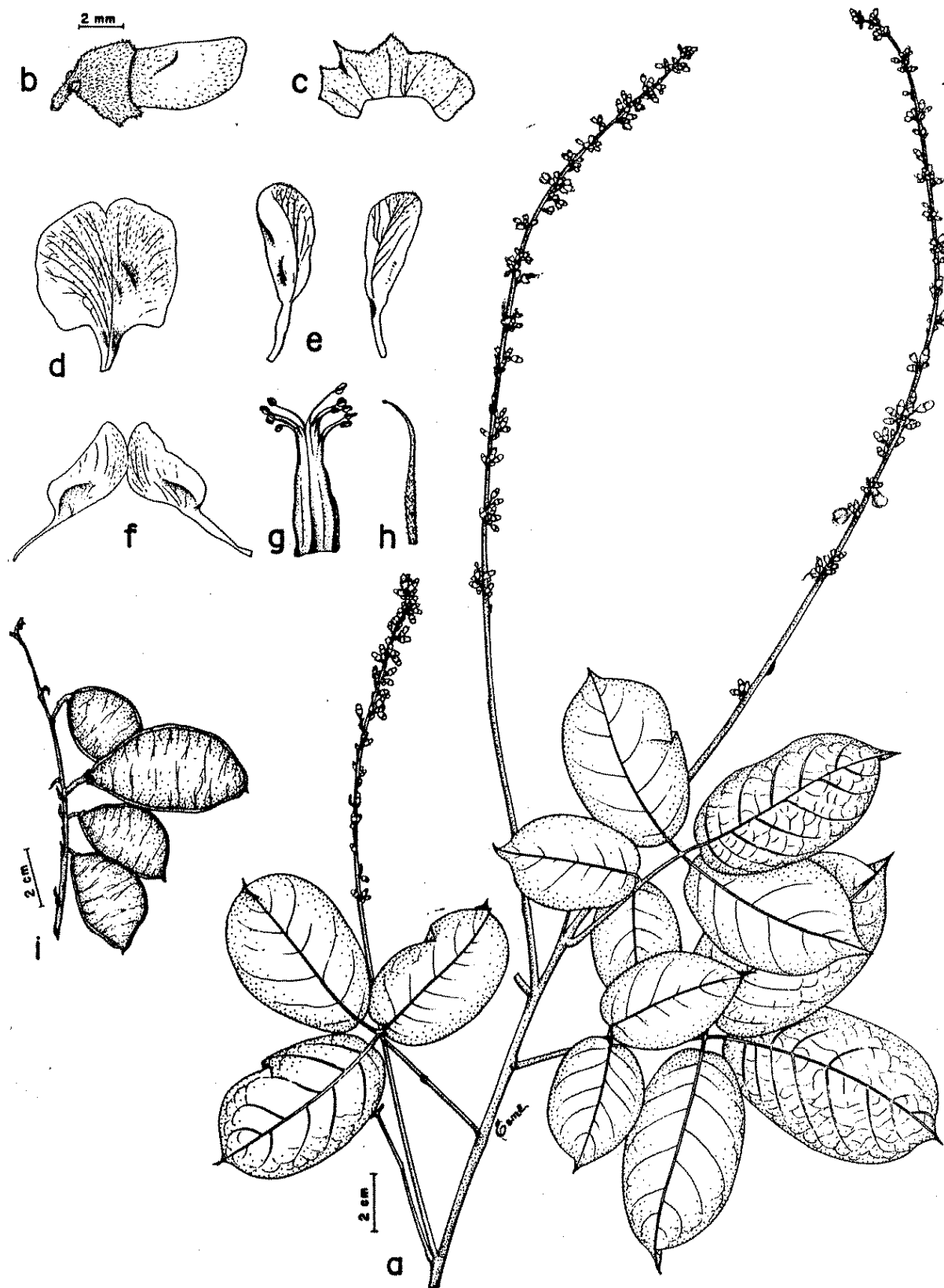


Figura 5- *Derris rariflora*. a- Ramo com inflorescência; b- flor; c- cálice; d- estandarte; e- asas; f- quilha; g- androceu; h- gineceu. Fonte: Tozzi (1989).

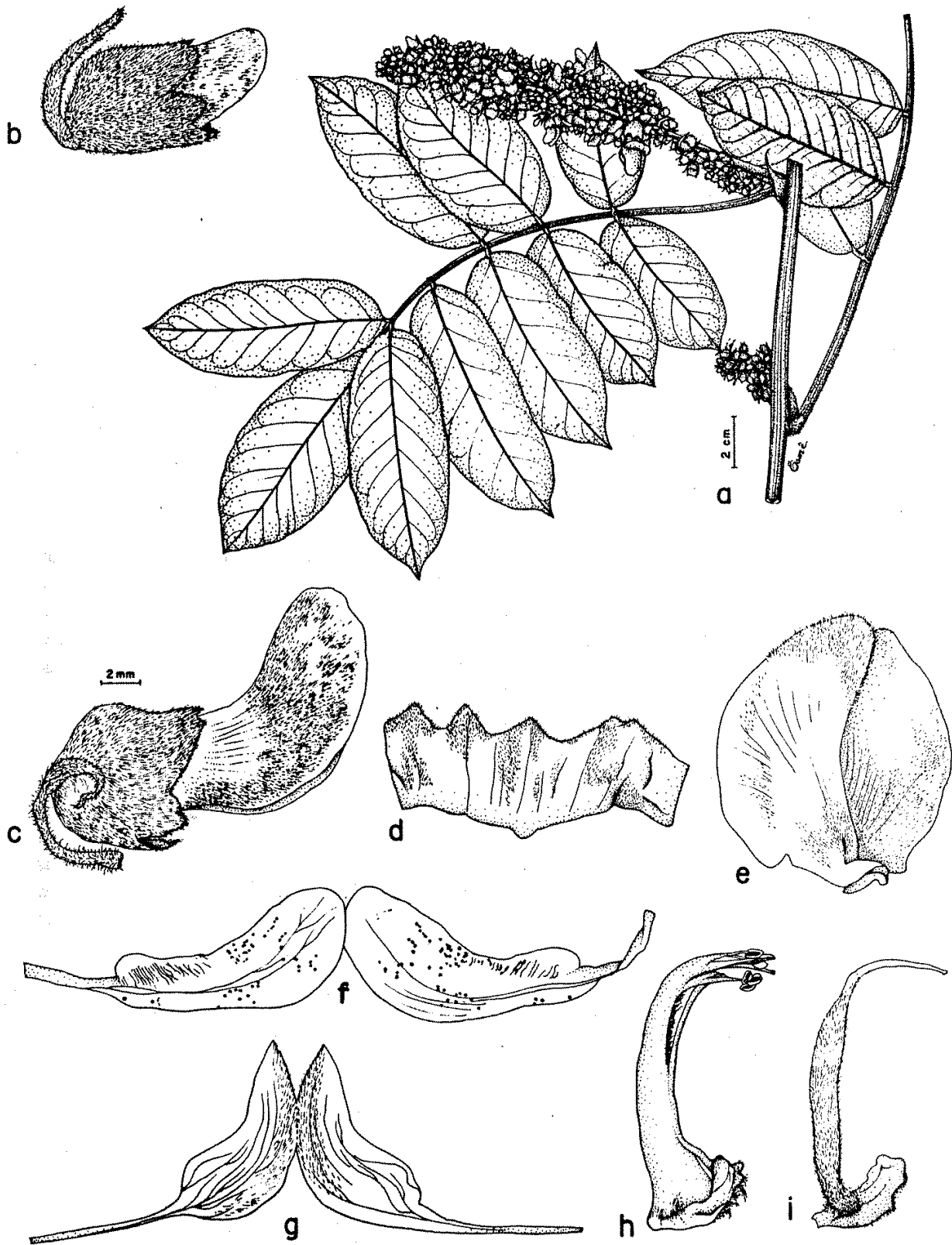


Figura 6- *Derris floribunda*. a- Ramo com inflorescência; b- botão floral; c- flor; d- cálice; e- estandarte; f- asas; g- quilha; h- androceu; i- ginecei. Fonte: Tozzi (1989).

3.4.2 Princípio ativo e toxicidade dos timbós

Em toda Amazônia, os timbós são conhecidos como plantas portadoras de substâncias de violenta ação tóxica para animais de sangue frio (Pinto, 1953). Nas espécies de timbó, encontram-se seis substâncias tóxicas, são os seguintes rotenóides: rotenona, elliptona, sumatrol, malacol, toxicarol e deguelina (Corbett, 1940, Krieger, 2010, Mariconi, 1981 e Teixeira, 2003) (Figura 7). De acordo com com Mariconi (1981), as cinco últimas substâncias têm composição semelhante à rotenona, no entanto, são 5 a 10 vezes menos tóxica para insetos.

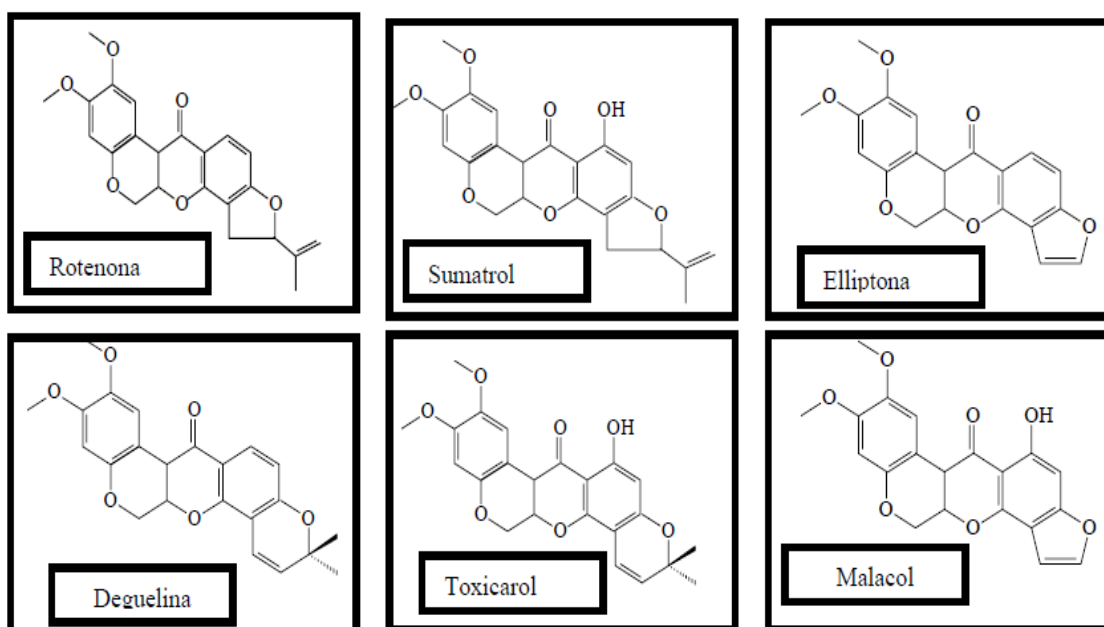


Figura 7- Substâncias tóxicas dos timbós. Fonte: Teixeira (2003)

A rotenona ($C_{23}H_{22}O_6$) é um isoflavonóide cristalino, inodoro e insípido, biossintetizado pela via do metabolismo secundário da planta (Mascaro et al., 1998). É uma molécula de média polaridade (Zubairi *et al.*, 2004), foi utilizada como inseticida, pela primeira vez, em 1848 (Mariconi, 1981). A sua distribuição varia nas diversas partes da planta, sendo mais concentrada nas raízes. A idade da planta também influencia no teor de

rotenona, decrescendo com a idade do vegetal (Homma, 2007). A rotenona é extremamente solúvel no clorofórmio, éter, acetona, tetracloreto de carbono e ainda nos derivados clorados do etileno, é pouco solúvel em água (Costa, 1996).

Quando pura, a rotenona decompõe-se com relativa facilidade na presença de luz e ar. A persistência em águas naturais varia de acordo com a estação do ano. Em temperatura de 20°C geralmente persiste por menos de um dia (Corbett, 1940). As formulações líquidas são mais estáveis quando armazenadas em recipientes lacrados e escuros (Ling, 2002).

A rotenona é considerada um inseticida de contato e ingestão, penetra pelo canal alimentar, traquéias e tegumento (Mariconi, 1981). Essa substância mata por meio do bloqueio da respiração celular. Funciona como inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, atuando entre o NAD⁺ (uma enzima envolvida nos processos metabólicos de oxi-redução) e a co-enzima Q (co-enzima responsável pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória), com a consequente falha das funções respiratórias (Santos, 2002). Os efeitos são similares àqueles produzidos por outros inseticidas que afetam o transporte do elétron ou a fosforilação oxidativa, incluindo o antimicina, cianido e dinitrofenol (Ling, 2002).

Acredita-se que a rotenona seja moderadamente tóxica para seres humanos, com uma dose letal estimada entre 300 e 500 mg/kg. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), doses diárias de rotenona abaixo de 0,4mg/Kg, durante todo período de vida, não acarretariam efeitos prejudiciais a seres humanos, quando ministrada por via oral (Ott, 2006). Apesar disso, estudos baseados no modelo de toxicidade crônica sugerem que doses baixas de rotenona ministradas em longo prazo podem induzir sintomas semelhantes aos verificados na Doença de Parkinson (Casacchia *et al.*, 2009). Porém, esses efeitos só foram observados quando a substância foi ministrada por via intravenosa ou subcutânea

(Bartarbet *et al.*, 2000). Hien *et al.* (2003) objetivando verificar sintomas de toxicidade crônica, não registraram mudança patológica em ratos alimentados com dieta contendo doses de 2,5mg/kg de rotenona durante 2 anos. Segundo Narongchai *et al.* (2005), a rotenona é metabolizada pelo fígado de mamíferos e a maior parte é eliminada pelas fezes. No entanto, irrita o trato gastrointestinal, brônquios, conjuntivas e pele, causando vômitos, tosse, dispnéia, dermatites, convulsões e deficiências respiratórias.

3.4.3 Uso de timbó no controle de ácaros fitófagos

São poucos os trabalhos encontrados na literatura abrangendo o uso de timbó sobre ácaros de importância agrícola a maioria dos estudos é voltada para ácaros de importância veterinária (Pereira *et al.*, 2004). Entre os trabalhos com ácaros de importância agrícola está o de Castagnoli *et al.* (2005) que estudando ácaros fitófago, predador e generalista, *Tetranychus urticae* Koch, *Neoseiulus californicus* McGregor e *Tydeus californicus* Banks, respectivamente, verificaram que um produto comercial a base de *Derris* spp. (Rotena[®]) foi mais tóxica para ovos do que para fêmeas de *T. urticae* e altamente tóxica para as fêmeas de *N. californicus* e *T. californicus*. Em outro trabalho, Wongthong e Pimsamam (2007) avaliaram a toxicidade do extrato aquoso de *Derris elliptica* Benth sobre *Tetranychus truncatus* Ehara e encontraram uma Concentração Letal Média (CL₅₀) de 3,69%. Roobakkumar *et al.* observaram (2010) um percentual de até 100% de mortalidade de *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Acari: Tetranychidae), utilizando o Derrimax[®], um produto comercial a base de *Derris* spp. Os autores citados atribuíram à toxicidade dos extratos e produtos a base de *Derris* à rotenona, princípio ativo já discutido anteriormente.

3.4.4 Timbós em sistema de cultivo

Os timbós são propagados de forma vegetativa, no início do período chuvoso (Lima, 1987). O plantio é realizado por meio de estacas de 30 cm de comprimento, provenientes de haste com um mínimo de 3 nós. O espaçamento recomendado é de 70 cm entre plantas e um metro entre linhas, obtendo-se uma densidade média de 14 mil plantas por hectare (Homma, 2007). As plantas rebrotam em torno de uma semana após o plantio e o rendimento pode atingir 1 t/ha (Lima, 1987). Segundo Tozzi (1998) as plantas florescem somente em floresta densa, isso pode ser confirmado pela ausência de material reprodutivo na maioria dos herbários de instituições de pesquisa.

O arranquio das raízes do timbó exige grande força física, os arbustos são cortados a 50 cm do solo e as raízes são arrancadas individualmente com as mãos. Em Porto Rico, a coleta manual das raízes é realizada após a passagem de um trator de roda acoplado a um arado (Homma, 2007).

Os timbós quando cultivados formam uma manta vegetal de boa espessura sobre o solo, proporcionando proteção e evitando a incidência direta do sol e da chuva. As radículas são ricas em nós, resultantes da associação simbiótica com a bactéria *Rhizobium* spp. (Lima, 1987).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção das mudas de pimentão

Para obtenção de folhas de pimentão utilizadas para alimentar os ácaros da criação estoque em laboratório e para os bioensaios com os extratos de timbós, foram produzidas mudas de pimentão em casa de vegetação, localizada na área experimental da Faculdade de Ciências Agrárias, no setor sul do campus da Universidade Federal do Amazonas (Figura 8).



Figura 8- Casa de vegetação utilizada para a produção de pimentão. Foto: Raquel Corrêa.

Foram utilizadas sementes de pimentão cultivar IKEDA[®] Cascudo, semeadas em copos plásticos de 250 mL, contendo substrato Plant Max Hortaliças HA[®], em casa de vegetação, à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$). Após atingirem 10 cm de altura, as mudas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 13dm^3 (Figura 9) contendo uma mistura de solo de textura média e matéria orgânica na proporção de 1:1. Os manejos culturais foram

realizados de acordo com os recomendados por Filgueira (2000). Assim, após o surgimento das primeiras flores foi realizada a desbrota removendo todas as folhas abaixo destas, para permitir o alongamento da haste durante o desenvolvimento. Nesta ocasião foi feito o tutoramento das plantas com varetas de madeira, de aproximadamente 80 cm de comprimento, que foram cravadas próximo à base das plantas e em seguida efetuado o amarrio (Figura 10). As adubações foram feitas segundo Malavolta (1980), que sugere a aplicação de nutrientes nas seguintes dosagens em mg/dm^3 : N=300, P=200, K=150, Mg=15, S=50, B=0,5, Cu=1,5, Fe=1,5, Mn=3, Mo=0 e Zn=5. A adubação foi realizada 15 dias antes do transplante das mudas, adicionando 30% das doses de N e K, e todo conteúdo de Mg e P. Posteriormente, foram realizadas 8 adubações parcelada adicionando todo o restante do N, K e Ca. Os demais nutrientes foram aplicados aos poucos, junto à água de irrigação. As plantas foram irrigadas diariamente.



Figura 9- Produção de mudas de pimentão em vasos plásticos de 5 litros. Foto: Raquel Corrêa.



Figura 10- Tutoramento das mudas de pimentão com varetas de madeira. Foto: Raquel Corrêa.

4.2 Coleta e criação de ácaros

Para criação estoque, folhas de pimentão infestadas por *T. desertorum* foram coletadas em uma área de produção na Zona Leste do Município de Manaus, e transportadas em sacos plásticos para o laboratório.

No laboratório, os ácaros foram montados em lâminas de microscopia em meio Hoyer, para confirmação da espécie, de acordo com as características taxonômica mencionadas por Jeppson *et al.* (1975) (Figura 11).

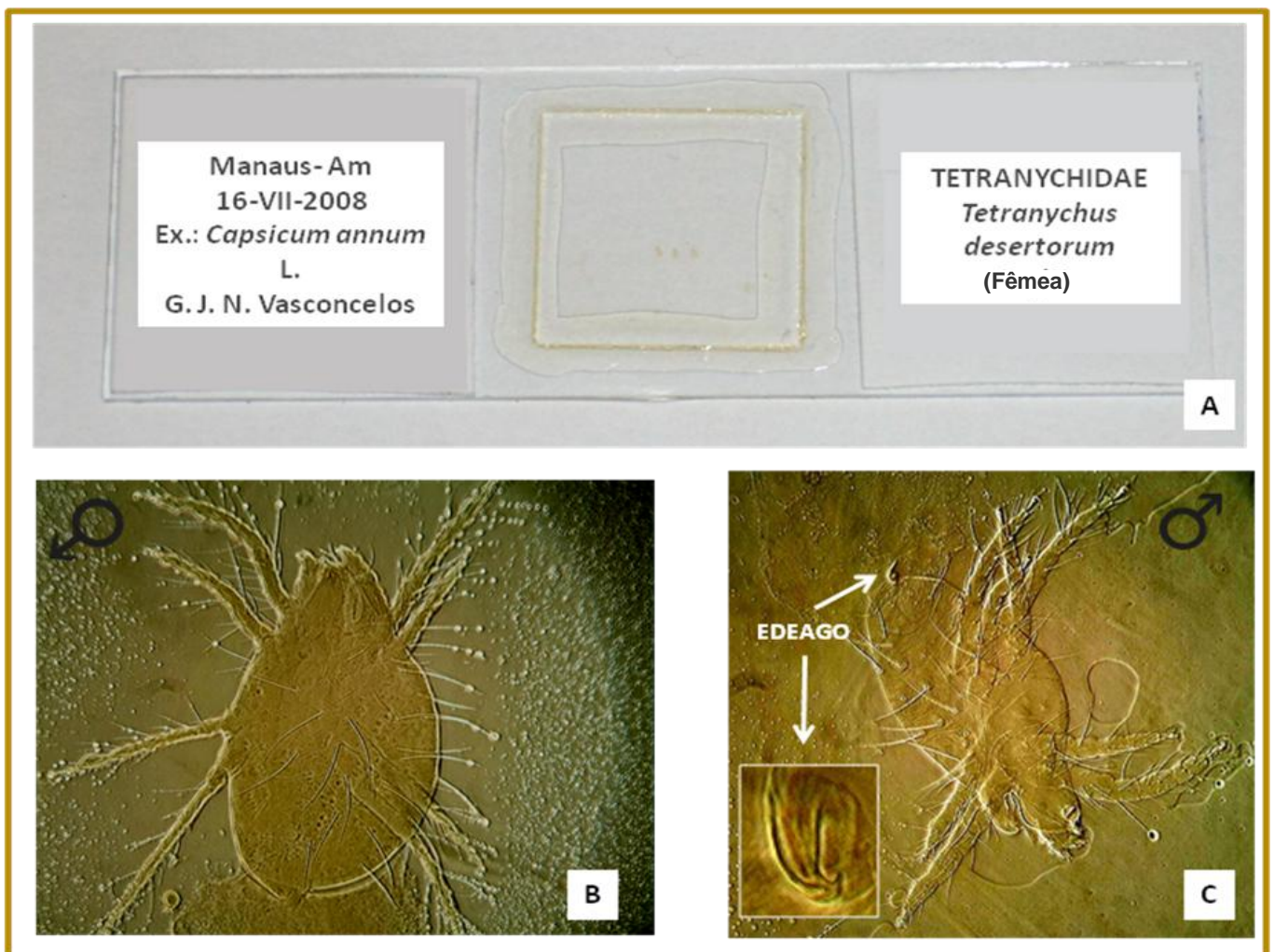


Figura 11- (A) Ácaros montados em lâminas de microscopia em meio Hoyer; (B) Detalhes da fêmea *T. desertorum* em microscopia; (C) Detalhes do macho e edeago. Foto: Kedma Pereira.

Os ácaros foram retirados das plantas e removidos com auxílio de pincel de cerdas finas, para a unidade de criação, montada em uma bandeja plástica e constituída de uma folha de pimentão, com a superfície abaxial voltada para cima, sobreposta a uma folha de papel filtro qualitativo e espuma de polietileno, nesta mesma seqüência. Para evitar a desidratação, as bordas das folhas foram contornadas com algodão umedecido com água destilada e trocadas a cada três dias. Diariamente a unidade foi umedecida com água destilada.

Para adapta-se as novas condições de clima e unidade de criação no laboratório, foram utilizados para os bioensaio ácaros a partir da segunda geração, aproximadamente 35 dias após o início da criação em laboratório, com o objetivo de diminuir a mortalidade por stress ambiental.

4.3 Coleta de timbó

Foram utilizados extratos da raiz das espécies *D. rariflora* e *D. floribunda*. Os pontos de coleta foram georreferenciados com auxílio de um GPS para facilitar a localização das plantas em futuras coletas, caso fosse necessário. As plantas utilizadas para os estudos foram coletadas na época chuvosa, entre os meses de dezembro de 2008 a março de 2009. De acordo com Scudeller *et al.* (2009), a precipitação no município de Manaus é sempre sazonal, o trimestre mais chuvoso é fevereiro, março e abril, com cerca de 325 mm de chuva para os dois últimos meses. A espécie *D. floribunda* foi coletadas em bordas de floresta secundária na Comunidade Nossa Senhora do Livramento (03° 01' S e 60° 11' W), localizada na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Tupé e a espécie *D. rariflora* foi coletada em bordas de floresta secundária no Campus da Universidade Federal do Amazonas (03° 05' S e 59° 59' W), Zona Leste de Manaus. A primeira área é caracterizada por solos do tipo argilo-arenosos, muito úmidos e encharcados na época de maior pluviosidade, poucos férteis. Já a área do Campus

Universitário tem predominância de latossolo amarelo de baixa fertilidade (Silva *et al.*, 2007 e Tucci *et al.*, 2010).

Após a localização da planta, o solo ao seu redor foi removido com auxílio de enxada descobrindo ao máximo suas raízes (Figura 12). Em seguida estas foram extraídas e separadas do caule da plantas com auxílio de um facão (Figura 13).



Figura 12- Coleta de raízes de timbó com auxílio de enxada. Foto: Raquel Corrêa.



Figura 13- Separação de raízes do caule da planta, com auxílio de facão. Foto: Márcia Pena.

Algumas amostras de cada local foram prensadas para a confecção de exsicata (Figuras 14 e 15) e encaminhadas ao Herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) para identificação das espécies.



Figura 14- Exsicata de *Derris rariflora*.



Figura 15- Exsicata de *Derris floribunda*.

Para evitar incidência direta da luz sobre o material coletado, este foi acondicionado em saco plástico escuro e etiquetado com data, nome do coletor e local da coleta. Em seguida foi transportado ao laboratório.

4.4 Obtenção dos extratos

No laboratório, as raízes foram desidratadas em estufa à 50°C, com circulação forçada de ar, durante 48 horas. Após a secagem foram trituradas em moinho tipo “faca” até obter um pó fino, o qual foi acondicionado em recipientes de vidro com tampa rosqueável (Figura 16). Em seguida, os recipientes foram recobertos por papel alumínio para proteger o material da luz.

Para possibilitar o cálculo confiável da CL_{50} que requer um número mínimo de cinco concentrações para ser determinada, o pó da raiz de *D. rariflora* e *D. floribunda* foi pesado em balança analítica de precisão (0,000) e em seguida diluída em água nas concentrações de 0,5, 1, 10, 20 e 30% (massa/volume), ficando em repouso por 24 horas (extração à frio). Posteriormente a solução foi filtrada em papel filtro com microfuros, Melitta[®], resultando no extrato aquoso (Figura 17).

Para a obtenção dos extratos acetônico e etanólico o procedimento adotado foi o mesmo citado acima, porém substituindo a água destilada por álcool etanólico P.A. e acetona P.A.



Figura 16- Timbó em pó armazenado em frasco de vidro rosqueável. Foto: Raquel Corrêa.



Figura 17- Procedimento de filtragem do extrato aquoso de timbó em papel filtro Mellita[®]. Foto: Raquel Corrêa.

4.5 Análise de rotenona nos extratos

Para identificar e quantificar a rotenona nos extratos de timbó foi utilizado a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Uma amostra dos extratos (aquoso,

acetônico e etanólico) de cada espécie na concentração de 30% (massa/volume) foi encaminhada ao laboratório de análise cromatográfica da UFAM. Em média, o rendimento do extrato concentrado em relação à raiz seca foi de 5,2%. No laboratório, esses extratos foram concentrados em evaporador rotativo (Figura 18), resultando no extrato bruto. Para cada 1 mg deste extrato foi acrescentado 1 ml de metanol (MeOH) e em seguida foram centrifugados. A suspensão foi transferida para tubos de vial e em seguidas foram injetadas no cromatógrafo.



Figura 18- Concentração do extrato em evaporador rotativo.

Foi utilizado para as análises o cromatógrafo DAD – Shimadzu SPD – M10Avp equipado com uma coluna Kromasil[®] C₁₈ 4,6 mm x 15 cm x 5 μm (analítica), fixando-se o c.d.o. em 325 nm (Figura 19) . A otimização das condições de separação em sistema de gradiente foi obtida pela aplicação de uma fase móvel que compreendeu de dois solventes: solvente A (água com 0,05% de TFA) e solvente B (acetonitrila a 100%) com um fluxo de 1mL min⁻¹, obedecendo aos seguintes gradientes: (0-3 min) 30% (B), (3-10 min) 30%-55% (B), (10-30 min) 55-100% (B), (30-35) 100% (B). (35-38) 100-30% (B), (38-40) 30% (B). As

injeções das amostras foram feitas em triplicata ($v_i=10 \mu\text{L}$) e a detecção acompanhada com sistema de fotodiodos entre 200-600 nm, durante 60 minutos.



Figura 19. Cromatógrafo DAD – Shimadzu SPD – M10Avp, equipado com coluna Kromasil®.

A rotenona (*Sigma*, 98%) foi utilizada como produto padrão para identificação da mesma nos extratos, por meio da comparação do tempo de retenção. O padrão foi obtido por meio de 1 mg/L de rotenona em MeOH, tomando alíquotas de 500 μL para diluição seriada, obtendo as concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6.25 mg/L. Em triplicata, essas concentrações foram injetadas no cromatógrafo e a partir do cromatograma, calculou-se a média das áreas dos picos. A curva de calibração (Figura 20) foi obtida por regressão linear das áreas médias e concentrações do padrão.

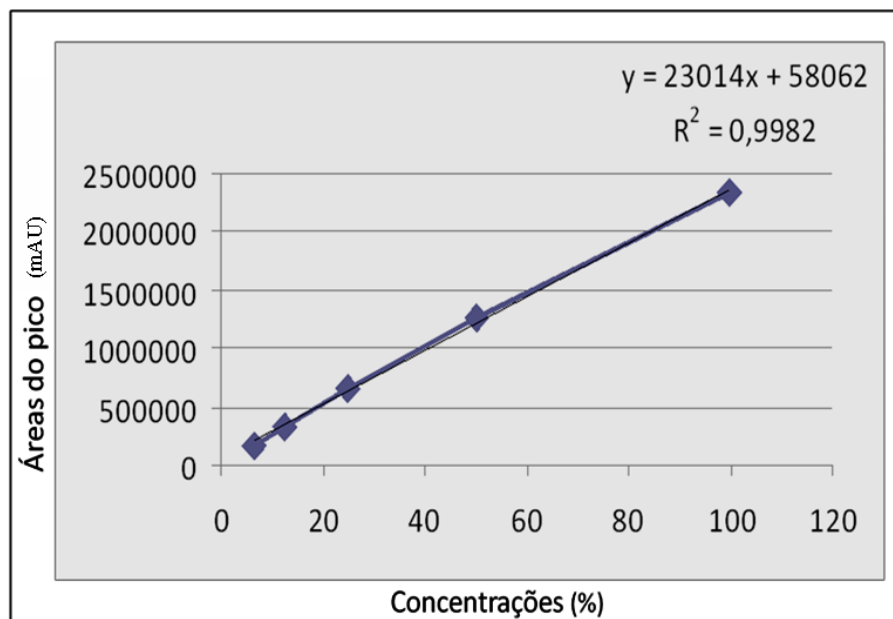


Figura 20- Curva de calibração do padrão da rotenona e equação da reta para quantificação de rotenona nos extratos de timbó.

Para quantificar a rotenona nos extratos foi utilizada a equação da reta $y = 23014x + 58062$, $R^2 = 0,9982$, verificada por meio da curva de calibração do padrão. Onde, y = média das áreas do pico de rotenona nos extrato e x = quantidade de rotenona verificada nos extratos.

4.6 Bioensaios com extratos

Esta parte do experimento foi realizada no Laboratório de Entomologia e Acarologia Agrícola- LEA/UFAM. Folhas de pimentão foram cortadas em forma de disco (33 mm de diâmetro) e imersas nos extratos, nas respectivas concentrações, durante cinco segundos (período suficiente para a solução entrar em contato com a superfície foliar) (Figura 21). Cada disco teve contato com aproximadamente 1ml da solução. O grupo controle foi imerso em água destilada, durante o mesmo período. Acondicionados em placas de Petri, os discos foram

sobrepostos em papel filtro e este em espuma de polietileno (50 mm de diâmetro) (Figura 22). Para garantir a turgidez dos discos de folhas, as bordas foram contornadas com algodão umedecido em água destilada.



Figura 21- Discos de folhas de pimentão, imersos no extrato aquoso de timbó.



Figura 22- Discos de folhas de pimentão, sobre papel filtro e espuma de polietileno, umedecidos.

Foram utilizados para os testes somente ácaros fêmeas no estágio adulto, pois segundo Hell e Sabelis (1985), de forma geral, as fêmeas representam 75% da população de tetraniquídeos, além disso são responsáveis pela geração de descendentes, de forma sexuada ou assexuada. Esses ácaros foram repassados para os discos de folhas com auxílio de pincel de cerdas finas sob microscópio estereoscópio. Cada disco recebeu oito fêmeas. Posteriormente, as unidades experimentais foram colocadas sobre bandejas plástica e mantidas em seguida postas em câmara climatizada tipo “B.O.D.” (Figura 23), a temperatura de $25,2 \pm 0,2$ °C, Umidade Relativa de $83,5 \pm 5,8\%$ e fotofase de 12h.



Figura 23- Unidades experimentais em câmara climatizada tipo “B.O.D”.

As observações referentes à taxa de mortalidade foram verificadas a cada 24 horas durante três dias. Para isso, as unidades experimentais foram retiradas diariamente da câmara climatizada e analisadas individualmente sob microscópio estereoscópio. A morte foi confirmada quando os indivíduos apresentavam imobilidade após serem tocados com pincel de cerdas finas. Por ocasião das avaliações as arenas foram reumedecidas com água destilada.

4.7- Bioensaio com rotenona

A rotenona comercial (*Sigma*, 98%) foi testada sobre o ácaro com objetivo de verificar se a toxidez dos extratos estava sendo ocasionada por esta substância, como afirma a maioria dos autores (Caminha Filho, 1940; Castagnoli *et al.*, 2005; Corbett, 1940; Costa, 1996; Homma, 2007, Pereira *et al.*, 2004 e Wongthong e Pimsamam, 2007).

A rotenona comercial foi diluída em acetona P. A, nas seguintes concentrações: 0,1, 0,5 e 1% (massa/volume), essas concentrações estão acima das concentrações que estavam presentes nos extratos de timbó do qual os ácaros foram expostos. Posteriormente, discos de

folhas de pimentão foram imerso nas concentrações durante cinco segundo e em seguidas postos para secar naturalmente. Cada disco de folha recebeu aproximadamente 1 ml da solução.

A mesma metodologia descrita no item 4.6 foi adotada para a montagem das unidades experimentais e observação da mortalidade dos ácaros.

4.8 Análise de dados

O experimento com extratos de timbó sobre os ácaros foi realizado em esquema fatorial 2 x 3 x 5 (plantas x extratos x concentrações), com oito repetições por tratamento.

Nos bioensaios com a rotenona, foram utilizados 4 tratamentos (concentrações e controle) e oito repetições.

A mortalidade média de cada tratamento foi submetida à análise de variância e comparada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A CL_{50} e TL_{50} foi calculada para os extratos que atingiram 50% de mortalidade de ácaros. Para isso foi utilizada a análise de Probit (Finney, 1971) e respectivos intervalos de confiança (IC-95%), com auxílio dos softwares EPA Probit Analysis Program 1.5[®] ou seu análogo não paramétrico EPA Trimmet Spearman-Kärber Method 1.5[®]. Para a comparação da toxicidade entre os extratos, foram utilizados os valores dos intervalos de confiança das duas CL_{50} , as quais foram consideradas estatisticamente diferentes quando os seus Intervalo de Confiança a 95% de probabilidade (IC-95%) não se sobrepuseram (Meister e Brink, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teores de rotenona nos extratos

O padrão da amostra, estabelecido na caracterização cromatográfica da rotenona comercial (*Sigma*®, 98%), foi utilizado para identificar esta substância nos extratos de *D. rariflora* e *D. floribunda*. A rotenona comercial foi detectada após 18,56 minutos de eluição (tempo de retenção) (Figura 24). Esse tempo iniciou-se com a injeção da amostra no cromatógrafo até a detecção do ponto máximo do pico da rotenona no sistema.

Segundo Schuler (2008), o tempo de retenção de uma substância por meio de cromatografia, pode ser influenciado pela natureza da fase estacionária (coluna), considerando a polaridade, a vazão da fase móvel, a temperatura da coluna e a granulometria. Assim, Milusheva *et al.* (2008) utilizando uma coluna cromatográfica Nucleosil® C-18 (4,0mm x 20cm, 15-25 µm) registraram o tempo de retenção da rotenona em 19 minutos, semelhante ao tempo de retenção obtido no presente estudo. No entanto, Cavoski *et al.* (2008) (Coluna XDB 2,1mm x 25 cm x 5 µm), Caboni *et al.* (2008) (Coluna XDB 4,6mm x 15cm x 5 µm) e Marella *et al.* (2008) (Coluna C18, Waters Spherisorb 4,5mm x 15 cm, 5 µm) detectaram tempo de retenção da rotenona em 13,85, 12,27 e 10,5 minutos, respectivamente.

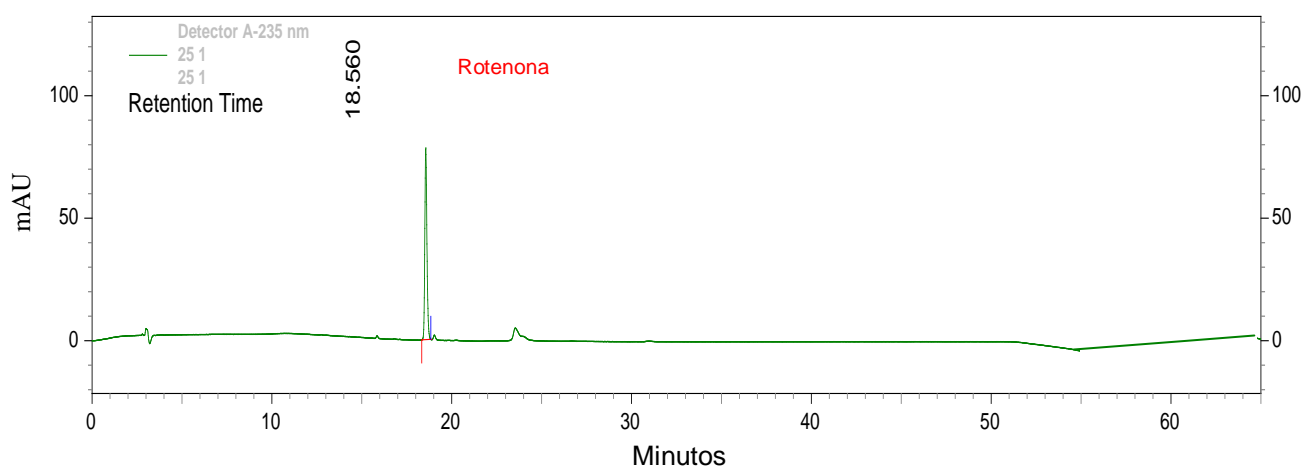


Figura 24- Pico cromatográfico do padrão da rotenona. Pico assinalado em vermelho mostra o tempo de retenção da rotenona.

Não foi observada a presença de rotenona nos extratos aquosos de *D. rariflora* e *D. floribunda*. Os picos apontados no cromatograma não corresponderam ao tempo de retenção do padrão (Figuras 25 e 26). Isso é explicado por Cavosk *et al.* (2009), Zubairi *et al.* (2004) e Yoon (2009), eles retratam que a rotenona por tratar-se de uma molécula de intermediária polaridade sua solubilidade em água é bastante baixa, praticamente insolúvel. Isso é reforçado pelos estudos de Medeiros e Kanis (2010), quando afirmam que os flavonóides de média polaridade são classificados com “muito pouco solúveis em água”. De acordo Zubairi *et al.* (2004) quanto menor a polaridade do reagente, mais eficaz será o mecanismo de extração da rotenona. Apesar deste conhecimento, é comum encontrar na literatura trabalhos que consideram a rotenona como sendo a principal substância tóxica dos extratos aquosos (Corrêa, 2006 e Filgueira, 2010).

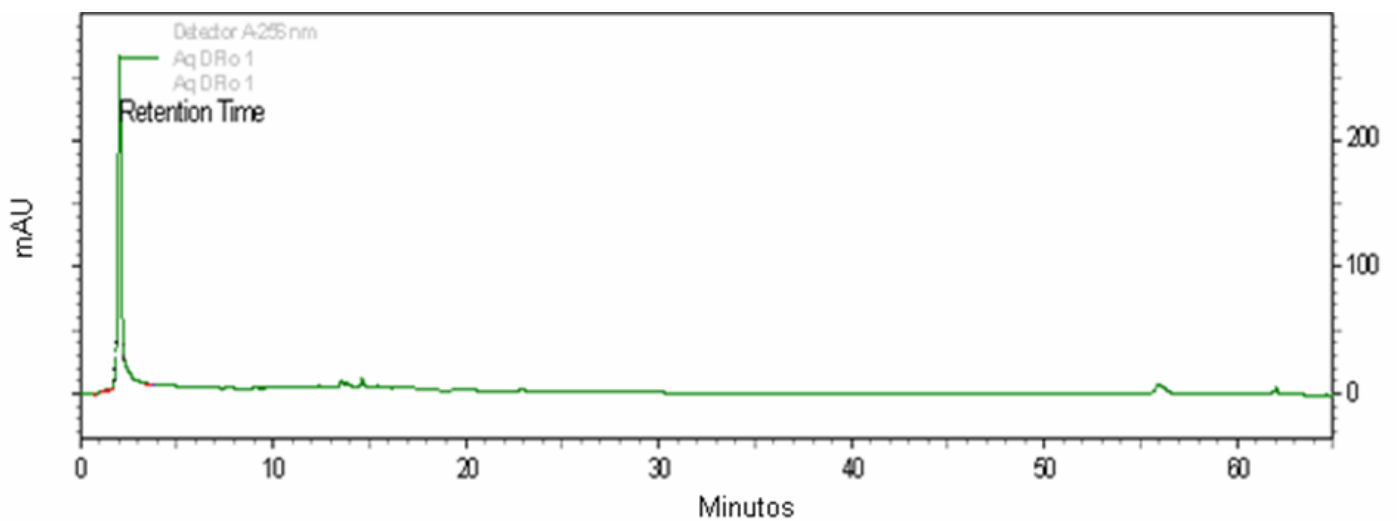


Figura 25- Cromatograma do extrato aquoso de *D. rariflora*.

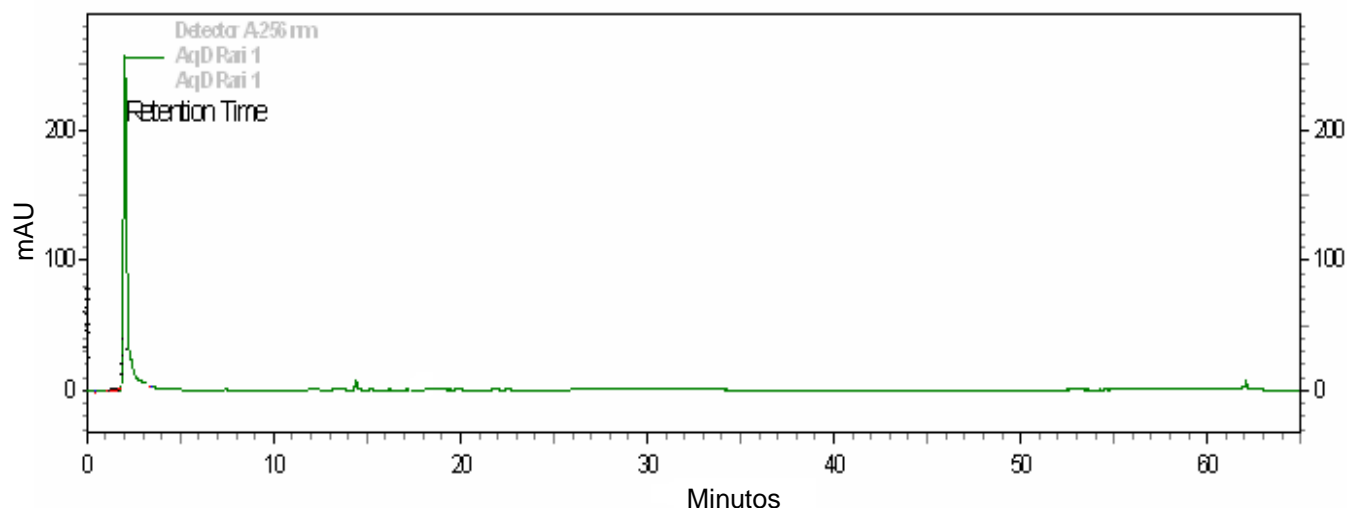


Figura 26- Cromatograma ma do extrato aquoso de *D. floribunda*.

A presença de rotenona foi constatada nos extratos acetônico e etanólico de *D. floribunda* e *D. rariflora* (Figuras 27, 28, 29 e 30), essa extração foi possível porque o etanol e acetona possuem polaridade mais baixa quando comparados à água. De acordo com Medeiros e Kanis (2010), a eficiência de extração dos princípios ativos de plantas é dependente principalmente da solubilidade dos solventes empregados na extração, desse modo verificou-se que a rotenona foi solúvel em etanol e acetona.

Picos relacionados a outras substâncias também foram observadas no cromatograma. Nunes *et al.* (2009), observaram que essas substâncias estão relacionadas na maioria das vezes com a presença de flavonóides, incluindo os demais rotenóides dos timbós, como elliptona, sumatrol, malacol, toxicarol e deguelina (Kamal e Mangla, 1993, Saito e Lucchini, 1998, Thacke, 2002 e Vieira *et al.* 2004). Acredita-se que as substâncias retidas em intervalos de tempo próximos ao da rotenona estejam relacionadas a esses rotenóides, uma vez que as estruturas químicas dessas substâncias assemelham-se com a estrutura da rotenona (Mariconi, 1981 e Teixeira, 2003). Segundo Gallo *et al.* (2002), a presença de mais de um produto ativo

nos inseticidas vegetais é considerada vantajoso, já que reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelas pragas.

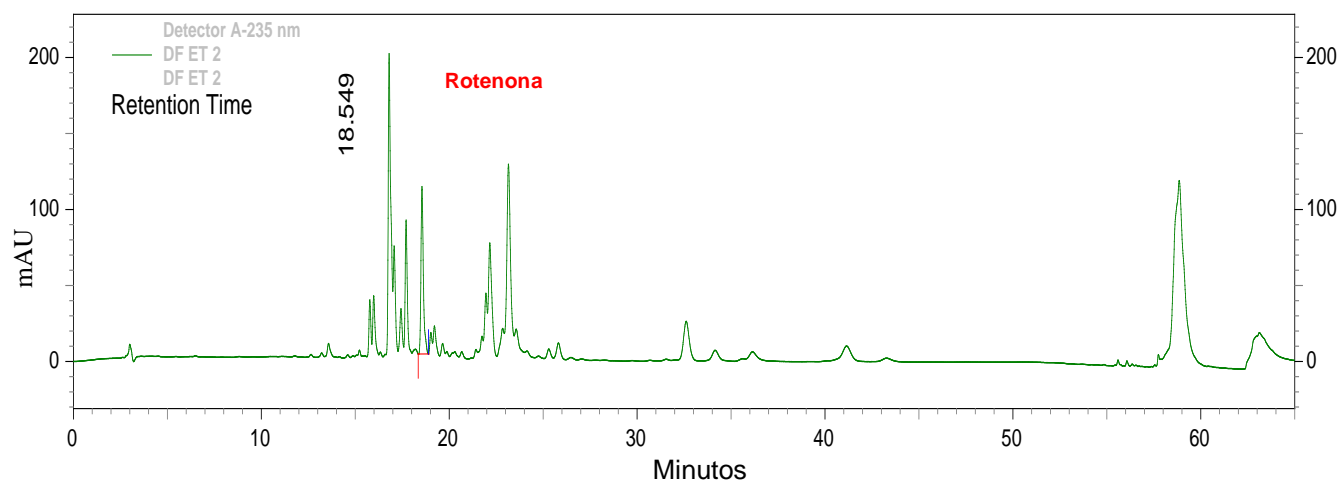


Figura 27- Cromatograma do extrato etanólico de *D. floribunda* Pico assinalado em vermelho mostra o tempo de retenção da rotenona.

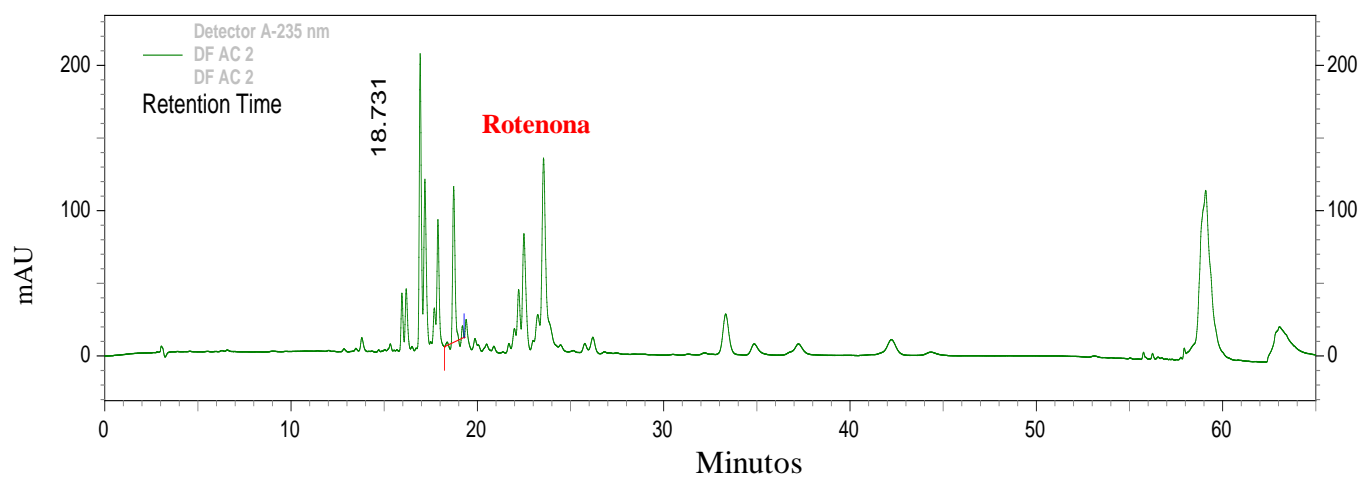


Figura 28- Cromatograma do extrato acetônico de *D. floribunda*. Pico assinalado em vermelho mostra o tempo de retenção da rotenona.

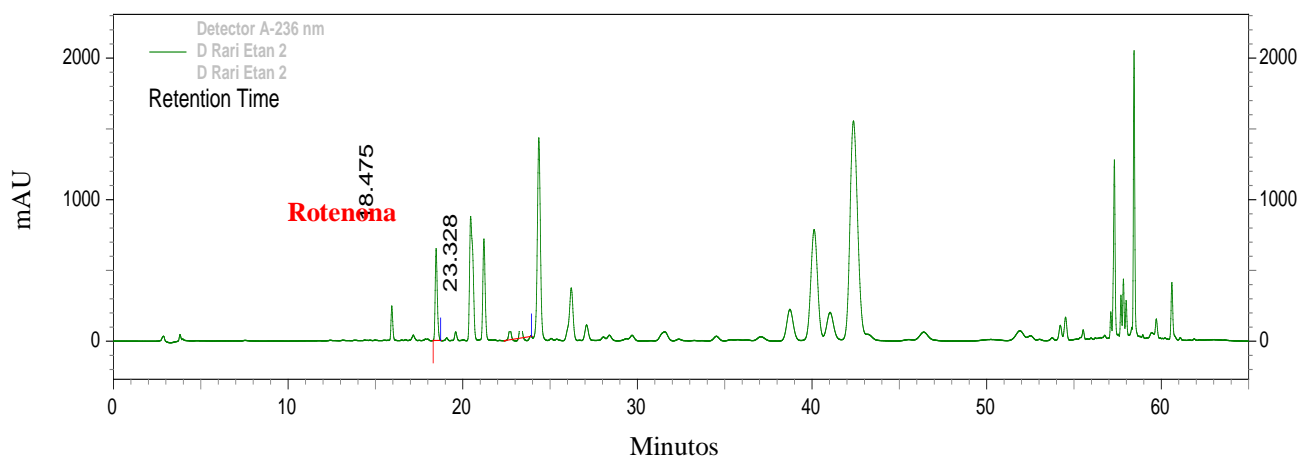


Figura 29- Cromatograma do extrato etanólico de *D. rariflora*. Pico assinalado em vermelho mostra o tempo de retenção da rotenona.

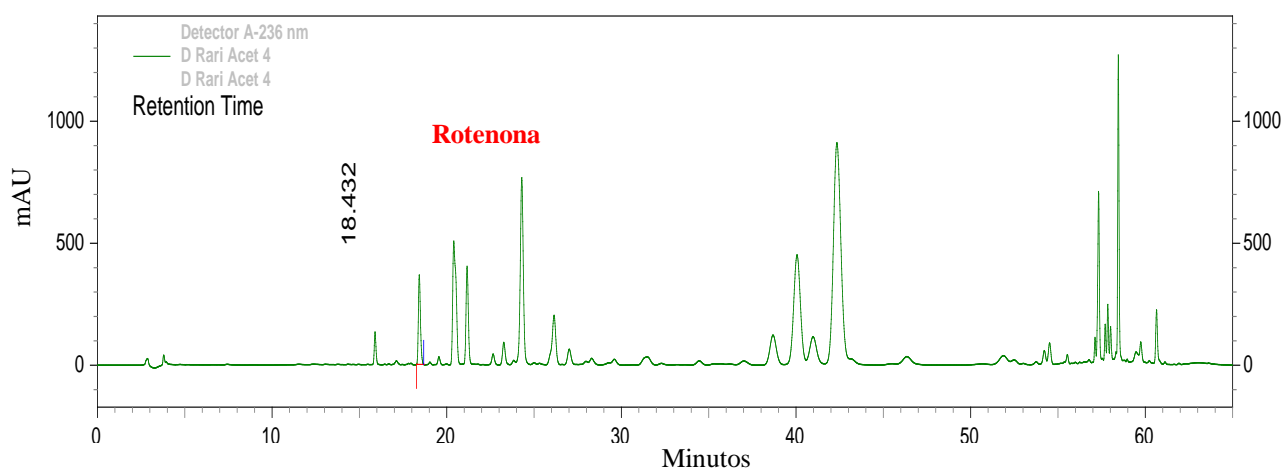


Figura 30- Cromatograma do extrato acetônico de *D. rariflora*. Pico assinalado em vermelho mostra o tempo de retenção da rotenona.

Foi verificado um teor de rotenona de 4,5 e 4% nas raízes *D. floribunda* e 4,3 e 5% nas raízes de *D. rariflora*, para os extratos acetônico e etanólico, respectivamente. Os teores de rotenona verificados nestes extratos não diferiram entre si (Tabela 1). Isso mostra que os reagentes utilizados (acetona e álcool), tiveram a mesma eficiência na extração de rotenona. Zubairi *et al* (2005), avaliando extratores para os princípios ativos dos timbós concluíram que o etanol é o melhor extrator que a acetona para a maioria dos princípios ativos dos timbós, com exceção a rotenona. De acordo com Yongguang e Chunji (2007) e Wenjie *et al.* (2009), o

etanol também extrai eficientemente a deguelina, segundo rotenóide mais importante do gênero *Derris*.

Esses resultados mostram que o teor de rotenona também não diferiu estatisticamente entre as plantas estudadas (Tabela 1). Porém, o fato das espécies terem sido coletadas em diferentes áreas impossibilita afirmar que o potencial genético para a síntese de rotenona não seja significativo para *D. rariflora* e *D. floribunda*, pois segundo Cavoski *et al.* (2007) o teor de rotenona é extremamente afetado pelas propriedades físico-químicas do solo.

Os teores de rotenona verificados para *D. floribunda* e *D. rariflora* foram próximos aos encontrados para outras espécies de timbó. Costa *et al.* (2009) estudando a espécie *Derris urucu* Killip. e *Derris nicou* Aubl., observaram um percentual de rotenona de 3,7 e 4,2%, respectivamente. Alécio (2005) constatou um percentual de 3,7% em *Derris amazônica* Killip. Saito e Luchini (1998) obtiveram um teor de 5,5% em *Derris elliptica* Benth.. No entanto, concentrações mais baixas de rotenona foram registrados nas raízes de *Derris trifoliata* Lour., a qual apresentou com um teor de 0,019% (Sumera e Conato, 2006). Essas variações no teor de rotenona podem estar relacionadas com variabilidade genéticas das espécies e/ou influência edafoclimáticas, pois segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) os metabólitos secundários das plantas podem sofrer influência do ambiente circundante, portanto, sua síntese pode ser frequentemente afetada pelas condições ambientais.

Tabela 1 - Áreas do pico cromatográfico e teores de rotenona dos extratos de timbó.

| TRATAMENTOS (Extratos) | Áreas dos picos cromatográficos (mAU) | | | Media das áreas dos picos (mAU) | Teor de rotenona (%) * | Média do teor de rotenona (%)* |
|--------------------------------|--|---------|---------|---------------------------------------|------------------------------|---|
| | Triplicata | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| <i>Acetônico D. floribunda</i> | | | | | | |
| Repetição 1 | 1021052 | 950660 | 1071907 | 1011283,5 | 4,10 | 4,5 a |
| Repetição 2 | 1158436 | 1341051 | 1007799 | 1174425 | 4,85 | |
| <i>Etanólico D. floribunda</i> | | | | | | |
| Repetição 1 | 1004670 | 985955 | 955406 | 982010,3 | 4,01 | 4,0 a |
| Repetição 2 | 1066986 | 985955 | 955406 | 1002782,3 | 4,10 | |
| <i>Acetônico D. rariflora</i> | | | | | | |
| Repetição 1 | 1263123 | 882562 | 882562 | 1072842,5 | 4,40 | 4.3 a |
| Repetição 2 | 1240175 | 871599 | 1063260 | 1055887 | 4,33 | |
| <i>Etanólico D. rariflora</i> | | | | | | |
| Repetição 1 | 1124648 | 1129164 | 1133341 | 1131252,5 | 4,66 | 5,0 a |
| Repetição 2 | 1361953 | 1439304 | 1180170 | 1309737 | 5,43 | |

* Concentração de rotenona em 1mg de extrato bruto.

5.2 Toxicidade dos extratos

5.2.1 Toxicidade de *D. rariflora* e *D. floribunda*

Foi verificado que existe diferença na toxicidade das duas espécies de timbó sobre *T. desertorum*, sendo *D. rariflora* mais tóxica do que *D. floribunda* (Tabela 2). De acordo com Homma (2007), a toxicidade dos timbós varia com as espécies, porém, levando em conta que as espécies utilizadas no presente trabalho foram coletadas em diferentes pontos geográficos, como já comentado anteriormente, essa diferença de toxicidade pode está associada à

variabilidade genética das plantas e/ou ter sofrido influências de outros fatores como os edafoclimático, já que a espécie *D. rariflora* foi coletada em latossolo amarelo, cuja fertilidade de um modo geral é considerada baixa e o pH varia entre 4 e 5 (Ker, 1997), o ponto de coleta é de baixo declive e *D. floribunda*, foi coletada em solos de características argilo-arenosa, bastante úmidos na época chuvosa (Scudeller *et al.*, 2009), de um modo geral pouco férteis, o teor de areia chega a atingir 56%, pH em média 5,2 (Vieira, 1999), o local de coleta é de médio declive. Os metabólitos secundários bioativos dos timbós podem ter sofrido tal influência, pois de acordo com Moraes (2009), os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, o autor destaca as interações planta-microrganismos, planta-insetos, planta-planta, idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de coleta e pós-coleta. Estes fatores podem atuar isoladamente ou em conjunto, influenciando no metabolismo secundário.

São poucos os trabalhos que retratam os timbós em sistema de cultivo e domesticação (Homma, 2008; Lima, 1987 e Tozzi, 1998), no entanto, Gobbo-Neto e Lopes (2007) dizem que o aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramento genético de plantas com propriedades bioativas, poderiam resultar na obtenção de matérias primas uniformes e de alta qualidade, quando comparadas àquelas coletadas direto do campo. Esses autores ainda descrevem que existe uma necessidade de condução de experimentos que visem conhecer os diferentes fatores que podem levar a variação dos metabólitos secundários das plantas, com intuito de estabelecer parâmetros como condições e a época de cultivo que possam conduzir a uma forma de manejo apropriado para obtenção da matéria prima vegetal com concentrações uniforme dos princípios ativos.

5.2.2 Toxicidade de extrato aquoso, acetônico e etanólico

Foi verificada diferença significativa de toxicidade entre todos os extratos testados. O extrato etanólico foi o mais tóxico, seguido do extrato aquoso e acetônico (Tabela 2). Demonstrando que possivelmente o extrato etanólico seja mais eficiente na extração dos princípios ativos com atividade acaricida. Vários estudos têm atribuído a toxicidade dos timbós à rotenona (Alécio, 2007, Caminha Filho, 1940; Corbett, 1940; Costa, 1996; Lima, 1987 e Pereira e Famadas, 2004), porém, no gênero *Derris*, podem está presentes outros rotenóides tóxicos como deguelina, elliptona, sumatrol, toxicarol e malacou, possivelmente existam outras substancia bioativas pouco conhecidas (Teixeira, 2003). Além dos rotenóides, Most (1973) também isolou do complexo tóxico dos timbós uma saponina de poder espumífero, denominada de derrisídio, a qual parece desempenhar ação de agente dispersivo da rotenona.

Possivelmente o efeito tóxico do extrato etanólico sobre *T. desertorum* não esteja relacionado com a rotenona, pois neste caso, o etanol provavelmente esteja extraíndo também outras substâncias bioativas ou em maior percentual, fazendo com que haja diferença de toxicidade entre os extratos obtidos com este solvente, isso é concretizado pela não diferença do teor de rotenona nos extratos etanólicos e acetônicos (Tabela 1), onde o primeiro foi mais tóxico (Tabela 2). A presença de rotenóide no extrato etanólico foi confirmada em uma outra espécie, porém do mesmo gênero, *Derris urucu* Killip, Lobato *et al.* (2009) e Solano *et al.* (2008) isolaram além da rotenona, a deguelina, 6a,12a-desidrorotenona e 6a,12adesidrodeguelina.

A toxicidade dos extratos aquosos sobre *T. desertorum* provavelmente esteja ligada à extração dos rotenóides, com exceção à rotenona, ou outras substâncias bioativas, pois como pôde ser observado no item 5.2.1 a rotenona não foi extraída em meio aquoso, o que prova que esta substância não foi a responsável pela atividade tóxica, como afirma a maioria dos

autores (Costa, 1996; Costa *et al.*, 1999, Corrêa, 2006 e Teixeira, 2003). Laupattarakasem *et al.* (2004), registraram a presença de isoflavonóides a partir do extrato aquoso de *Derris scandens* Benth, porém, embora a identificação desses compostos não tenha sido realizada, é de conhecimento que os rotenóides fazem parte dessa classe química, o que fortalece a hipótese da presença de rotenóides no extrato aquoso de *D. rariflora* e *D. floribunda*.

De acordo com Lima (1987), as substâncias bioativas dos timbós necessitam ser mais pesquisadas para se ter conhecimento dos seus efeitos e se poderão servir de matéria prima para a obtenção de produtos biológico, pois até então a rotenona é a substância mais citada.

5.2.3 Toxicidade a diferentes concentrações dos extratos

Entre os tratamentos controle a mortalidade variou de 0 a 6,2% (Tabela 2), sendo esta, provavelmente, atribuída a fatores abióticos (estresse ambiental) e/ou bióticos (fisiológicos ou genéticos), ficando abaixo do máximo sugerido por Gonzaga *et al.* (2008) que ressaltam que esse tratamento não deve apresentar mortalidade superior a 10%.

Todas as concentrações testadas diferiram do controle, mostrando que foram tóxicas sobre *T. desertorum*. Foi observado que a taxa de mortalidade de ácaros aumentou a medida que as concentrações aumentaram. De forma geral, as maiores taxas de mortalidade foram observadas nas duas concentrações mais elevadas. A exceção do extrato acetônico de *D. floribunda* a 30%, a mortalidade nas duas maiores concentrações variou de 44,2 a 100,0%. Para o extrato acetônico de *D. floribunda* a 30% a mortalidade foi de 6,6%, provavelmente devido a baixa concentração dos princípios acaricidas contidos nesses extratos, com exceção a rotenona, pois essa não diferiu dos demais tratamentos.

As duas menores concentrações (0.5 e 1%) foram as que causaram menor taxa de mortalidade, não diferindo entre si, possivelmente por apresentarem teores mais baixos de substâncias tóxicas. No geral essas concentrações não atingiram 50% de mortalidade e o

extrato aquoso e etanólico de *D. floribunda* nas concentrações de 0,5 e 1% não causaram mortalidade de ácaros (Tabela 2). Porém, apesar do baixo percentual de mortalidade, observou-se que quando em contato a essas baixas concentrações, os ácaros mostraram-se inquietos, nas primeiras 24 horas, evitaram ficar sobre os discos de folhas de pimentão, refugiando-se nas paredes das placas de Petri. Visto que os derivados botânicos nem sempre causam mortalidade, o efeito tóxico pode ser de repelência (Roel, 2001), neste caso, surge a hipótese de que os extratos menos concentrados podem ter causado efeito repelente sobre os ácaros, porém para tal afirmação é necessário novos estudos, com a utilização de metodologias mais propícias.

Quando em contato com os extratos mais concentrados, os ácaros mostraram-se inquietos nas primeiras 24 horas, em seguida passaram a se movimentar menos, nas próximas horas foi observado tremor, principalmente nas pernas e posteriormente foi detectada a mortalidade. De acordo com Mascaro *et al.* (1998), essa sintomatologia de intoxicação é coerente com a ação tóxica dos rotenóides, que é a inibição da cadeia respiratória mitocondrial.

Entre as concentrações testadas, a de 20% do extrato etanólico de *D. rariflora* seria a mais indicada para o controle de *T. desertorum*, pois apesar de não diferir da concentração de 30%, significa o uso de uma menor quantidade de matéria prima com a mesma eficiência acaricida, o que a torna mais viável economicamente. O Tempo Letal Médio (TL₅₀) para este extrato nesta concentração foi de 32,5 horas. Isso significa que este extrato controlaria 50% da população de *T. desertorum* no percorrido tempo, após a aplicação.

Tabela 2- Mortalidade de *T. desertorum* sob diferentes concentrações do extrato aquoso, etanólico e acetônico de *D. rariflora* e *D. floribunda*.

| Concentrações | Plantas | Extratos | | | Tukey para Concentrações (1) | Tukey para Plantas (2) |
|--------------------------------|----------------------|-----------------|-----------|-----------|------------------------------|------------------------|
| | | Mortalidade (%) | | | | |
| | | Aquoso | Etanólico | Acetônico | | |
| 0% | <i>D. rariflora</i> | 6,2±3,8 | 3,3±3,3 | 5,0±3,1 | d | A |
| | <i>D. floribunda</i> | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | | B |
| 0,5% | <i>D. rariflora</i> | 44,2±13,9 | 5,0±3,1 | 28,8±12,9 | c | |
| | <i>D. floribunda</i> | 0,0±0,0 | 5,3±3,3 | 0,0±0,0 | | |
| 1% | <i>D. rariflora</i> | 39,5±3,8 | 30,9±6,6 | 29,3±12,2 | c | |
| | <i>D. floribunda</i> | 0,0±0,0 | 16,2±4,6 | 0,0±0,0 | | |
| 10% | <i>D. rariflora</i> | 53,3±7,9 | 80,2±19,8 | 54,2±11,4 | b | |
| | <i>D. floribunda</i> | 5,4±3,3 | 41,7±3,5 | 6,1±3,7 | | |
| 20% | <i>D. rariflora</i> | 57,5±17,7 | 100,0±0,0 | 51,6±9,3 | ab | |
| | <i>D. floribunda</i> | 31,8±10,5 | 38,9±3,7 | 6,1±3,7 | | |
| 30% | <i>D. rariflora</i> | 82,5±8,5 | 100,0±0,0 | 62,6±12,9 | a | |
| | <i>D. floribunda</i> | 44,2±17,7 | 82,5±10,9 | 6,6±4,1 | | |
| Tukey para extratos (3) | | <i>b</i> | <i>a</i> | <i>c</i> | -- | -- |

(1) Letras minúsculas na vertical mostram o teste de Tukey ($p < 0,05$) para as concentrações de 0 a 30%; (2) Letras maiúsculas na vertical mostram o teste de Tukey ($p < 0,05$) para as espécies *D. rariflora* e *D. floribunda*; (3) Letras itálicas e minúsculas na horizontal mostram o teste de Tukey ($p < 0,05$) para o extrato aquoso, etanólico e acetônico. Tratamentos seguidos da mesma letra não diferem entre si.

5.3 Concentração Letal Média dos extratos

A eficácia de uma substância é atribuída à concentração que pode controlar pelo menos 50% da população da praga (Castiglioni e Vendramin, 2003), de forma que quanto menor a CL_{50} , maior a toxicidade do composto (Gallo *et al.*, 1988).

O extrato aquoso e acetônico de *D. floribunda* não ocasionaram a mortalidade de 50% da população de ácaros, assim, por segurança, não foram calculadas as CL₅₀ para estes extratos, pois a precisão desta informação ficaria comprometida.

Nos demais casos, foram verificados que o extrato etanólico de *D. rariflora* apresentou a menor CL₅₀ (2%), não diferindo do extrato aquoso da mesma espécie (4,4%). O extrato aquoso de *D. rariflora* também não diferiu do extrato etanólico de *D. floribunda* (13,8%). A maior CL₅₀ foi observada no extrato acetônico de *D. rariflora* (26,6%), que diferiu de todas as demais concentrações (Tabela 3). Valores abaixo destes foi verificado no extrato aquoso de *Derris elliptica* sobre *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) com uma CL₅₀ de 0,0037% (Worawong e Pimsamarm, 2005). Essa planta também foi tóxica para *Tetranychus truncatus* (Acari: Tetranychidae) com uma CL₅₀ de 3,69% (Wongthong e Pimsamarm, 2007).

Esses resultados confirmam que o extrato etanólico de *D. rariflora* foi o mais tóxico, seguido do extrato aquoso da mesma espécie botânica. Esse resultado é relevante uma vez que o etanol é um solvente de fácil aquisição, pois não se encaixa na lista dos produtos controlados pela polícia federal, como é o caso da acetona, que tem o uso restrito e sujeito ao controle e fiscalização (Presidência da República, Decreto nº 4.262 de 10 de Junho de 2002), além do mais, o etanol é um solvente de baixo custo quando comparado a outros solventes orgânicos. A eficiência dos extratos obtidos em meio aquoso também é de grande relevância, principalmente para os pequenos produtores rurais, uma vez que a água é um recurso de fácil acessibilidade, natural e menos oneroso (Hernández e Vendramin, 1997).

Tabela 3 - Concentração Letal Média dos extratos de timbó sobre *T. desertorum*.

| Extratos | CL ₅₀ | IC (95%) |
|--------------------------------|------------------|-----------|
| Etanólico <i>D. rariflora</i> | 2,0 a | 1,3- 2,9 |
| Aquoso <i>D. rariflora</i> | 4,4 ab | 1- 12,8 |
| Etanólico <i>D. floribunda</i> | 13,8 bc | 7,8- 24,7 |
| Acetônico <i>D. rariflora</i> | 26,6 c | 17-41,8 |
| Aquoso <i>D. floribunda</i> | — | — |
| Acetônico <i>D. floribunda</i> | — | — |

CL₅₀= Concentração Letal Mediana, IC= Intervalo de Confiança. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

5.4 Toxicidade da rotenona sobre *T. desertorum*

Para a metodologia adotada, sendo a rotenona considerada um produto de contato e ingestão (Mariconi, 1981), acredita-se que tenha entrado em contato com o organismo dos ácaros por estas vias. Assim, observou-se que nas primeiras 24 horas, os ácaros ficaram menos agitados, apresentaram tremor, principalmente nas pernas. Esses sintomas provavelmente estejam relacionados à inibição da cadeia respiratória mitocondrial, o que reduziu o consumo de oxigênio celular (Almeida, 2010). Porém, essa sintomatologia não chegou a causar mortalidade significativa. Nas horas seguintes, não foram observadas nenhuma anomalia.

Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas e o controle (Tabela 4), mostrando que a rotenona não foi tóxica para *T. desertorum*. Isso comprova que a toxicidade dos extratos de *D. rariflora* e *D. floribunda* realmente não estava relacionada a essa substância, mas sim com outras substâncias bioativas, já discutidas anteriormente.

Tabela 4- Mortalidade de *T. desertorum* sob diferentes concentrações de rotenona.

| Concentrações (%) | Mortalidade ** |
|-------------------|----------------|
| Controle | 0 a |
| 0,1 | 2,5 a |
| 0,5 | 2,5 a |
| 1 | 2,5 a |

** Números seguidos da mesma letra não difere entre si pelo teste de Tukey a 5%

De acordo com Casida (2002), uma das limitações para o comércio de produtos botânicos para o controle de pragas é a oferta de produtos com padrões adequados e eficácia de segurança. Muitos produtos a base de raízes de diferentes espécies de timbó estão sendo vendidos no comércio como rotenona. A autora relata que a análise de um produto vendido livremente no comércio como “rotenona”, revelou a presença de 11 estilbenos e mais 29 rotenóides, além de resíduos dos reagentes que foram utilizados para extração, porém o rótulo especificava a rotenona como sendo a principal substância ativa, sem ao menos referenciar-se aos outros componentes. Para Almeida (2010), erros de fabricação e a falta de informações na rotulagem de produtos a base de rotenona, como composição, dosagem, organismos alvos, data de validade, têm causado o uso inadequado do produto e ineficácia. Esse fato preocupante mostra que realmente existe uma necessidade de pesquisas que abranjam de forma detalhada os estudos fitoquímicos dos timbós, de forma a identificar seus componentes tóxicos nas diferentes espécies botânicas, bem como o efeito sobre organismos alvo, sobre o homem e meio ambiente.

Com exceção ao extrato aquoso e acetônico de *D. floribunda*, que não ocasionaram 50% de mortalidade dos ácaros, os demais extratos testados mostraram-se de um modo geral, promissores para o controle de *T. desertorum*, pois ocasionaram a mortalidade de 50% da

população, porém, sugere-se a realização de novas pesquisas, incluindo a descrição detalhada das substâncias bioativas que compõem essas espécies botânicas, bem como o efeito sobre *T. desertorum*, incluindo ação sinérgica.

Embora se trate de extratos vegetais, é importante ressaltar que o uso e manuseio de produtos a partir de timbó requerem alguns cuidados básicos, como a utilização de Equipamento de Proteção individual (EPI), pois os princípios ativos dos timbós podem ser absorvidos pela pele ou trato respiratório de mamíferos, podendo causar conjuntivite, faringite, dermatite, irritação gastrointestinal e pulmonar, náuseas e vômito (Costa *et al.*, 1999).

6 CONCLUSÃO

- O teor de rotenona foi de 4,5 e 4% para *D. floribunda* e 4,3 e 5% para *D. rariflora*, nos extratos acetônicos e etanólicos, respectivamente.
- O álcool etílico e a acetona foram os solventes mais eficientes na extração de rotenona;
- A espécie *D. rariflora* foi a mais tóxica para *T. desertorum*;
- O extrato etanólico apresentou maior toxicidade para o ácaro;
- As concentrações de 20 e 30% mostraram-se mais tóxicas sobre o ácaro;
- O extrato etanólico na concentração de 20% é o mais indicado para o controle de *T. desertorum*, com TL₅₀ de 32,5 horas.
- A CL₅₀ foi de 2 e 4,4% para o extrato etanólico e acetônico de *D. rariflora*, 13,8% para o extrato etanólico de *D. floribunda* e 26,6% para o extrato acetônico de *D. rariflora*.
- A rotenona não foi tóxica para *T. desertorum*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alécio, M. R. ; Alves, S. B. ; Gonzaga, A. D. ; Ribeiro, J. D. ; Correa, R. S. 2005. Avaliação do potencial inseticida in vitro do extrato aquoso de raízes de timbó (*Derris rariflora*) sobre *Sitophilus zeamais* Mots. In: I Jornada Amazonense de Plantas Medicinais, Manaus.
- Alécio, M. R. 2007. *Toxicidade do extrato de Derris amazonica Killip a adultos de Cerotoma arcuatus Olivier, 1791 (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA, Manaus, Amazonas. 55 pp.
- Alessandro, D. L. 2001. Tamanho da amostra e método de amostragem para avaliação de características do pimentão em estufa plástica. *Horticultura Brasileira*, 21 (2): 81.
- Almeida, M. N. 2010. Eficiência de um inseticida botânico no controle de ninfas de *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Controle Biológico*, 2: 17-21.
- Anese, S.; Wandscheer, A. C. D.; Martinazzo, E. G.; Pastorino, L. H. 2007. Atividade alelopática de *Ateleia glazioveana* Baill (timbó) sobre *Lactuca sativa* L. (alface). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5 (3): 147-149.
- Barbosa, L. R.; Carvalho, C. F. de; Souza, B.; Auad, A. M. 2008. Eficiência de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861)(Neuroptera: Chrysopidae) no controle de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em pimentão (*Capsicum annum* L.). *Ciênc. agrotec.* [online]. 32 (4): 1113-1119.
- Bassett, P. 1981. Observations on broad mite (*Polyphagotarsonemus latus*) (Acari: Tarsonemidae) attacking cucumber. *Crop Protection*, 1: 99-103.
- Bastos, 1981. *Principais pragas das culturas e seu controle*. São Paulo: Nobel. 223 pp.
- Betarbet R, Sherer T, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A, Greenamyre J. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3: 1301–1306.

- Bolland, H. R.; Gutierrez, L.; Fletchmann, C. H. W. 1998. *World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae)*. Brill: Leiden, 392 pp.
- Brito, H.M.; Gondimjr, M.G.C.; De Oliveira, J.V.; Da Câmara, C..A.G. 2006 Toxicidade de natuneem sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e ácaros predadores da família Phytoseiidae. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 30 (4): 685-691.
- Caboni, P.; Sarais, G.; Vargiu, S.; De Luca, M. A.; Garau, V. L.; Ibba, A.; Cabras, P. 2008. LC–MS–MS Determination of Rotenone, Deguelin, and Rotenolone in Human Serum. *Chromatographia*, 68 (9): 739-745.
- Caminha Filho, A. C. 1940. *Timbós e rotenona*. Rio de Janeiro. 14 pp.
- Cardoso, Antonio Ismael Inácio. 2007. Produção de pimentão com vibração das plantas. *Ciênc. agrotec.* [online]., 31 (4): 1061-1066.
- Carmo, S. A. *Conservação pós-colheita de pimentão amarelo amarelo "Zarco HS"*. 2004. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas-SP. 110 pp.
- Carvalho, T. M. B.; Reis, P. R.; Oliveira, D. F. O.; Carvalho, G. A.; Carvalho, D. A. 2008. Avaliação de extratos vegetais no controle de *Oligonychus ilicis* (McGREGOR, 1917) (Acari: Tetranychidae) em laboratório. *Coffee Science*, Lavras, 3 (2): 94-103.
- Casacchia, T.; Sofo, A.; Toscano, P.; Sebastianelli, L.; Perri, E. 2009. Persistence and effects of rotenone on oil quality in two Italian olive cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 214–219.
- Casida, J. E. 2002. Botanical insecticides: Reflections and perspectives. International Congress Biological products: Which guarantees for the consumers. Milan.
- Castagnoli, M.; Liguori, M.; Simoni, S.; Duso, C. 2005. Toxicity of some insecticides to *Tetranychus urticae*, *Neoseiulus californicus* and *Tydeus californicus*. *BioControl*, 12 (4): 611-622.
- Castiglioni, E. A. ; Vendramim, J. D. . 2003. Evaluación de repelencia de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae) a derivados de meliáceas. *Agrociencia*, Montevideú, 7 (1): 52-58.

- Cavoski, I.; Caboni, P.; Sarais, G.; Cabras, P.; Miano, T. 2007. Photodegradation of rotenone in soils under environmental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7069- 7074.
- Cavoski, I.; Caboni, P.; Sarais, G.; Miano, T. 2008. Degradation and persistence of rotenone in soils and influence of temperature variations. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 8066–8073.
- Cavoski, I.; D’Orazio, V.; Miano, T. 2009. Interactions between rotenone and humic acids by means of FT-IR and fluorescence spectroscopies. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395: 1145–1158.
- Corbett, C. E. 1940. *Plantas ictiotóxicas: farmacologia da rotenona*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 157 pp.
- Corrêa, R. S. 2006. *Toxicidade de Lonchocarpus floribundus Benth sobre Toxoptera citricidus (Sternorrhyncha: Aphididae)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, Manaus, Amazonas. 68 pp.
- Costa, J. P. C. 1996. *Efeito da variabilidade de timbós de diferentes regiões da Amazônia em Musca domestica L. (Diptera: Muscidae)*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias- UNESP, Campo de Jaboticabal- SP. 119 pp.
- Costa, J. P. C.; Alves, S. M.; Belo, M. 1999. Differences among Timbo (*Derris* spp., Fabaceae) species from different amazonian regions in the control of *Musca domestica* L. *Acta Amazonica*, 29(4): 573-583.
- Damasceno, M. R. A. 2008. *Ácaros associados a espécies vegetais cultivadas na região semi-árida de Minas Gerais, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Montes Claros- Unimontes, Janaúba, Minas Gerais. 131 pp.
- De Coss-romero, M.; Peña, J.E. 1998. Relationship of broad mite (Acari: Tarsonemidae) to host phenology and injury levels in *Capsicum annum*. *Florida Entomologist*, 81: 515-526.

- Dzenda, T.; Ayo, J.O.; Adelaiye, A.B.; Auda, A.O. 2008. Ethnomedical and veterinary uses of *Tephrosia vogelii* Hook F (Fabaceae): a review. *Australian Journal of Medical Herbalism*. 2 (20): 71-80.
- Echer, M. M.; Fernandes, M. C. A.; Ribeiro, R. L. D.; Peracchi, A. L. 2002. Avaliação de genótipos de *Capsicum* para resistência ao ácaro branco. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (2): 217-221.
- Ferla, N. J.; Botton, M. Ocorrência do ácaro vermelho europeu *Panonychus ulmi* (Koch) (Tetranychidae). 2008. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38 (6): 1758-1761.
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge: M. Pres. 333 pp.
- Firmino, C. A. 1998. *Estudo Fitoquímico das Raízes de Lonchocarpus Campestris*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 121 pp.
- Flechtmann, C. H. W. 1967. Sobre alguns ácaros de plantas no Estado de São Paulo. *Boletim Técnico-Científico*. ESALQ. Piracicaba, (26):1– 44..
- Flechtmann, C. H. W. 1977. *Ácaros de importância agrícola*. São Paulo, Nobel. 189 pp.
- Flechtmann, C. H. W.; Bastos, J. A. M. 1972. Ácaros Tetranychoidae do Estado do Ceará, Brasil. *Ciência Agrônômica*, Fortaleza, 2 (2): 83-90,.
- Filgueira, A. R. F. 2000. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: UFV, 412 pp.
- Fonseca, A. F. A. da. 1986. Avaliação do comportamento de cultivares de pimentão (*Capsicum annum* L.) em Rondônia. Porto Velho: EMBRAPA. 6 pp.
- Gobbo-Neto L.; Lopes N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30: 374-381.
- Gonzaga, A. D.; Garcia, M. V. B.; Sousa, S. G. A.; Py-Daniel, V.; Corrêa, R. S.; Ribeiro, J. D. 2008. Toxicidade de Manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato

(*Palicourea margravii* St. Hil) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). *Acta Amazonica*, 38: 101-106.

Echer, M.M.; Fernandes, M.C.A.; Ribeiro, R.L.D.; Peracchi, A.L. 2002. Avaliação de genótipos de *Capsicum* para resistência ao ácaro branco. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (2): 217-221.

Gallo, D.; O. Nakano, S. S.; Neto, R. P. L.; Carvalho, G. C.; Batista, E. B.; Filho, J. R. P.; Parra, R. A.; Zucchi, S. B.; Vendramim, J. D. 1988. *Manual de entomologia agrícola*. São Paulo: CERES. 649 pp.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Baptista, G. C.; Bert Filho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B.; Vendramin, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S.; Omoto. 2002. *Entomologia Agrícola. Piracicaba*: FEALQ. 920 pp.

Gama, A. S.; Lima, H. N.; LOPES, M. T. G.; Teixeira, W. G. 2008. Caracterização do modelo de cultivo protegido em Manaus com ênfase na produção de pimentão. *Horticultura Brasileira*, 26: 121-125.

Gerson, U. 1992. Biology and control of the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). *Experimental and Applied Acarology*, 13: 163-178.

Gonçalves, M.E.C.; Gonçalves, J.V.; Oliveira, R.; Torres, J.B. 2001. Effect of plant extracts on immature stages and adults females of *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae), *Neotrop. Entomol.* 30: 305–309.

Guedes, J. V. C.; Navia, D.; Lofego, A. C.; Dequech, S. T. B. 2007. Ácaros associados à cultura da soja no Rio Grande do Sul, Brasil. 2007. *Neotropical Entomology*, 36: 288-293.

Gui, L.; Gong, X.; Meng, G.; Gui, L.Y.; Gong, X.W.; Meng, G.L. 2001. On the relationship between eggplant leaf structure and its resistance to broad mite. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28: 213-217.

- Halfeld-Vieira, B. A.; Nechet, K. L.; Pereira, P. R. V. S.; Mourão Junior, M. 2005. Aspectos agronômicos de híbridos de pimentão em cultivo protegido em Roraima. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 1. Boa Vista: EMBRAPA: 15 pp.
- Heizer, R. F. 1987. Venenos de pesca in: Ribeiro Darcy (Ed.) Suma etnológica brasileira, Handbook of South American Indians. Rio de Janeiro: FINEP, 95-99.
- Helle, W.; Sabelis, M. W. 1985. *Spider mites: their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier, 405 pp.
- Henz G. P.; Costa, C. S. R.; Carvalho, S.; Banci, C. A. 2007. Negócio rentável. *Caderno Técnico da edição da Cultivar HF*, 42: 1-7.
- Hernández, C. R.; Vendramim, J. D. 1997. Avaliação de bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda*. *Rev. Agric.* 72: 305-318.
- Hien, P. P.; Gortnizka, H.; Kraemer, R. 2003. Rotenone- Potential and prospect for sustainable agriculture. *Omorince*, 11: 83-92.
- Homma, A. K. O. 2007. O timbó: expansão, declínio e novas possibilidades para agricultura orgânica. In: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Londrina, PR. Anais. Brasília, DF : SOBER. 20 pp.
- Jeppson, L. R.; Keifer, H. H.; BAKER, E. W. 1975. *Mites injurious to economic plants*. Berkeley: University of California Press. 614 pp.
- Kamal, M. A. 1988. *Toxicology and carcinogenesis studies of rotenone*. National Institutes of Health: Public Health Service. 159 pp.
- Kamal, R.; Mangla, M. 1993. In vivo and in vitro investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensi*. *J. Biosci.*, 18 (1): 93-101.
- Krantz, G.W. *A manual of acarology*. 1978. Corvallis: Oregon State University. 509 pp.

- Krieger, R. 2010. *Handbook of pesticide toxicology*. San Diego: Academic Press. 2000 pp.
- Malavolta, E. 1980. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. Piracicaba : Agronômica Ceres, 251 pp.
- Ker, J. C. 1997. Latossolo do Brasil: uma revisão. *Geonomos*, 5: 17-40.
- Laupattarakasem, P.; Houghton, P. J. Hoult, J. R. S.; Itharat, A. 2003. Uma avaliação da actividade relacionada com a inflamação de quatro plantas usadas na Tailândia para tratar a artrite. *J. Ethnopharmacol.*, 85: 207-215.
- Lima, R.R. 1987. *Informações sobre duas espécies de timbó: Derris urucu* (killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (killip et Smith) Macbride, *como plantas inseticidas*. Belém: EMBRAPA CPATU (documentos, 42). 23 pp.
- Ling, N. 2002. Rotenone a review of its toxicity and use for fisheries management. *Science for Conservation*. 40 pp.
- Lobato, M. P.; Souza, K. M. R. ; Tavares, J. I. ; Santos, A. S. ; Arruda, A. C. ; Silva, M. N. ; Guilhon, G. M. S. P. ; Arruda, M. S. P.; Santos, L. S. S. . 2009. Rotenóides das raízes de *Derris urucu*. In: 32^a R. A. da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza- CE.
- Lôbo, Livia T.; Silva, G. A; Ferreira, M.; Silva, M. N.; Santos, A. S; Arruda, A. C; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S.; Borges, R. S.; Arruda, M. S. P. 2009. Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. 20 (6): 077-1081.
- Lucini, T.; Scabeni, C.; Dedordi, C.; Hirose, E.; Shiomi, H. F. 2010. Efeito de extrato aquoso de *Capsicum baccatum* na mortalidade e oviposição de *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae). *Scientia Agraria*, 11(4): 354-358.
- Mariconi, F. A. M. 1981. *Inseticidas e seu emprego no combate às pragas: com uma introdução sobre o estudo dos insetos*. São Paulo: Nobel. 246 pp.

Mascaro, U. C. P.; Rodrigues, L. A.; Bastos, J. K.; Santos, E. Da Costa, P. P. C. 1998. Valores de DL50 em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derris* spp. e suas implicações ecotoxicológicas. *Pesq. Vet. Bras.* 18 (2): 53-56.

Marella M.; Seo, B.B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Greenamyre, J. T.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T. 2008. Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *Plos One* 3. United States of América, 3 (1): 14-33.

Medeiros, J.; Kanis, A. L. 2010. Avaliação do Efeito de polietilenoglicóis nenhuma Perfil de Extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. *Rev. bras. farmacogn.*, 20(5):796-802.

Meister, R.; Van Den Brink, P.J. 2000. The analysis of laboratory toxicity experiments. In: SPARKS, T. (Ed). *Statistics in ecotoxicology*. Wiley: Chichester , p. 99-118.

Morais G.T.; Flechtmann, C.N.W. 2008. *Manual de acarologia, acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil*. Ribeirão Preto: Holos. 288 pp.

Morais, L. A.S. 2009. Influências dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27: 4050-4063.

Mors, W. 1973. *Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos*. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, 26(7): 52-55.

Milusheva, E.; Baranyi, M.; Kittel, A.; Fekete, A.; Zelles, T.; Vizi, E. S.; Sperlág. 2008. Modulation of dopaminergic neurotransmission in rat striatum upon in vitro and in vivo diclofenac treatment. *J. Neurochem*, 105: 360–368.

Morais, L. A. S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hortic. bras.*, 27(2): 4050-4063.

Mourão, S. A.; Zanuncio, J. C.; Pallini Filho, A.; Guedes, R. N. C.; Camargos, A. B. C. 2004. Toxicidade de Extratos de nim (*Azadirachta indica*) acaro vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis* AO. *Pesq. agropec. bras.*, 39(8): 827-830.

Narongchai, P.; Narongchai, S.; Thampituk. 2005. The first fatal case of yam bean and rotenone toxicity in Thailand. *J Med Assoc.*, 88: 984-986.

Noronha, A. 2006. Biological aspects of *Tetranychus marianae* McGregor (Acari: Tetranychidae) reared on yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) leaves. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23 (2): 404-407.

Ott, K. C. 2006. Rotenone. A Brief Review of its Chemistry, Environmental Fate, and the Toxicity of Rotenone Formulations. Disponível em: [http:// www.newmexicotu.org/Rotenone%20summary.pdf](http://www.newmexicotu.org/Rotenone%20summary.pdf). Acesso em 12 de out. 2010.

Pallini, A.; Fadini, M. A. M.; Venzon, M.; Moraes, G. J.; Barros- Battesti, D. M. 2007. Demandas e perspectivas para a Acarologia no Brasil. *Neotropical Biology and Conservation*, 2 (3):169-175.

Peña, J.E.; Bullock, R.C. 1994. Effects of feeding of broad mite (Acari:Tarsonemidae) on vegetative plant growth. *Florida Entomologist*, 77(1): 180-184.

Pereira, B. L.; Souza, L. D.; Santos, C. V. 2009. Avaliação da estabilidade de agregado em Latossolo Amarelo Distrófico no CNPMF- EMBRAPA. In: Seminário de pós-graduação da UFRB. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,.

Pereira, J.R.; Famadas, K.M. 2004. Avaliação “in vitro” da eficiência do extrato da raiz do timbó (*Dahlstedtia pentaphylla*) (Leguminosae, papilionoidae, milletiedae) sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) na região do vale do Paraíba, são Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico*: São Paulo, 71 (4): 443-450.

Pinto, G. P. 1953. Contribuição ao estudo químico dos timbós. *Anais da Associação Brasileira de Química*. 12 (4): 173-173.

Pontes, W. J. T.; Oliveira, J. C. G.; Câmara, C. A. G.; Lopes, A. C. H. R.; Gondin Junior, M. G. C.; Oliveira, J. V. ; Barros, R.; Schwartz, M. O. E. 2007. Chemical composition and

acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amaz.*[online], 37 (1): 103-109.

Potenza, M. R.; Takematsu, A. P.; Jocys, T.; Felicio, J. D. F.; Rossi, M. H.; Nakaoka-Sakita, M. 2005. Avaliação acaricida de produtos naturais para o controle do ácaro-vermelho do cafeeiro *Oligonychus ilicis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 72 (4): 499-503.

Presidência da República. 2002. Decreto nº 4.262, normas de controle e fiscalização sobre produtos químicos que direta ou indiretamente possam ser destinados à elaboração ilícita de substâncias entorpecentes, psicotrópicas ou que determinem dependência física ou psíquica, Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4262.htm> Acesso em: 25 de fevereiro de 2011.

Reifschneider, F.J.B. 2000. *Capsicum, pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília. Embrapa Hortaliças. 113 pp.

Reis, A.; Madeira, N. R. 2009. Diagnóstico dos principais problemas no cultivo de hortaliças no estado do Amazonas. *Circular técnica*. Brasília- DF. 12 pp.

Rivero, E.; Vásquez, C. 2009. Biologia e tabela de vida de *Tetranychus desertorum* (Acari: Tetranychidae) sobre folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Zoologia*, 26 (1): 38-42.

Robertson, D.R. y W.F. Smith-Vaniz. 2008. Rotenone: an essential but demonized tool for assessing marine fish diversity. *Bioscience*, 58(2): 165-170.

Rocha, A. I.; Goghbi, M. G. B. Isoflavonas de uma espécie do gênero *Derris*. *Acta Amazonica*, 12(3): 615-618.

Rodrigues I. N.; Lopes M. T.; Lopes R; Gama A.S.; Rodrigues M. R. 2007. Produção e qualidade de frutos de híbridos de pimentão (*Capsicum annuum*) em ambiente protegido em Manaus-AM. *Acta Amazônica*, 37: 491-496.

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

Roggia, S.; Guedes, J. V. C.; Kuss, R. C. R.; Arnemann, J. A.; Navia, D. 2008. Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (43): 295-301.

Roobakkumar, A.; Subramaniam, M. S.; R. ^a; Babu, A.; Muraleedharan, N. 2010. Bioefficacy of certain plant extracts against the red spider mite, *Oligonychus coffeae* (Nietner) (Acarina: Tetranychidae) infesting tea in Tamil Nadu, India. *International Journal of Acarology*, 36(3): 255-258.

Saito, M.; Luchini, F. 1998. *Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguras ao meio ambiente*. Embrapa-Meio Ambiente, Jaguariúna, Brasil, 46pp.

Santos, S. P. 2002. *A química dos inseticidas, parte II*. Lisboa: Edições CECUL, 86 pp.

Silva, M. F., Lisbôa, P. L. B., Lisbôa, R. C. L. 1977. *Nomes vulgares de Plantas Amazônicas*. INPA, Manaus. 222 pp.

Silva, W. G.; Tucci, C. A. F.; Hara, F. A. S.; Santos, R. A. C. 2007. Efeito de micronutrientes sobre o crescimento de mudas de mogno (*Swietenia Macrophylla* King) em Latossolo amarelo. *Acta Amaz.*, 37(3): 71-376.

Scudeller, V. V.; Ramos, R. A.; Cruz, M. E. G. 2009. Flora fanerogâmica da floresta de terra firme na RDS Tupé. *Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central*. Manaus: Edições UEA. 120 pp.

Solano, F. A. R.; Lopes Junior, M. L.; Rodrigues, M. S.; Tavares, J. L.; Santos, L. S.; Ripardo Filho, H. S.; Lobato, M. P.; Souza, K. M. R.; Trindade, N. S.; Arruda, M. S. P.; Guilhon, G. M. S. P. 2008. Rotenóides isolados da espécie *Derris urucu*. 48º Congresso Brasileiro de Química. Rio de Janeiro- RJ.

- Souza, J. L. 2003. *Manual de horticultura orgânica*. Viçosa: Aprenda Fácil. 564 pp.
- Souza, R. J. de; Nannetti, D. C. 1998. A cultura do pimentão (*Capsicum annuum L.*). Lavras: UFLA. *Boletim técnico*. 49 pp.
- Sumera, F. C.; Conat, M. 2006. Ichthyotoxicity and Rotenone Stability of *Derris trifoliata* Acetone Formulations. *Asian Fisheries Science*, 19: 363 – 375.
- Teixeira, D. F. 2003. Estudo químico e avaliação biológica de *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng. (urucuri) e *Pterodon emarginatus* Vog. (Sucupira-branca) em *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 154 pp.
- Tozzi, A. M. G. A. 1989. Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus Kunth* e *Deguelia Aubl* no Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 341 pp.
- Tozzi, A. M. G. A. 1998. A identidade do Timbó-verdadeiro: *Deguelia utilis* (A.C.Sm.) (Leguminosae -- Papilionoideae). *Rev. Bras. Biol.* [online], 58 (3): 511-516.
- Tozzi, A. M. G. A. 2010. *Derris* in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em 02 de dez. 2010. Disponível em : <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB083047>.
- Tucci, C. A. F.; Lima, H. N.; Gama, A. S.; Costa, H. S.; Souza, P. A. 2010. Efeitos de doses crescentes de calcário em solo Latossolo Amarelo na produção de mudas de pau-debalsa (*Ochroma lagopus sw.*, bombacaceae). *Acta Amaz.*, 40(3): 543-548.
- Vacante V. 2010. *Citrus Mites*. Wallingford: CABI Publishing, 378 pp.
- Thacker J. R. M. 2002. *A introduction to arthropod pest control*. Cambridge, Cambridge University Press, 343 pp.
- Vasconcelos, G. J. N.; Moraes, G. J. 2009. Ácaros predadores e fitófagos em cultivo de pimentão na região de Manaus. XI Simpósio de Controle Biológico. Bento Gonçalves- RS.

- Vasconcelos, J. N.; Lima, J. Q.; Gomes, T. L.; Oliveira, M. C. F.; Almeida, M. M. B.; Neto- Andrade, M.; Mafezoli, J.; Arriaga, A. M. C. 2009. Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. *Revista Química Nova*, São Paulo: Instituto de Química, 32(2): 382-386.
- Vieira, M. R.; Sacramento, L. V. S.; Furlan, L. O.; Figueira, J. C.; Rocha, A. B. O. 2006. Efeito acaricida de extratos vegetais sobre fêmeas de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, 8 (4): 210-217.
- Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Andrei, C. C. 2004. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O.; Schenkel, E. P.; GOsmann, G.; Mello, J. C. P; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004 pp.
- Vieira, R. F. 1999. Parâmetros microbiológicos indicadores do efeito do diuron sobre a microflora do solo. *Pesq. Agrope.bras*, 34(5): 897-902.
- Villalobos, R.; Marmillod, D.; Ocampo, R.; Mora, G.; Rojas, C. 1999. Variations in the quassin and neoquassin content in *Quassia amara* (Simaroubaceae) in Costa Rica: ecological and management implications. *Acta Horticulturae*, Holanda, 502: 369-376.
- Zubairi, S. I.; Sarmidi, M. R.; Aziz, R. A.; Latip, R.; Said. J. 2004. The effect of rotenone crude extract from *Derris elliptica* on the larvicidal activity (mortality) of mosquito. *Simposium Biologi Kebangsaan*. Awana Genting Highlands Resort: Pahang.
- Zubairi, S. I.; Ramli, M. K. A.; Majid, F. A. A.; Sarmidi, M. R.; Aziz, R. A. 2005. Biological screening on the extract of *Derris elliptica* (Tuba). In: *Kustem 4th Annual Seminar on Sustainability Science and Management*. Primula Beach Resort: Terengganu.
- Zhang, Z.-Q. 2003. *Mites of greenhouses: identification, biology and control*. Wallingford: CABI Publishing. 244 pp.
- Wongthong, P.; Pimsamarn, S. 2007. Toxicity of *Derris elliptica* Benth Extracts on *Tetranychus truncatus* Ehara. *Agricultural Sci. J*, 38(6): 75-78.

Worawong, K. and Pimsamarn, S., 2005, Effectiveness of Phytochemical Extracts Against Broad Mite *Polyphagotarsonemus latus* Banks Control. In Biopesticides: Phytochemicals and Natural Products for the Progress of Mankind, Proceedings International Conference on Biopesticides, Chang Mai: Thailand, 17-19.