

BRUNA FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO ARATICUM DO CERRADO CONTRA A
TRAÇA DA COUVE E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS**

TANGARÁ DA SERRA/MT - BRASIL

2025

BRUNA FERREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO ARATICUM DO CERRADO CONTRA A
TRAÇA DA COUVE E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ambiente e Sistemas de Produção Agrícola para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Josene Barbosa Pereira

Co-orientadora: Profa. Dra. Hileia dos Santos Barroso

TANGARÁ DA SERRA/MT.

2025

Ficha catalográfica elaborada pela Supervisão de Bibliotecas da UNEMAT
Catalogação de Publicação na Fonte. UNEMAT - Unidade padrão

L732a Lima, Bruna Ferreira.

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO ARATICUM DO CERRADO CONTRA A
TRAÇA DA COUVE E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS / Bruna
Ferreira Lima. - Tangará da Serra, 2025.

48f.: il.

Universidade do Estado de Mato Grosso "Carlos Alberto Reyes
Maldonado", Ambiente e Sistemas de Produção Agrícola/TGA-PPGASP
- TANGARA DA SERRA - Mestrado Academico, Campus Universitário De
Tangará Da Serra "Eugênio Carlos Stieler".

Orientador: Profa. Dra. Mônica Josene Barbosa Pereira.

1. Annona coriacea. 2. acetogeninas. 3. bioativos. 4.
ressonância magnética. 5. espectrometria de massas. I. Pereira,
Profa. Dra. Mônica Josene Barbosa. II. Título.

UNEMAT / MTSCB

CDU 581.9

BRUNA FERREIRA LIMA

**“AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO ARATICUM DO CERRADO CONTRA A
TRAÇA DA COUVE E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS”**

Dissertação apresentada à
Universidade do Estado de Mato
Grosso, como parte das exigências
do Programa de Pós-graduação
Stricto Sensu em Ambiente e
sistemas de Produção Agrícola para
obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 20 de junho de 2025.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **MONICA JOSENE BARBOSA PEREIRA**
Data: 25/06/2025 21:31:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof(a). Dr(a). Mônica Josene Barbosa Pereira (Orientadora) Universidade do
Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Documento assinado digitalmente
 **HILTON MARCELO DE LIMA SOUZA**
Data: 30/06/2025 10:31:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Hilton Marcelo de Lima Souza (interno) Universidade do
Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Documento assinado digitalmente
 **KARLOS ANTONIO LISBOA RIBEIRO JUNIOR**
Data: 28/06/2025 20:37:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Karlos Antonio Lisboa Ribeiro Júnior (externo)
Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Documento assinado digitalmente
 **ANELIZE BAUERMEISTER**
Data: 27/06/2025 09:53:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Anelize Bauermeister (externo) Universidade de São
Paulo - USP

TANGARÁ DA SERRA/MT – BRASIL

2025

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Lohayne Camila Paro Santos,
que demonstrou incansável apoio e presença constante durante este percurso.

Ao meu falecido pai, Izac dos Santos Lima,
e minha mãe, Nilza Ferreira Lima, por sua orientação e incentivo,
assim como aos meus irmãos, que sempre se mostraram pilares de força e
inspiração, propiciando-me o caminho para a realização de meus sonhos. **Dedico.**

À Dra. Mônica Josene Barbosa Pereira, minha
orientadora, que confiou em minha capacidade desde o início. A abertura de sua
equipe ao meu aprendizado e o compartilhamento de seu vasto conhecimento
científico foram fundamentais para minha trajetória neste projeto. **Ofereço.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos e apoio nos momentos difíceis. À Universidade do Estado de Mato Grosso, pela infraestrutura e suporte na realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Mônica Josene Barbosa Pereira, pela orientação, confiança e motivação, sendo uma inspiração profissional. Aos professores e à coordenação do PPGASP, pelos ensinamentos, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Massuo Jorge Kato, pelas orientações fundamentais e confiança. À minha esposa, Lohayne Camila Paro, pelo amor e paciência. Aos meus pais, Nilza Ferreira Lima, Izac dos Santos Lima (*in memoriam*), e Joel Felipe dos Santos, pelo incentivo.

Aos meus irmãos e amigos, pelo apoio e amizade. Aos colegas do laboratório de Entomologia, pela colaboração, e aos bolsistas Marco Antônio Nunes de Oliveira e Júlia Vitória, pela ajuda.

Às Dras. Hiléia dos Santos Barroso e Marilza da Silva Costa, pelas valiosas contribuições. Ao colega Robson Aparecido dos Santos, pelo apoio e amizade, e a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho científico, manifesto minha profunda gratidão.

Também quero expressar meu profundo agradecimento ao grupo AMAGGI por ceder a área para coleta.

Muito Obrigada!

“O saber se adquire com o estudo, mas o conhecimento se constrói com a experiência.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

Introdução	18
Experimentação.....	21
Criação de <i>Plutella xylostella</i>	21
Obtenção das sementes de <i>Annona coriacea</i>	22
Obtenção do extrato metanólico	23
Fracionamento do extrato metanólico	23
Bioensaios	24
Fracionamentos	24
Análise Cromatografia em Camada Delgada(CCD).....	28
Identificação dos compostos	29
Determinação da concentração letal (CL).....	31
Análise estatística	31
Resultados.....	31
Bioensaios	31
Concentrações Letais (CL ₃₀ , CL ₅₀ e CL ₉₀).....	37
Identificação dos compostos por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e Espectrometria de massas (EM)	38
Discussão	42
Conclusões.....	44
Referências Bibliográficas	45

ARTIGO

Avaliação da Bioatividade do Araticum do Cerrado Contra a Traça da Couve e Identificação de Acetogenina

Evaluation of the Bioactivity of Cerrado Araticum Against the Cabbage Moth and Identification of Acetogenin

[Revista Virtual de Química]

Resumo

A traça da couve, *Plutella xylostella* L. (1758), é considerada a principal praga das crucíferas. A ampla distribuição e capacidade de adaptação desta praga torna o manejo um grande desafio, contudo, compostos extraídos de plantas podem ser uma alternativa viável para o combate a este inseto. Espécies da família Annonaceae destacam-se pela produção de metabólitos secundários, como as acetogeninas, que são bioativos eficazes no controle de pragas. Algumas acetogeninas já foram descritas para o araticum do cerrado (*Annona coriacea* Mart), porém, a identificação destas moléculas ainda é limitada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade de *A. coriacea* no controle da *P. xylostella* e identificar os compostos com potencial inseticida desta espécie. O processo de identificação dos compostos foi realizado com bioensaio guiado sob lagartas neonatas. O extrato bruto metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido, obtendo-se partições de hexano (ACH), diclorometano (ACD) e hidrometanólica (ACMA). A partição ACD apresentou resultados positivos na mortalidade de lagartas nos bioensaios, por isso, foi fracionada por cromatografia em coluna de vidro e sílica. As frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) com diferentes eluentes e submetidas aos bioensaios. A fração ACD15F8F9 apresentou 100% de mortalidade larval, sendo submetida a análise por Ressonância Magnética de Hidrogênio (RMN ^1H). Foram identificados sinais da subunidade γ -lactona α,β -insaturada, característica das acetogeninas. A espectrometria de massas reforçou essas indicações e, embora a presença de rolliniastatina-1 não possa ser confirmada definitivamente por não ter sido isolada, os resultados sugerem essa possibilidade. Assim, o araticum do cerrado contém acetogeninas com alto potencial inseticida contra a traça-da-couve.

Palavras-chave: *Annona coriacea*, acetogeninas, bioativos, ressonância magnética, espectrometria de massas.

Abstract

The cabbage moth, *Plutella xylostella* L. (1758), is considered the main pest of cruciferous crops. The wide distribution and adaptability of this pest make its management a major challenge; however, plant-derived compounds may represent a viable alternative for controlling this insect. Species of the Annonaceae family stand out for producing secondary metabolites, such as acetogenins, which are bioactive and effective in pest control. Some acetogenins have already been reported for the “araticum do cerrado” (*Annona coriacea* Mart.), but the identification of these molecules is still limited. Therefore, the aim of this study was to evaluate the bioactivity of *A. coriacea* in controlling *P. xylostella* and to identify compounds with insecticidal potential from this species. The compound identification process was carried out through bioassay-guided fractionation using neonate larvae. The crude methanolic extract was fractionated by liquid–liquid partitioning, yielding hexane (ACH), dichloromethane (ACD), and hydromethanolic (ACMA) fractions. The ACD fraction showed positive results in larval mortality in the bioassays and was therefore fractionated by glass column chromatography with silica. The fractions were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) with different eluents and subjected to bioassays. Fraction ACD15F8F9 showed 100% larval mortality and was subjected to proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) analysis. Signals of the α,β -unsaturated γ -lactone subunit, characteristic of acetogenins, were identified. Mass spectrometry reinforced these indications, and although the presence of rolliniastatin-1 cannot be definitively confirmed because it was not isolated, the results suggest this possibility. Thus, araticum from the cerrado contains acetogenins with high insecticidal potential against the cabbage moth.

Keywords: *Annona coriacea*, acetogenins, bioinsecticide, magnetic resonance, mass spectrometry.

Introdução

Plutella xylostella L. (1758), pertencente à família Plutellidae e conhecida popularmente como traça-das-crucíferas ou traça da couve, é considerada a principal praga das brássicas, como couve, repolho e brócolis (Furlong *et al.*, 2013). A ampla distribuição e capacidade de adaptação tornam o manejo dessa praga um grande desafio. Um dos fatores que contribuem para sua persistência é a presença contínua de plantas hospedeiras em diferentes estágios de desenvolvimento na mesma área, o que garante alimento para o inseto ao longo de todo o ano (Celestino *et al.*, 2015).

Durante o estágio larval, *P. xylostella* alimenta-se intensamente das folhas das brássicas, provocando desfolhações severas que comprometem o crescimento e a qualidade comercial das plantas, em situações de alta infestação, os prejuízos podem atingir até 100% da produção (Couto *et al.*, 2016). As perdas globais ocasionadas por essa praga são estimadas em até 1 bilhão de dólares por ano, segundo o Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR, 2016). Além dos danos diretos à lavoura, o custo com seu controle pode representar até 50% do valor total de produção (Chagas Filho *et al.*, 2010). O uso intenso de inseticidas químicos eleva esses custos e favorece o surgimento de populações resistentes, dificultando ainda mais o manejo (Carvalho *et al.*, 2010).

Deste modo, a busca por compostos extraídos de plantas se torna uma alternativa promissora para o controle de pragas agrícolas, destacando-se pela vantagem de serem biodegradáveis e menos prejudiciais ao meio ambiente em comparação aos inseticidas químicos convencionais (Couto *et al.*, 2016).

A família Annonaceae, que inclui cerca de 130 gêneros e mais de 2.500 espécies, é uma fonte rica de compostos bioativos com potencial inseticida (Sauquet *et al.*, 2003). Do ponto de vista fitoquímico, esta família destaca-se pela produção de metabólitos secundários, incluindo polifenóis, alcalóides, flavonóides, terpenóides, terpenos, óleos essenciais e acetogeninas (ACGs) (Santos-Júnior *et al.*, 2016).

As acetogeninas derivam de ácidos graxos de cadeia longa (com 32 a 34 átomos de carbono), ligados a um grupo 2-propanol na posição C-2, resultando na formação de uma γ -lactona α - β -insaturada com substituição por metil (Neske *et al.*, 2020). Essas substâncias possuem diversas propriedades biológicas, incluindo efeitos antineoplásicos, antiparasitários, citotóxicos, imunossupressores, neurotóxicos e pesticidas (Sousa *et al.*, 2020).

Os inseticidas podem agir de diferentes formas, como por penetração através da cutícula (ação de contato), pela inalação do sistema traqueal (ação fumegante) ou por via oral, quando ingeridos pelos insetos após a movimentação do produto na planta. Esses inseticidas são classificados como sistêmicos (Gullan *et al.*, 2017).

Devido à composição química complexa dos inseticidas botânicos, eles podem afetar tanto o comportamento quanto os processos fisiológicos dos insetos, atuando por meio de diversos mecanismos (Lengai *et al.*, 2020).

Annona coriacea Mart., conhecida popularmente como araticum do Cerrado por estar amplamente distribuída no bioma Cerrado brasileiro (Costa *et al.*, 2017), apresenta, segundo a literatura científica, a presença das acetogeninas coriaciclodienina e coriacicloenina (Menezes *et al.*, 1997), além das coriapentocinas A e B e da bullacina (Alves, 2012). (Figura 1).

Coriaciclodienina e a coriacicloenina são notáveis por apresentarem uma estrutura terminal de lactona α,β -insaturada. Esta característica estrutural é comum entre as acetogeninas e desempenha um papel crucial em suas atividades biológicas (Menezes *et al.*, 1997). A principal distinção entre ambas reside no tipo de insaturação presente em suas estruturas. Coriaciclodienina é caracterizada pela presença de dois anéis de tetrahydrofurano (THF) conjugados, formando assim um sistema de ciclodieno. Em contraste, a coriacicloenina possui um sistema com uma única dupla ligação, classificado como cicloeno. Todavia, as substâncias se destacam por sua capacidade de inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Menezes *et al.*, 1997).



Figura 1. Acetogeninas (ACGs) identificadas para *A. coriacea*. 1. Coriaciclodienina, 2. Coriacicloenina, 3. Coriapentocina A, 4. Coriapentocina B, 5. Bullacina

Já, coriapentocinas A e B são diferenciadas por sua composição estrutural, contendo cinco grupos hidroxila ao longo da cadeia alifática. Esta característica confere a estas moléculas uma maior polaridade comparada a outras acetogeninas. A diferença entre os isômeros A e B é determinada pela posição ou estereoquímica dos grupos hidroxila. As coriapentocinas demonstram atividades inseticida e citotóxica que variam de moderadas a elevadas, tornando-as de interesse para pesquisas em controle de pragas (Alves, 2012). Por fim, a bullacina, se sobressai pela sua alta

bioatividade. A estrutura da bullacina é mais complexa e rígida, composta por dois anéis THF adjacentes e uma lactona terminal. Esta configuração estrutural pode estar correlacionada com sua potente atividade biológica (Alves, 2012).

Embora esses compostos tenham sido relatados para *A. coriacea*, há uma carência de estudos sobre a bioatividade deles contra a traça da couve. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade das sementes da *A. coriacea* no controle da *P. xylostella* e identificar os compostos com potencial inseticida, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo integrado de pragas.

Experimentação

Criação de *Plutella xylostella*

O estabelecimento da criação foi realizado utilizando metodologia adaptada de Barbosa (2019). No Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisas, Estudos e Desenvolvimento Agroambientais (CPEDA) da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), campus de Tangará da Serra, a população inicial foi composta por adultos de *P. xylostella* (Figura 2A), coletados em plantas de couve. As folhas de couve contendo as posturas (Figura 2B) foram transferidas para recipientes plásticos, iniciando-se, assim, um novo ciclo de criação. As lagartas (Figura 2C) foram mantidas em recipientes plásticos com capacidade para cinco litros. Cada recipiente possuía tampa com abertura de 15 cm de diâmetro, revestida com tecido fino (voil), garantindo ventilação adequada. As lagartas foram alimentadas diariamente com folhas de couve variedade manteiga, cultivadas em ambiente controlado, em casa de vegetação.

Ao atingirem a fase pupal (Figura 2D), foram transferidas para tubos de vidro, devidamente tamponados com algodão. Em seguida, as pupas foram levadas para a câmara de crescimento controlada (BOD), onde permaneceram até a emergência dos adultos. Os adultos emergentes foram alojados em uma gaiola de madeira, com as laterais de vidro, dentro da gaiola, foram colocadas folhas de couve para estimular a oviposição e essas folhas foram substituídas a cada dois dias, para garantir a qualidade do substrato de oviposição. Nesta fase foram alimentados com uma solução de mel e água, e mantidos em uma sala climatizada, com temperatura regulada a 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotoperíodo de 12:12 horas, e o ciclo de vida deste inseto é de 10 a 28 dias.

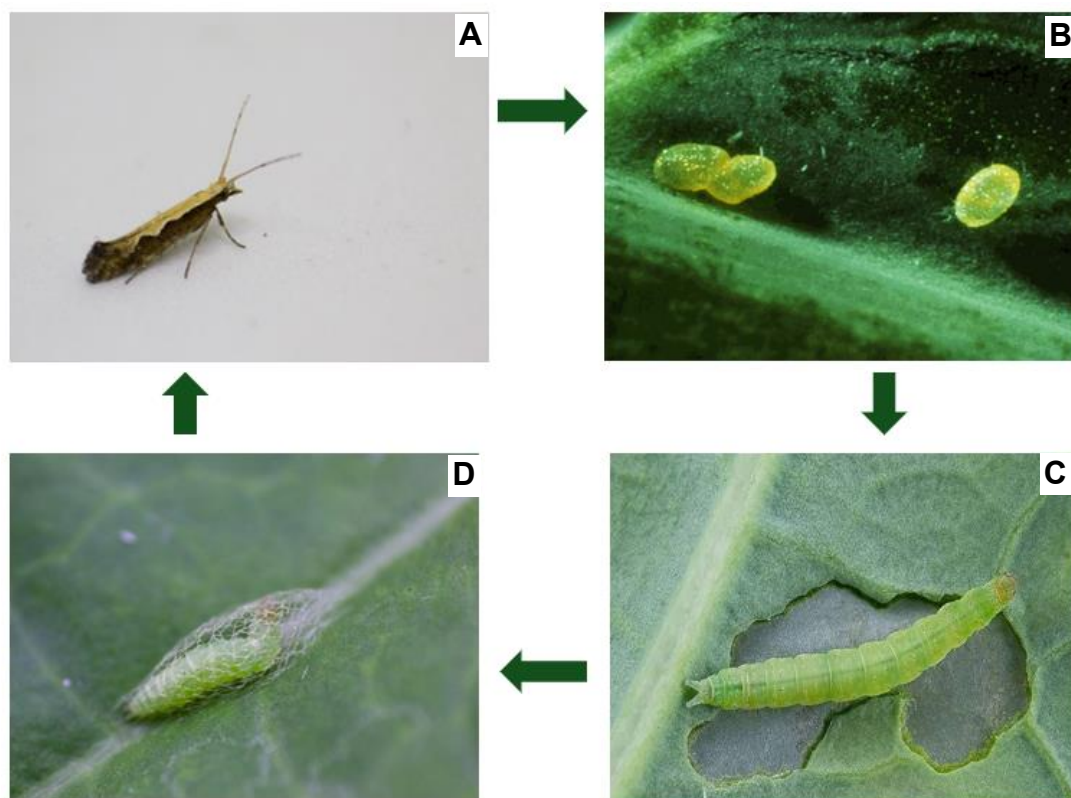


Figura 2. Ciclo de vida da *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). A. Adulto, B. Posturas. C. Lagarta, D. Pupa.

Obtenção das sementes de *Annona coriacea*

Os frutos de *A. coriacea* (Figura 3A) foram coletados em uma área de Cerrado, no município de Campo Novo do Parecis-MT (S 14°22.'53.5", W 058°02'05.6"), em novembro de 2023. No laboratório de Entomologia do CPEDA na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), os frutos foram despulpados e as sementes (Figura 3B) submetidas à secagem em estufa com circulação de ar na temperatura constante de 40°C por 72 horas. Uma vez secas, as sementes foram trituradas utilizando um moinho de facas macro tipo Willey, resultando em um pó fino (Figura 3C).



Figura 3. Coleta dos frutos em área de Cerrado, Campo Novo do Parecis-MT. A. Frutos em ponto de colheita, B. Sementes extraídas dos frutos, C. Pó fino originado das sementes.

Obtenção do extrato metanólico

O extrato metanólico foi obtido a partir da extração de 800 g de sementes em pó com 2 L de metanol e ficou macerando por um período de 72 horas. Após este período foi filtrado a vácuo, utilizando papel de filtro, funil de Büchner e kitassato. Foi concentrado em evaporador rotativo Rotavapor R-215 da Buchi, com o banho-maria a 40°C e rotação de 50 - 55 rpm, até a completa volatilização do solvente. Foram obtidos 240g de extrato bruto (30% rendimento). Para garantir a ausência de resíduos de solvente, o extrato foi cuidadosamente transferido para um frasco de vidro aferido e submetido ao fluxo de nitrogênio.

Fracionamento do extrato metanólico

Para a obtenção de informações precisas sobre os compostos constituintes do extrato metanólico (AC) realizou-se uma série de fracionamentos monitorados por bioensaio com lagartas neonatas de *P. xylostella*. O extrato AC foi particionado utilizando o método de extração líquido-líquido com solventes de polaridades crescente, hexano (polaridade 0,06) e diclorometano (polaridade 3,4).

Inicialmente, o extrato AC foi solubilizado em 1 L de uma solução hidroalcoólica (metanol:água) e extraído por três vezes, com 300 mL de hexano em funil de separação. As três extrações em hexano foram reunidas e concentradas. Posteriormente, o extrato hidroalcoólico foi também extraído com diclorometano, seguindo o mesmo procedimento da extração com hexano.

Após a remoção dos solventes em evaporador rotativo, resultaram três frações:

partição hexânica (ACH), partição diclorometânica (ACD) e partição hidrometanólica (ACMA), obtendo as massas de 47 g, 44 g e 30 g, respectivamente. A escolha de solventes de polaridades crescentes permitiu o fracionamento dos compostos presentes no extrato com base em sua polaridade.

Bioensaios

Em todos os bioensaios, foram utilizadas lagartas neonatas (1º ínstar) de *P. xylostella*. Utilizou-se discos de folha de couve, com 5 cm de diâmetro e cada disco foi imerso separadamente nas soluções de diferentes concentrações, por 30 segundos. Após breve secagem em temperatura ambiente, uma lagarta foi inoculada por disco, e estes, foram acondicionados em placas de Petri sob temperatura controlada a 26 ± 2 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas, conforme descrito por Ferreira *et al.* (2012). Os bioensaios foram avaliados a cada 24 e 48 horas após exposição, sendo contabilizado o número de lagartas mortas por tratamento.

Para extrato AC e partição ACH foram testadas as concentrações 40 mg. mL⁻¹, 20 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹ com 20 réplicas cada. Já os bioensaios das partições ACD e ACMA e seus fracionamentos, testou-se as concentrações de 20 mg.mL⁻¹ e 10 mg. mL⁻¹ com 10 réplicas cada. Para todos os bioensaios foram utilizados um controle positivo de dimetilsulfóxido (DMSO 2 %) e um controle negativo com água destilada.

Fracionamentos

Para caracterizar os principais compostos de *A. coriacea* com atividade sobre as lagartas, foram fracionadas as partições ACH e ACD do extrato AC. Todas as etapas do fracionamento foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e por bioensaios.

O fracionamento da partição hexânica (ACH) foi realizado em um sistema a vácuo, utilizando um kitassato e uma coluna de vidro com 13 centímetros de diâmetro e 10 centímetros de altura de sílica flash. 10 gramas da amostra ACH foram fracionadas utilizando como eluente a mistura dos solventes hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt) em diferentes gradientes dando origem a 14 frações (**Tabela 1**).

Tabela 1. Parâmetros utilizados no fracionamento da fração ACH, código e massas das frações obtidas.

Hexano (%)	AcOEt (%)	Volume	Códigos	Massa (g)
100	0	200 mL	ACHF1	0,015
95	5	250mL	ACHF2	0,0055
90	10	200 mL	ACHF3	0,0083
90	10	200 mL	ACHF4	0,0089
80	20	200 mL	ACHF5	0,0042
80	20	200 mL	ACHF6	0,0027
60	40	200 mL	ACHF7	0,9112
60	40	200 mL	ACHF8	2,9923
50	50	300 mL	ACHF9	2,4249
30	70	200 mL	ACHF10	0,9401
20	80	200 mL	ACHF11	0,3821
10	90	200 mL	ACHF12	0,3168
-	100	300 mL	ACHF13	0,8598
-	100	300 mL	ACHF14	0,1261

Para o fracionamento da partição diclorometânica (ACD), utilizou-se 10 g da amostra, utilizando um kitassato, coluna de vidro (13 cm de diâmetro), sílica flash e diferentes gradientes do solvente hexano e acetato como eluente. O fracionamento gerou 15 frações (**Tabela 2**).

Das 15 frações obtidas da coluna da amostra de ACD, apenas ACDF1, ACDF10 e ACDF15 foram subfracionadas. ACDF1 e ACDF10 foram fracionadas por cromatografia em coluna em um sistema manifold a vácuo, utilizando cartuchos de purificação contendo sílica HP-Sphere de 25 microns (SNAP ULTRA 10g, Biotage) e eluídas com diferentes solventes.

Tabela 2. Parâmetros utilizados no fracionamento da fração ACD, código e massas das frações obtidas.

Hexano (%)	AcOEt (%)	Volume	Códigos	Massa (g)
80	20	400 mL	ACDF1	0,2215
70	30	200 mL	ACDF2	0,0297
70	30	200 mL	ACDF3	0,0086
70	30	200 mL	ACDF4	0,0083
60	40	200 mL	ACDF5	0,0427
60	40	200 mL	ACDF6	0,2056
50	50	200 mL	ACDF7	0,3031
50	50	200 mL	ACDF8	0,2289
40	60	200 mL	ACDF9	0,1605
30	70	200 mL	ACDF10	0,1322
20	80	200 mL	ACDF11	0,1169
10	90	200 mL	ACDF12	0,1410
-	100	300 mL	ACDF13	0,5587
-	Acetona	300 mL	ACDF14	0,6606
-	MeOH	300 mL	ACDF15	5,6400

Para a amostra ACDF1, foi utilizada uma massa de 120 mg. O processo de eluição da coluna foi realizado com os solventes hexano e clorofórmio (CHCl_3), resultando na obtenção de 17 frações distintas, conforme apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Parâmetros utilizados no fracionamento da fração ACDF1, código e massas das frações obtidas.

Hexano (%)	CHCl_3 (%)	Volume	Códigos	Massa (g)
80	20	15 mL	ACDF1F1	0,0032
80	20	15 mL	ACDF1F2	0,0076
80	20	15 mL	ACDF1F3	0,0030
80	20	15 mL	ACDF1F4	0,0017
50	40	15 mL	ACDF1F5	0,0016
50	50	15 mL	ACDF1F6	0,0047
50	50	15 mL	ACDF1F7	0,0010
50	50	15 mL	ACDF1F8	0,0010
40	80	15 mL	ACDF1F9	0,0013
20	80	15 mL	ACDF1F10	0,0066
20	80	15 mL	ACDF1F11	0,0234
20	80	15 mL	ACDF1F12	0,0193
20	80	15 mL	ACDF1F13	0,0077
-	100	15 mL	ACDF1F14	0,0023
-	100	15 mL	ACDF1F15	0,0034
-	100 Acetato	15 mL	ACDF1F16	0,0060
-	100 Acetato	15 mL	ACDF1F17	0,0100

No caso da amostra ACDF10, empregou-se uma massa de 40 mg. A eluição da coluna foi conduzida utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt), o que resultou na obtenção de 16 frações, conforme detalhado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Parâmetros utilizados no fracionamento da fração ACDF10, código e massas das frações obtidas.

Hexano (%)	AcOEt (%)	Volume	Códigos	Massa (g)
100	-	15 mL	ACDF10F1	0,0020
90	10	15 mL	ACDF10F2	0,0005
90	10	15 mL	ACDF10F3	0,0014
80	20	15 mL	ACDF10F4	0,0028
80	20	15 mL	ACDF10F5	0,0058
80	20	15 mL	ACDF10F6	0,0052
80	20	15 mL	ACDF10F7	0,0062
70	30	15 mL	ACDF10F8	0,0057
70	30	15 mL	ACDF10F9	0,0082
10	10	15 mL	ACDF10F10	0,0082
10	10	15 mL	ACDF10F11	0,0120
10	10	15 mL	ACDF10F12	0,0060
30	70	15 mL	ACDF10F13	0,0046
30	70	15 mL	ACDF10F14	0,0060
-	100	15 mL	ACDF10F15	0,0035
-	100	15 mL	ACDF10F16	0,0002

A amostra ACDF15 foi processada em uma coluna de vidro utilizando sílica flash como meio estacionário. Foram aplicados diferentes gradientes de eluição com a mistura de hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt). Esse procedimento permitiu a aquisição de 5 g de massa, resultando em 30 frações, conforme demonstrado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Descrição dos parâmetros utilizados, o código e as massas das frações obtidas no fracionamento de ACDF15.

AcOEt (%)	MeOH (%)	Volume	Códigos	Massa (g)
100	-	350 mL	ACDF15F1	0,1036
95	5	70 mL	ACDF15F2	0,0645
95	5	100 mL	ACDF15F3	0,1669
95	5	100 mL	ACDF15F4	0,3446
95	5	100 mL	ACDF15F5	0,3707
95	5	100 mL	ACDF15F6	0,3855
95	5	100 mL	ACDF15F7	0,1885
95	5	100 mL	ACDF15F8	0,3197
95	5	100 mL	ACDF15F9	0,4759
95	5	100 mL	ACDF15F10	0,3784
95	5	100 mL	ACDF15F11	0,2173
95	5	100 mL	ACDF15F12	0,2157
95	5	100 mL	ACDF15F13	0,1794
95	5	100 mL	ACDF15F14	0,1479
95	5	100 mL	ACDF15F15	0,1510
95	5	100 mL	ACDF15F16	0,1117
95	5	100 mL	ACDF15F17	0,0975
95	5	100 mL	ACDF15F18	0,0935
95	5	100 mL	ACDF15F19	0,0734
95	5	100 mL	ACDF15F20	0,0508
95	5	100 mL	ACDF15F21	0,0391
95	5	100 mL	ACDF15F22	0,0565
95	5	100 mL	ACDF15F23	0,0406
95	5	100 mL	ACDF15F24	0,0636
93	7	100 mL	ACDF15F25	0,0593
90	10	100 mL	ACDF15F26	0,0492
90	10	100 mL	ACDF15F27	0,0394
90	10	100 mL	ACDF15F28	0,0471
50	50	200 mL	ACDF15F29	0,0456
-	100	200mL	ACDF15F30	0,1018

Com base nos resultados obtidos no bioensaio, as frações denominadas ACDF15F6 e ACDF15F8 foram submetidas a um processo de fracionamento com o objetivo de isolar e purificar seus constituintes ativos. Esse fracionamento foi realizado por meio de um sistema manifold a vácuo, que utilizou cartuchos de purificação. As

eluições foram feitas empregando gradientes de hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt).

Para a fração ACDF15F6, foram utilizados 200 mg do material. Através do processo de fracionamento, foram obtidas 38 subfrações que posteriormente foram reunidas, com base na semelhança apresentada na análise por cromatografia em camada delgada (CCD), além de considerações referentes à obtenção de uma maior massa de material, e como resultado, cinco subfrações foram finalmente isoladas (**Tabela 6**).

Em relação à fração ACDF15F8, o procedimento envolveu a utilização de 250 mg do material, este processo resultou em 23 subfrações iniciais. Assim como no caso anterior, as subfrações foram agrupadas de acordo com padrões de similaridade, observados na análise por CCD, e esse agrupamento, culminou na obtenção de seis subfrações finais, conforme apresentado na **Tabela 6**.

Tabela 6. Descrição dos parâmetros utilizados, o código e as massas das frações obtidas no fracionamento fração ACDF15F6 e ACDF15F8.

Amostras	Códigos	Massa obtida (mg)
ACDF15F6	ACDF15F6F18-23	7,5 mg
	ACDF15F6F24-25	7,3 mg
	ACDF15F6F27-28	17,3 mg
	ACDF15F6F29	8,6 mg
	ACDF15F6F34-38	11,3 mg
ACDF15F8	ACDF15F8F9	15 mg
	ACDF15F8F10	5,6 mg
	ACDF15F8F11-12	5 mg
	ACDF15F8F13-16	5 mg
	ACDF15F8F17-21	5,5 mg
	ACDF15F8F22-23	7,5 mg

Análise Cromatografia em Camada Delgada(CCD)

Na CCD, foram utilizadas cromatoplasas de alumínio revestidas com uma camada de 0,2 mm de sílica gel 60 F254 e luz UV, com comprimento de onda de 254 nm e 356 nm. Como a maioria dos constituintes não foram revelados em UV, utilizou-se a aplicação de uma solução de *p*-anisaldeído como revelador e uma chapa aquecedora para revelação dos compostos.

Identificação dos compostos

Para identificar os compostos bioativos presentes nas frações obtidas, realizou-se a análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) em um equipamento Bruker de 500 MHz, operando a uma temperatura de 24,8°C. As amostras foram preparadas em concentrações próximas, entre 3 e 7mg em 700 μL de clorofórmio deuterado, contendo tetrametilsilano (TMS), 0,05% (v/v) como padrão interno. As amostras foram acondicionadas em tubos de ressonância com diâmetro externo de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram referenciados em relação ao sinal do TMS e expressos em partes por milhão (ppm).

As constantes de acoplamento (J) foram obtidas em Hertz (Hz). Os resultados foram analisados utilizando o programa Mestrenova. A análise de espectrometria de massas foi realizada utilizando um espectrômetro de massas Bruker micrOTOF – QII, a interface ESI foi operada no modo positivo com 4,5 kV no capilar e 0,5 kV. A pressão do gás de ebulização foi de 0,4 Bar. O gás secante foi mantido com vazão de 4L/min a 200 °C. A voltagem dos cones do hexapolo e da câmara de colisão foram mantidos com 150 Vpp.

O processo completo, que abrange desde o tratamento do extrato bruto até a identificação final do composto, está delineado de maneira sequencial no fluxograma apresentado na **Figura 4**. Este fluxograma ilustra cada etapa do processamento, proporcionando uma visão clara e organizada do percurso metodológico adotado.

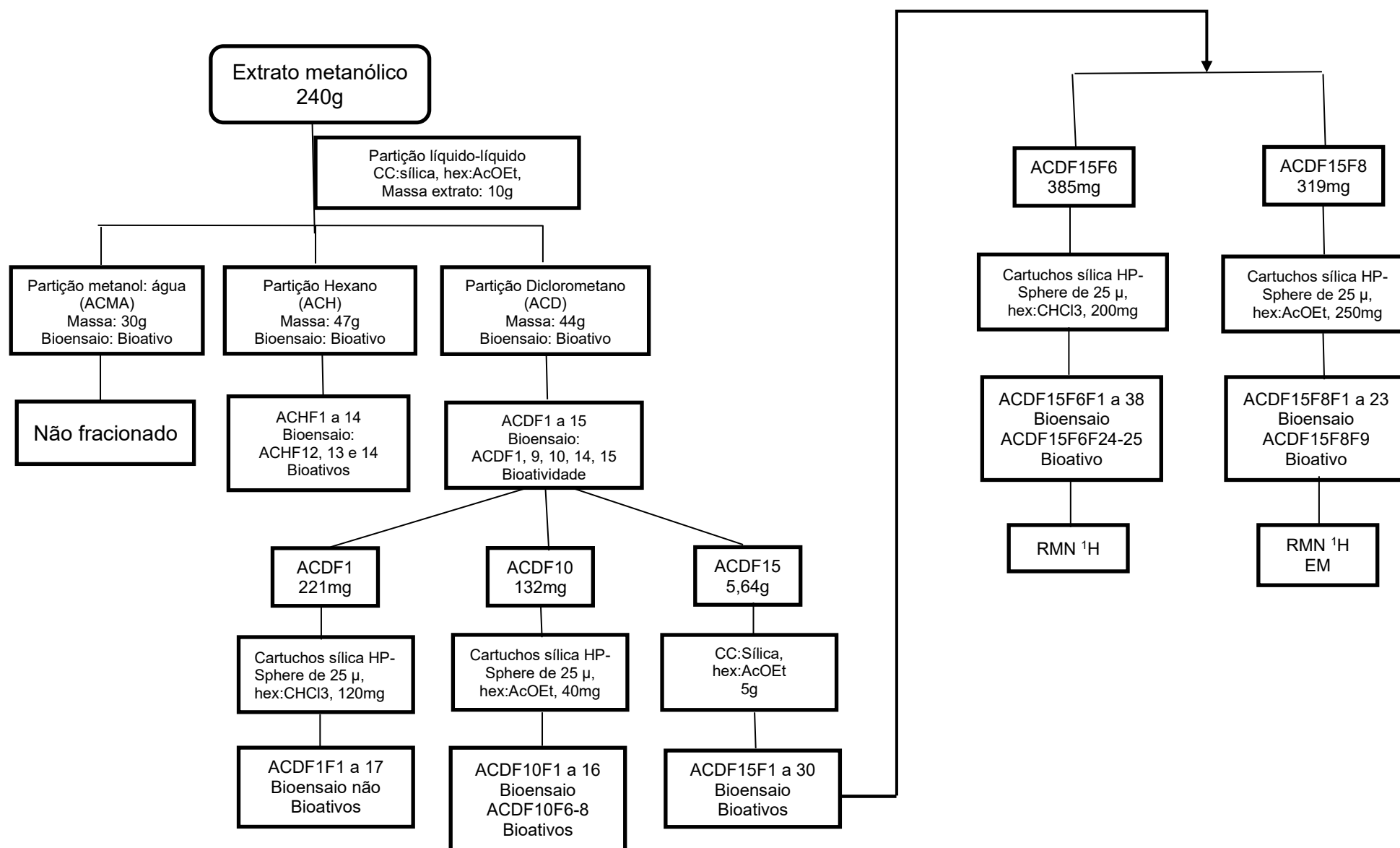


Figura 4. Fluxograma referente ao fracionamento do extrato metanólico de *Annona coriacea* guiada pela atividade biológica sobre *Plutela xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae).

Determinação da concentração letal (CL)

A curva dose-resposta do extrato metanólico, foi estabelecida utilizando três concentrações distintas: 40 mg.mL⁻¹, 20 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹. Para cada concentração, foram incluídos os controles positivo (DMSO a 2 %) e negativo (água destilada), garantindo a validade dos resultados. Cada concentração foi testada em 20 repetições. A metodologia utilizada para esta determinação seguiu o procedimento descrito no tópico 2.5.

A avaliação das concentrações letais (CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀) da partição diclorometânica, foi realizada utilizando as concentrações 20 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹, assim como no teste anterior, foram incluídos controles positivo e negativo. Cada concentração foi testada com 10 repetições, totalizando 40 amostras. A metodologia seguida para esta análise está detalhada no tópico 2.5.

Análise estatística

A mortalidade nas concentrações e controles foram avaliados utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição binomial. Os efeitos das concentrações experimentais e das horas de avaliação, bem como a interação entre as variáveis, foram testados sobre a variável resposta. As médias das concentrações/horas foram comparadas posteriormente utilizando o teste de Scott Knott, implementado no pacote ExpDes.pt (Ferreira, 2021). Os dados de concentrações letais (CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀) foram estimados por meio da análise de Probit. Todas as análises foram realizadas no software R Studio (R CORE TEAM, 2024).

Resultados

Bioensaios

No bioensaio com extrato metanólico (AC), avaliou-se a mortalidade de lagartas de *P. xylostella* expostas a diferentes concentrações do extrato metanólico, após 24 e 48 horas de aplicação. Os resultados comprovaram a bioatividade do extrato sobre as lagartas diferindo estatisticamente dos controles ($p < 0,001$) (**Tabela 7**). Nas concentrações de 40 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹, atingiram 100 % de mortalidade em 24

horas. Já a concentração de 10 mg.mL⁻¹ a mortalidade total ocorreu em 48 horas. A ausência de interação significativa entre concentração e tempo ($p=0,566$) indica que os efeitos observados são atribuíveis exclusivamente à concentração do extrato.

Tabela 7. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) submetida a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Annona coriacea* em 24 e 48 horas após a aplicação.

Concentrações	Mortalidade (n=20)	
	24 horas	48 horas
10 mg mL ⁻¹	17 Aa	20 Aa
20 mg mL ⁻¹	20 Aa	20 Aa
40 mg mL ⁻¹	20 Aa	20 Aa
DMSO	2 Ba	2 Ba
H ₂ O	0 Ca	0 Ca

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

No bioensaio da partição hexânica (ACH), as concentrações 20 mg.mL⁻¹ e 40 mg.mL⁻¹ de ACH diferiram significativamente da concentração 10 mg.mL⁻¹ e dos controles ($p<0,001$), com 100 % de mortalidade em no período de 24 horas. Já a concentração 10 mg.mL⁻¹ diferiu dos controles com mortalidade máxima de 80%, em 48 horas (**Tabela 8**). Não houve influência significativa do tempo e da interação tempo, versus tratamento ($p=1,000$).

Tabela 8. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) submetida a diferentes concentrações da partição ACH em 24 e 48 horas após a aplicação.

Concentrações	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
10 mg mL ⁻¹	8 Aa	8 Aa
20 mg mL ⁻¹	10 Aa	10 Aa
40 mg mL ⁻¹	10 Aa	10 Aa
DMSO	2 Ca	2 Ca
H ₂ O	0 Da	0 Da

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Na partição diclorometânica (ACD), em 24 horas, as concentrações testadas diferiram estatisticamente entre si ($p<0,001$). Neste período, a concentração de 20 mg mL⁻¹ causou 100% de mortalidade enquanto que a concentração de 10 mg mL⁻¹ ocasionou 40 % de letalidade. Já no período de 48 horas, as concentrações não apresentaram diferenças entre si (**Tabela 9**).

Tabela 9. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) submetida a diferentes concentrações da partição ACD em 24 e 48 horas após a aplicação.

Concentrações	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
10 mg mL ⁻¹	4 Bb	10 Aa
20 mg mL ⁻¹	10 Aa	10 Aa
DMSO	1 Ca	1 Ca
H ₂ O	0 Ca	0 Ca

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Para partição hidrometanólica (ACMA), as concentrações testadas não diferiram estatisticamente entre si nos períodos avaliados ($p < 0,001$) atingindo 100% de mortalidade em 48 horas, porém diferiram dos controles (**Tabela 10**).

Tabela 10. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) submetida a diferentes concentrações da partição ACMA em 24 e 48 horas após a aplicação.

Concentração	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
10 mg mL ⁻¹	6 Bb	10 Aa
20 mg mL ⁻¹	9 Aa	10 Aa
DMSO	3 Ca	3 Ca
H ₂ O	0 Da	0 Da

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

No bioensaio das frações de ACH, a fração denominada ACHF12 demonstrou uma eficácia significativa, atingindo 60% de mortalidade após 24 horas de exposição e aumentando para 90% após 48 horas. Este resultado foi estatisticamente distinto em comparação com as demais frações ($p < 0,001$). Por outro lado, as frações ACHF13 e ACHF14 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si ($p = 0,001$), embora tenham se diferenciado das outras frações e dos grupos controle. A taxa de mortalidade registrada para ACHF13 foi de 40%, enquanto para ACHF14 foi de 70%, após 48 horas de exposição, conforme ilustrado na **Tabela 11**.

Tabela 11. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) referente ao fracionamento da ACH em 24 e 48 horas após a aplicação.

Amostras	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
ACHF1-6	0 Da	2 Ca
ACHF7	1 Da	1 Da
ACHF8	0 Da	1 Ca
ACHF9	0 Da	1 Ca
ACHF10	2 Ca	2 Ca
ACHF11	0 Ca	2 Ca
ACHF12	6 Bb	9 Aa
ACHF13	3 Ca	4 Ba
ACHF14	2 Ca	7 Aa
DMSO	0 Da	0 Da
H ₂ O	0 Da	0 Da

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

No bioensaio realizado com frações de ACD, especificamente as frações designadas como ACDF1, ACDF9, ACDF10, ACDF14 e ACDF15, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre estas ($p < 0,001$). Todas essas frações resultaram em mortalidade total dos organismos testados dentro de um período de 48 horas. Em contraste, as outras frações analisadas apresentaram uma taxa de mortalidade que variou entre 60% e 90% após o mesmo período de exposição. Esses dados são apresentados na **Tabela 12**, evidenciando a eficácia variável das diferentes frações estudadas no bioensaio.

Tabela 12. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) referente ao fracionamento de ACD em 24 e 48 horas após a aplicação.

Amostras	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
ACDF1	9 Aa	9 Aa
ACDF7	4 Bb	6 Ba
ACDF8	5 Ba	6 Ba
ACDF9	10 Aa	10 Aa
ACDF10	9 Aa	10 Aa
ACDF11	7 Aa	7 Aa
ACDF12	1 Ca	9 Aa
ACDF13	7 Aa	7 Aa
ACDF14	10 Aa	10 Aa
ACDF15	10 Aa	10 Aa
DMSO	0 Ca	0 Ca
H ₂ O	0 Ca	0 Ca

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Durante o estudo, as frações que inicialmente apresentaram 100% de mortalidade foram submetidas a um novo processo de fracionamento para uma análise mais detalhada de suas propriedades bioativas. Nos subsequentes testes de mortalidade, verificou-se que as subfrações derivadas de ACDF1 não demonstraram qualquer atividade biológica relevante. Em contraste, as subfrações originadas de ACDF10 e ACDF15 exibiram bioatividade significativa.

Particularmente, dentro da subfração ACDF10, a amostra identificada como ACDF10F6-8 destacou-se por sua eficácia, alcançando 100% de mortalidade em apenas 24 horas, conforme ilustrado na **Tabela 13**. Este resultado sugere a presença de compostos bioativos potentes na referida subfração, justificando investigações adicionais para caracterização e potencial aplicação.

Tabela 13. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) referente ao subfracionamento da ACDF10 em 24 e 48 horas após a aplicação.

Amostras	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
ACDF10F1-4	0 Ba	0 Ba
ACDF10F5	0 Ba	0 Ba
ACDF10F6-8	10 Aa	10 Aa
ACDF10F9-10	0 Ba	0 Ba
ACDF10F11	0 Ba	0 Ba
ACDF10F12-13	0 Ba	0 Ba
ACDF10F14-16	0 Ba	0 Ba
DMSO	0 Ba	0 Ba
H ₂ O	0 Ba	0 Ba

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

No subfracionamento de ACDF15, 16 amostras (ACDF15F2, ACDF15F3, ACDF15F4, ACDF15F5, ACDF15F6, ACDF15F7, ACDF15F8, ACDF15F12, ACDF15F13, ACDF15F14, ACDF15F15, ACDF15F16, ACDF15F20-25, ACDF15F26-28, ACDF15F29, ACDF15F30), apresentaram mortalidade total das lagartas em 48 horas (**Tabela 14**) não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,001$). As demais amostras provocaram mortalidade variando de 40 a 90% no mesmo período de avaliação.

Tabela 14. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) referente ao subfracionamento da ACDF15 em 24 e 48 horas após a aplicação.

Amostras	Mortalidade (n=10)	
	24 horas	48 horas
ACDF15F1	1 Ba	7 Aa
ACDF15F2	8 Aa	10 Aa
ACDF15F3	2 Ba	10 Aa
ACDF15F4	9 Aa	10 Aa
ACDF15F5	9 Aa	10 Aa
ACDF15F6	8 Aa	10 Aa
ACDF15F7	8 Aa	10 Aa
ACDF15F8	9 Aa	10 Aa
ACDF15F9	7 Aa	7 Aa
ACDF15F10	1 Ba	8 Aa
ACDF15F11	1 Ba	4 Ba
ACDF15F12	7 Ab	10 Aa
ACDF15F13	8 Aa	10 Aa
ACDF15F14	8 Aa	10 Aa
ACDF15F15	5 Ab	10 Aa
ACDF15F16	1 Ba	10 Aa
ACDF15F17-19	7 Ab	9 Aa
ACDF15F20-25	7 Ab	10 Aa
ACDF15F26-28	7 Ab	10 Aa
ACDF15F29	8 Aa	10 Aa
ACDF15F30	9 Aa	10 Aa
DMSO	0 Ca	0 Ca
H ₂ O	0 Ca	0 Ca

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Da investigação com as 16 amostras, as denominadas ACDF15F6 e ACDF15F8 apresentaram massa superior em comparação às demais e em virtude dessa característica, essas duas amostras foram selecionadas para um procedimento adicional de fracionamento. Após o fracionamento, as subfrações resultantes foram submetidas a um bioensaio de mortalidade com o intuito de avaliar sua atividade inseticida. No caso específico da amostra ACDF15F6, o processo de fracionamento gerou várias subfrações, entre as quais a subfração rotulada como ACDF15F6F24-25 revelou uma atividade inseticida notável. Essa subfração demonstrou ser altamente eficaz, atingindo uma taxa de mortalidade de 100% em um período de 48 horas, conforme detalhado na **Tabela 15**.

Tabela 15. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) referente ao subfracionamento da ACDF15F6 em 24, 36 e 48 horas após a aplicação.

Amostras	Mortalidade (n=10)					
	24 horas		36 horas		48 horas	
ACDF15F6F18-23	0	Ca	0	Ca	0	Ca
ACDF15F6F24-25	0	Ca	5	Ba	10	Aa
ACDF15F6F27-28	0	Ca	0	Ca	0	Ca
ACDF15F6F29	0	Ca	0	Ca	0	Ca
ACDF15F6F34-38	0	Ca	0	Ca	0	Ca
DMSO	0	Ca	0	Ca	0	Ca
H ₂ O	0	Ca	0	Ca	0	Ca
Total	0		5		10	
Média	0		0,56		1,12	

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Para ACDF15F8, as subfrações identificadas como ACDF15F8F9 e ACDF15F8F17-21, demonstrou resultados significativos. Ao longo de 48 horas, essas subfrações exibiram taxas de mortalidade de 100% e 90%, respectivamente. Por outro lado, as demais subfrações submetidas à avaliação não apresentaram qualquer efeito letal sobre os insetos dentro do mesmo período. Os controles utilizados nos experimentos também não mostraram atividade inseticida, conforme indicado na **Tabela 16**.

Tabela 136. Mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) referente ao subfracionamento da ACDF15F8 em 24, 36 e 48 horas após a aplicação.

Amostras	Mortalidade (n=10)					
	24 horas		36 horas		48 horas	
ACDF15F8F9	0	Ca	5	Ba	10	Aa
ACDF15F8F10	0	Ca	0	Ca	0	Ca
ACDF15F8F11-12	0	Ca	0	Ca	0	Ca
ACDF15F8F13-16	0	Ca	0	Ca	0	Ca
ACDF15F8F17-21	0	Ca	5	Ba	9	Aa
ACDF15F8F18-23	0	Ca	0	Ca	0	Ca
DMSO	0	Ca	0	Ca	0	Ca
H ₂ O	0	Ca	0	Ca	0	Ca

* As letras maiúsculas iguais nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações e controles nas diferentes horas; as letras minúsculas iguais nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa entre as horas em cada tratamento. A significância estatística foi determinada considerando um valor de $p \leq 0,05$ no teste de Scott-Knott.

Concentrações Letais (CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀)

Os dados contidos na **Tabela 17** elucidam a bioatividade dos extratos de *A. coriacea* em lagartas de neonatas de *P. xylostella* após 48 horas de exposição. Esta

análise concentra-se nas concentrações letais médias, especificamente CL₃₀, CL₅₀ e CL₉₀, utilizadas para determinar a eficácia dos extratos.

O extrato metanólico apresentou uma CL₃₀ de 0,592 mg.mL⁻¹, CL₅₀ de 1,000 mg.mL⁻¹ e CL₉₀ de 3,602 mg.mL⁻¹. Esses resultados sugerem que, para atingir uma mortalidade de 90%, são necessárias concentrações significativamente mais elevadas, destacando uma eficácia limitada em concentrações mais baixas.

Em contraste, a partição diclorometano demonstrou um perfil de bioatividade mais homogêneo. Apesar de possuir uma CL₅₀ idêntica à do extrato metanólico, de 1,000 mg.mL⁻¹, a partição diclorometano exibiu uma CL₃₀ de 0,916 mg.mL⁻¹ e uma CL₉₀ de 1,238 mg.mL⁻¹. Estes dados indicam que a partição diclorometano é mais eficaz em concentrações elevadas, necessitando de menores dosagens para alcançar uma mortalidade de 90%, quando comparada ao extrato metanólico, o que revela um potencial de aplicação mais promissor.

Tabela 147. Concentração letal (CL) de extrato metanólico e da partição diclorometano de *A. coriacea* para 30 %, 50 % e 90 % da população de lagartas neonatas de *P. xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) após 48 horas de tratamento.

Tratamentos	Concentração Letal		
	CL ₃₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Extrato metanólico	0.592 mg mL ⁻¹	1.000 mg mL ⁻¹	3.602 mg mL ⁻¹
Partição diclorometânica	0.916 mg mL ⁻¹	1.000 mg mL ⁻¹	1.238 mg mL ⁻¹

Identificação dos compostos por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e Espectrometria de massas (EM)

A fração ACDF15F8F9 apresentou espectro com sinais em δ 7,19 ppm (q), δ 5,06 ppm(qq); δ 3,81 ppm(m); δ 3,43 ppm(m); δ 2,50 ppm(m); δ 2,40 ppm(m); δ 2,01 ppm(m) e δ 1,70(m) ppm; δ 1,48 ppm(m); δ 1,43 ppm(d); δ 1,26 ppm (m) e δ 0,88 ppm (t). Os seis sinais δ 7,19 ppm (q), δ 5,06 ppm(qq), δ 1,43 ppm(d), δ 3,81 ppm(m), δ 2,40 ppm(m) e δ 2,51ppm(m) são característicos do fragmento γ -metil α,β -insaturado γ -lactona com um grupo 4-OH presentes em estruturas das acetogeninas (Figuras 5-8). A espectrometria de massas mostrou sinal majoritário com íon molecular em m/z 623,4863 (Figura 9). Os resultados aqui obtidos podem ser confirmados com os achados de Pettit *et al.* (1987), que isolaram e identificaram a estrutura da Rolliniastatina-1 em *A. mucosa* (Tabela 18).

Tabela 18. Comparação da análise do espectro RMN ^1H da fração ACDF15F8F9 de *Annona coriacea* com a Rolliniastatina-1 (Pettit *et al.*, 1987).

Carbono	Fração ACDF15F8F9	Rolliniastatina-1
	$\delta^1 \text{H}$ (ppm) 500 MHz	$\delta^1 \text{H}$ (ppm) 400 MHz
1	-	-
2	-	-
3	H3a = 2,50 m; H3b = 2,40 m	H3a = 2,50 m; H3b = 2,36 m
4	3,43 m	3,85 m
5	1,48 m	1,45 m
6	1,26 m	1,25 m
7 a 12	1,26 m	1,25 m
13	1,26 m	1,25 m
14	1,48 m	1,50 m
15	3,43 m	3,38 m
16	3,81 m	3,85 m
17	1,7 e 2,0 m	1,70 e 1,90 m
18	1,7 e 2,0 m	1,70 e 1,90 m
19	3,81 m	3,85 m
20	3,81 m	3,85 m
21	1,7 e 2,0 m	1,70 e 1,90 m
22	1,7 e 2,0 m	1,70 e 1,90 m
23	3,81 m	3,85 m
24	3,43 m	3,85 m
25	1,48 m	1,45 m
26	1,26 m	1,25 m
27 a 31	1,26 m	1,25 m
32	1,26 m	1,25 m
33	1,26 m	1,25 m
34	0,88 t	0,85 t
35	7,19 q	7,16 q
36	5,06 qq	5,02 qq
37	1,43 d	1,41 d

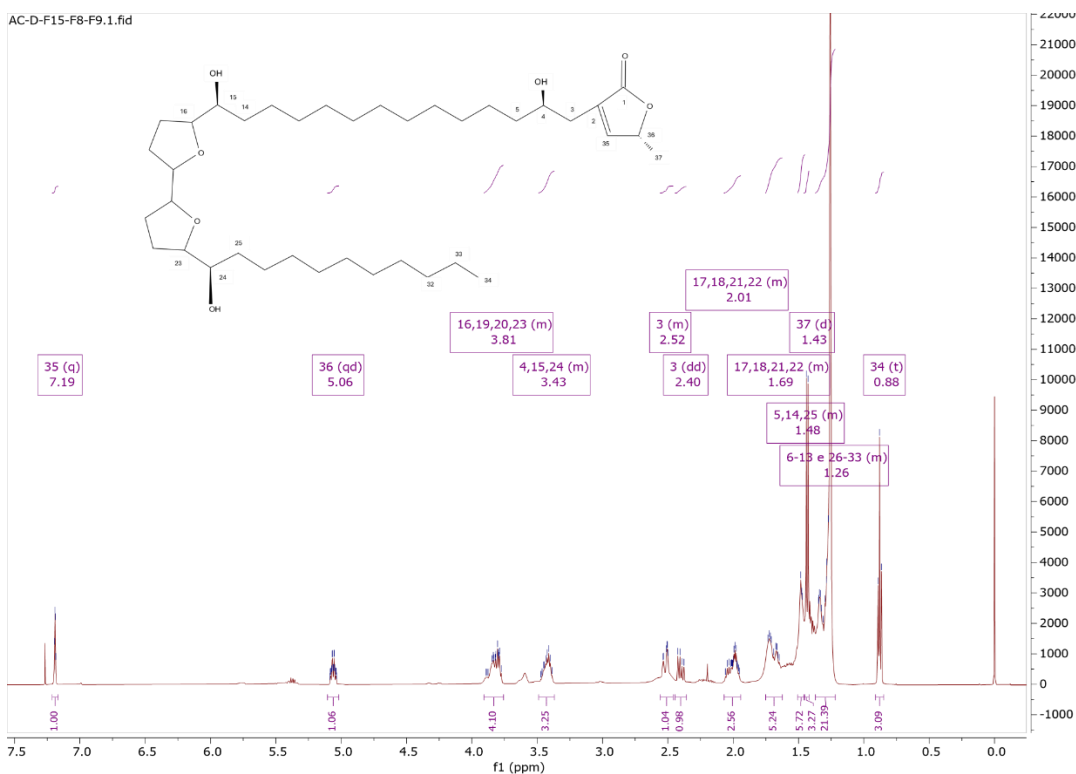


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H da fração ACDF15F8F9, 500 MHz, clorofórmio deuterado.

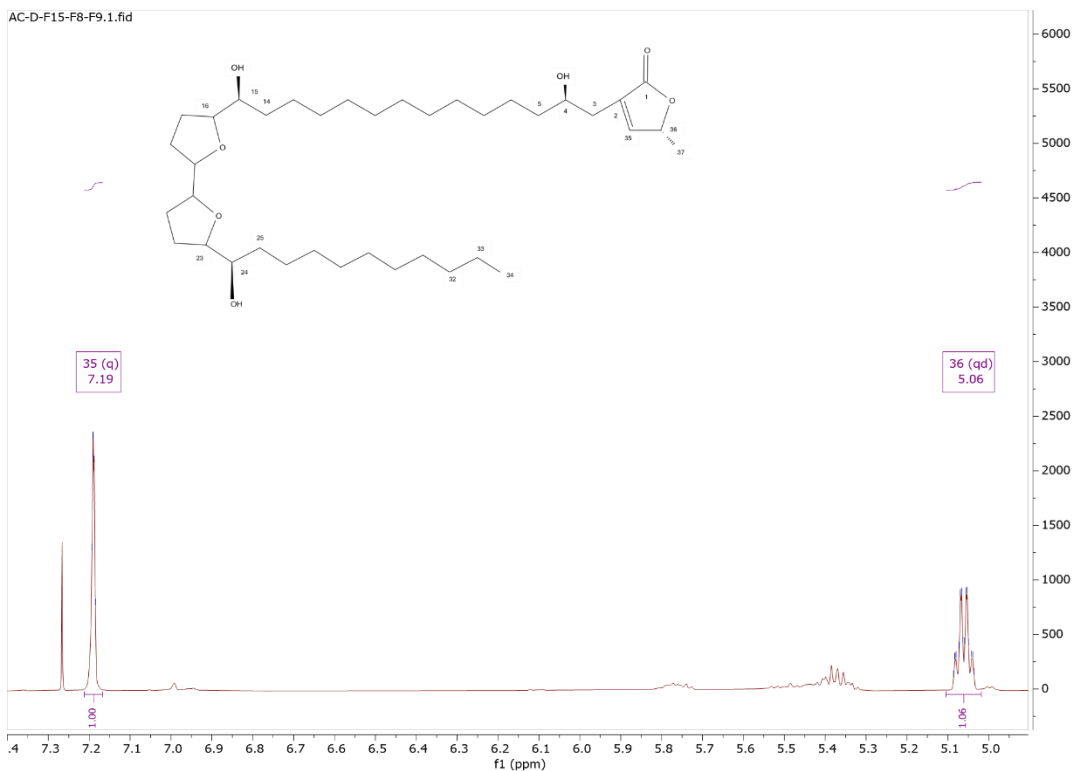


Figura 6. Expansão (7,4 a 4,9 ppm) do espectro de RMN de ^1H da fração ACDF15F8F9, 500 MHz, clorofórmio deuterado.

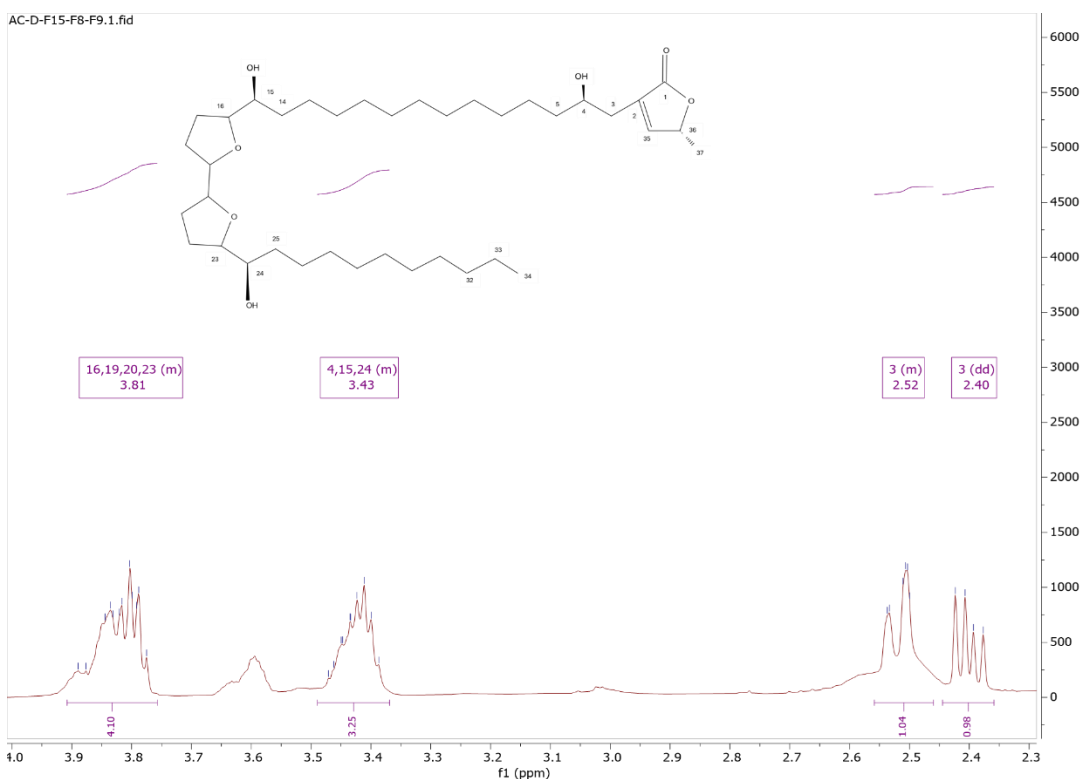


Figura 7. Expansão (4,0 a 2,3 ppm) do espectro de RMN de H1 de ACDF15F8F9, 500 MHz, clorofórmio deuterado.

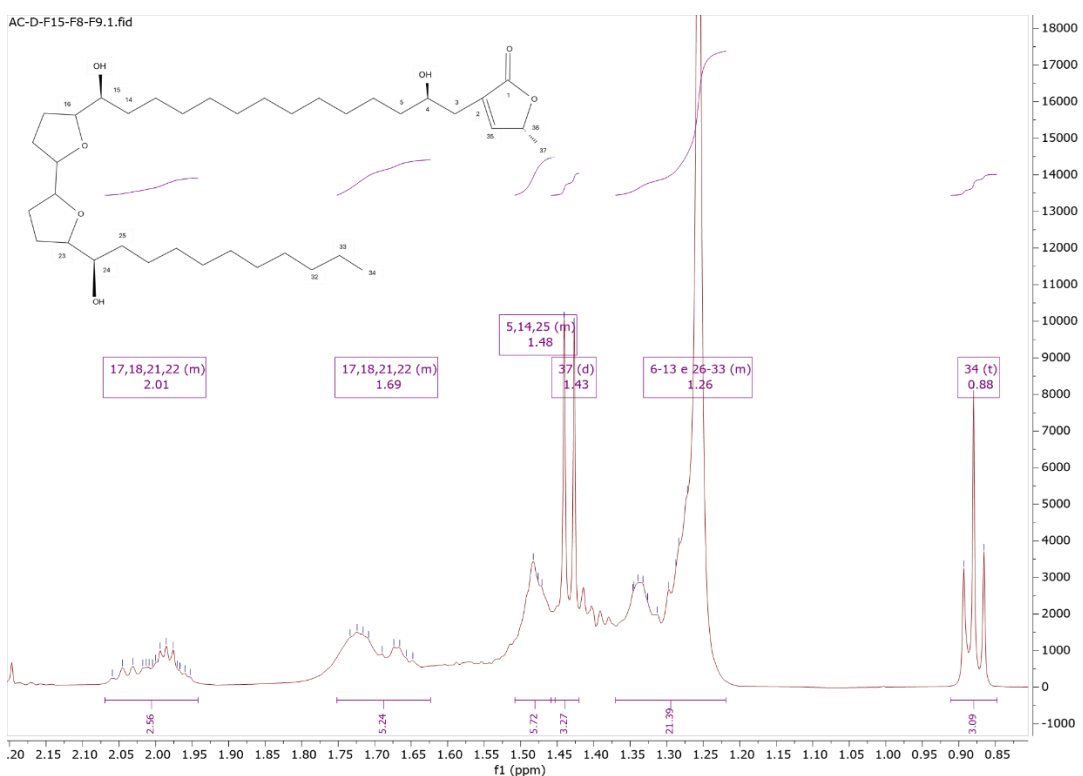


Figura 8. Expansão (2,2 a 0,8 ppm) do espectro de RMN de H1 de ACDF15F8F9, 500 MHz, clorofórmio deuterado.

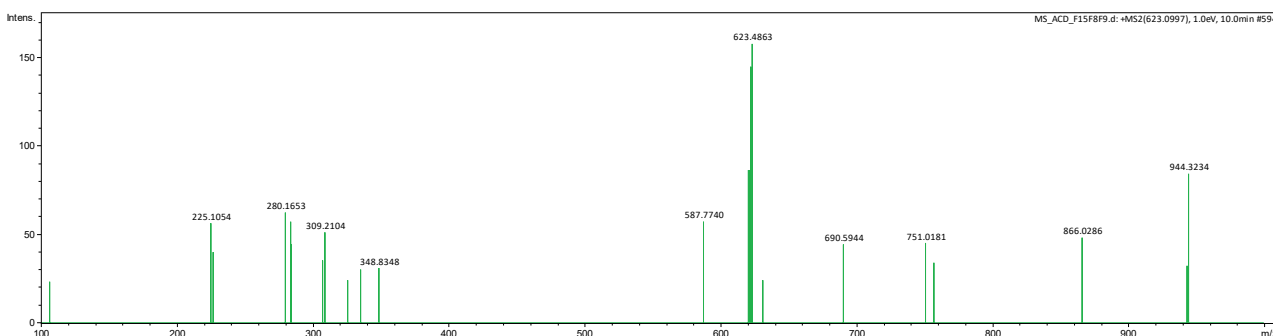


Figura 9. Espectro de massas da fração ACDF15F8F9.

Discussão

Além da mortalidade relatada neste estudo, Couto *et al.* (2016) complementam, em sua pesquisa, que o extrato de *A. coriacea* prolongou o desenvolvimento larval e pupal de *P. xylostella*, reduziu o peso das pupas e interferiu na oviposição. Esses dados reforçam que os metabólitos secundários do araticum do cerrado apresentam bioatividade sobre a traça-da-couve, possivelmente devido à presença de acetogeninas, as quais atuam nas células do tubo digestivo, inibindo o Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, impedindo a produção de ATP e levando à morte celular e, consequentemente, do inseto (Durá-Ruiz *et al.*, 2024).

Espécies da família Annonaceae são amplamente reconhecidas pela presença de acetogeninas, metabólitos secundários com elevada citotoxicidade sobre insetos, o que reforça o potencial dessas plantas no manejo alternativo de pragas (Prado Ribeiro *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017).

No processo de extração destes compostos, a escolha do solvente pode interferir no isolamento da molécula bioativa. Nesta pesquisa foi utilizado o metanol como solvente inicial e os resultados foram satisfatórios, pois o extrato bruto metanólico apresentou alta mortalidade sobre a traça da couve. Segundo Ranisaharivony *et al.* (2015), embora as acetogeninas sejam lipofílicas elas são solúveis em metanol devido aos grupos hidroxila.

Na partição do extrato bruto, o solvente diclorometano se mostrou mais eficiente que o solvente hexano, uma vez que apresentou maiores taxas de mortalidade. Este solvente tem demonstrado eficiência na extração de acetogeninas. Ranisaharivony *et al.* (2015), utilizaram a partição diclorometânica do extrato de *A. muricata* e identificaram as acetogeninas murisolina, annonacina e uma mistura de três acetogeninas (annonacina, annonacinona, murisolina).

Ao analisar as concentrações letais para esses dois solventes (*i.e.* extrato bruto metanólico e partição diclorometano), com foco na CL₉₀, é possível perceber que a partir do processo de particionamento do extrato em diclorometano são necessárias doses menores (1,238 mg.mL⁻¹) para atingir a mortalidade larval em comparação ao extrato bruto (3,602 mg.mL⁻¹). Isso indica que a partição diclorometano requer menor concentração para atingir alta mortalidade, tornando-a mais eficiente. A superioridade da fração diclorometânica em relação ao extrato metanólico pode ser atribuída à seletividade do solvente na extração de compostos bioativos mais potentes, tais como as acetogeninas.

Oriunda da partição diclorometano, a fração ACDF15F8F9 que apresentou bioatividade sobre lagartas com 100% de mortalidade, foi submetida a análise de RMN ¹H, sendo possível identificar a presença de seis sinais importantes como δ 7,19 ppm (q), δ 5,06 ppm (qq), δ 1,43 ppm (d), δ 3,81 ppm (m), δ 2,40 ppm (m) e δ 2,51 ppm (m) característicos do fragmento γ -metil α,β -insaturado γ -lactona com um grupo 4-OH das acetogeninas de anonáceas (Menezes *et al.*, 1997), indicando a possível presença destas estruturas na amostra analisada.

Esses sinais obtidos pela RMN ¹H, aliado aos resultados de espectrometria de massas cujo sinal majoritário com íon molecular em m/z 623,4863 (calculado para C₃₇H₆₆O₇ + H: 623,4887) confirmam a presença de Rolliniastatina nesta amostra (**Figura 10**),

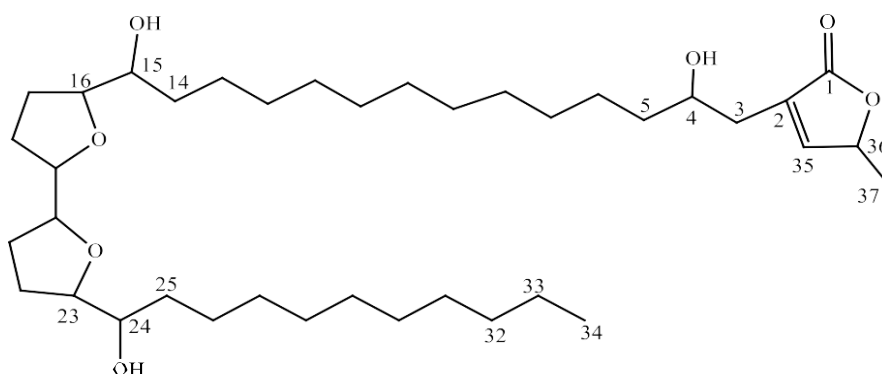


Figura 10. Esqueleto carbônico da Rolliniastatina-1

Como descrito por Alali *et al.* (1999), as acetogeninas são uma classe de substâncias caracterizadas por uma cadeia longa alifática com 32 a 34 átomos de carbono e um anel γ -lactônico terminal insaturado ou saturado. Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados um, dois, ou três anéis tetrahydrofuranos (THF) ou tetrahydropiranos (THP), além de grupos funcionais oxigenados (hidroxilas, cetonas ou epóxidos).

A presença da acetogenina rolliniastatina-1 já foi previamente relatada em várias espécies, incluindo *A. mucosa* (Petit *et al.*, 1987) (Prado Ribeiro *et al.*, 2020), *Rollinia emarginata* (Fevrier *et al.*, 1999), *R. Leptopetala* (Arriaga *et al.*, 2008), *R. Occidentalis* (Tolosa *et al.*, 2012). Entretanto, este estudo marca a primeira descrição da rolliniastatina-1 em *A. coriacea* e sua atividade contra *P. xylostella*. Pesquisas recentes demonstram a eficácia inseticida da rolliniastatina-1 sobre outros insetos, como *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (Rodrigues *et al.*, 2021).

Os resultados desta pesquisa indicam que a acetogenina rolliniastatina-1, extraída das sementes do araticum do cerrado, possui propriedades promissoras, sugerindo uma aplicação inovadora deste composto, uma vez, que demonstrou-se a eficácia potencial de derivados semipurificados, como partições e frações, no controle da traça da couve. Contudo, é imperativo que estudos futuros se concentrem na otimização dos métodos de confirmação desta acetogenina, o que poderá viabilizar o desenvolvimento de inseticidas sintéticos. Estes inseticidas poderiam empregar uma ou mais acetogeninas como ingredientes ativos no controle à *P. xylostella* na cultura da couve. Além disso, é essencial realizar uma avaliação detalhada dos possíveis efeitos em organismos não-alvo e do comportamento ambiental dessas substâncias.

Conclusões

Os resultados desta pesquisa evidenciam que a bioatividade aumenta com o aprimoramento dos processos de purificação cromatográfica do extrato, sendo que as frações mais purificadas apresentaram maior letalidade no inseto alvo. Os bioensaios evidenciaram que as frações diclorometânicas de *A. coriacea* apresentam significativa atividade inseticida contra *P. xylostella*, resultando em elevada mortalidade larval. Embora a rolliniastatina-1 não tenha sido isolada, os resultados sugerem sua possível presença. Essa acetogenina é amplamente reconhecida por sua potente ação frente a diferentes grupos de insetos e, caso confirmada, representaria o primeiro registro dessa molécula em *A. coriacea*. Tais achados abrem perspectivas promissoras para o desenvolvimento de inseticidas naturais e para a promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis.

Referências Bibliográficas

- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504, 1999.
- ALVES, T. C. *et al.* New Acetogenins from the Seeds of *Annona coriacea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, n. 11, p. 1469-1474, 2014.
- ARRIAGA, Â. M. C. *et al.* Chemical constituents and insecticidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, v. 3, n. 10, p. 1934578X0800301021, 2008.
- CARVALHO, J. S.; *et al.* Efeito de sinigrina aplicada em folhas de brássicas sobre características biológicas de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n.1, p. 15-20, 2010.
- CELESTINO, F. N.; *et al.* **Traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*)**. In: HOLTZ, A. M *et al.* (org.). Pragas das brássicas. Colatina: IFES, p. 30-72, 2015.
- CHAGAS FILHO, N. R.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; ALONSO, T. F. Biologia de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivares de couve-flor. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 253, 2010.
- COSTA, M. S.; *et al.* Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) in Brazilian Cerrado: Behavioral features of its principal pollinators. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171092, 2017.
- COUTO, I. F. S. *et al.* Efeito de extratos aquosos de anonas sobre o desenvolvimento de *Plutella xylostella*. **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2, p.1-8, 2016.
- DURÁN-RUIZ, C. A.; *et al.* Annonaceous acetogenins: A comparative analysis of insecticidal activity. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 46, p. e-508, 2024.

FERREIRA, E. B. *et al.* **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs**. R package version 1.2.2, 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. Acesso em: 10 out. 2024.

FEVRIER, A. *et al.* Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta medica**, v. 65, n. 01, p. 047-049, 1999.

FURLONG, M. J. *et al.* Diamondback moth ecology and management: Problems, progress, and prospects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n.1, p. 517-541, 2013.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Insetos: fundamentos da entomologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

IRAC-BR. Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas. **Traça-das-crucíferas consegue detectar a presença de inseticidas na planta**. Disponível em: Disponível em: <https://www.irac-br.org/single-post/2016/03/30/traçadascrucíferas-consegue-detectar-a-presença-de-inseticidas-na-planta>. Acesso em 30 de março de 2025.

LENGAI, G. M. W.; MUTHOMI, J. W.; MBEGA, E. R. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. **Scientific African**, v. 7, 2020.

MENEZES, S. E. L.; ROBLOT, F.; MAHUTEAU, J.; CAVÁ, A. Coriacyclodienin and coriacycloenin: two new annonaceous acetogenins from *Annona coriacea*. **Heterocycles**, v. 45, n. 5, 1997.

NESKE, A.; HIDALGO, J. R.; CABEDO, N.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae family. Their biological applications. **Phytochemistry**, v. 174, 2020.

PETTIT, G. R. *et al.* Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1433-1435, 1987.

PRADO RIBEIRO, L. *et al.* Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda*. **Bragantia**, v. 75, n. 3, p. 322-330, 2016.

PRADO RIBEIRO, L. *et al.* Rolliniastatin-1, a bis-tetrahydrofuran acetogenin: The major compound of *Annona mucosa* Jacq.(Annonaceae) has potent grain-protective properties. **Journal of Stored Products Research**, v. 89, p. 101686, 2020.

R CORE TEAM. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 out. 2024.

RANISAHARIVONY, B. G. *et al.* Separation and potential valorization of chemical constituents of soursop seeds. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 2, p.161-171, 2015.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Larvicidal activity of *Annona mucosa* Jacq. extract and main constituents rolliniastatin 1 and rollinicin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Industrial Crops and Products**, v. 169, n. 26, p. 113678, 2021.

SANTOS-JÚNIOR, J. G. *et al.* Chemical characterization and cytoprotective effect of the hydroethanol extract from *Annona coriacea* Mart. (Araticum). **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 4, p. 253, 2016.

SAUQUET, H.; *et al.* Phylogenetic analysis of Magnoliales and Myristicaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 142, p.125–186, 2003.

SOUSA, S. R. *et al.* Bioactivity of the specie *Annona coriacea*: A systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 10445-10469, 2020.

SOUZA, C. M. *et al.* Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical Annonaceae derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 2, p. 701-709, 2017.

TOLOSA, D. *et al.* Insecticidal effects of acetogenins from *Rollinia occidentalis* seed extract. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 12, p. 1934578X1200701226, 2012.