

Isolamento de Azadiractina de Sementes de Nim (*Azadirachta indica*) para Estudos de Concentração na Planta e Bioensaios como Inseticida Natural

PAULO E. A. RIBEIRO^{1*}, HÉLIO T. PRATES¹, JOSÉ M. WAQUIL¹, PAULO A. VIANA¹, DANIEL P. GUIMARÃES¹, LUCIMARA A. FORATO² E CARLOS H. P. PIRES¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas-MG

²Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13.560-970, São Carlos-SP

*pauloedu@cpnms.embrapa.br

Palavras Chave

Azadirachta indica, azadiractina, inseticida natural, nim, *Spodoptera frugiperda*

Revisão Bibliográfica

Para o manejo das principais espécies de pragas, os agricultores brasileiros aplicam cerca de 28 % do total de defensivos consumidos no País, o que representa um gasto anual de mais de 610 milhões de dólares (SINDAG, 2003). Entretanto o uso eficiente destes produtos, nem sempre é viável para o pequeno agricultor, devido ao alto custo envolvido, aos riscos de contaminação ambiental e à toxicidade dos princípios ativos, além do fato dos insetos apresentarem sinais de resistência. Na tentativa de reduzir perdas e consumo de defensivos agrícolas, estudos têm sido desenvolvidos na busca de métodos alternativos com ênfase no controle biológico, cultural e de cultivares resistentes.

O desenvolvimento de cultivares resistentes é um dos métodos de controle de pragas, onde o custo é reduzido e não causa efeitos indesejáveis ao ambiente. Entretanto, a resistência natural nem sempre apresenta um nível satisfatório de controle que, no caso da resistência do milho à lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), não ultrapassa 50 % da proteção obtida através de cultivares transgênicas (Waquil *et al.*, 2002).

Esta situação coloca o uso de produtos naturais provenientes de plantas como uma alternativa aos inseticidas sintéticos no manejo das principais pragas no agroecossistema, onde o custo é reduzido e sem os efeitos indesejáveis ao ambiente, e, portanto de fácil acesso aos pequenos produtores. Neste contexto, o nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), árvore originada da Índia, tem sido foco de intensa atenção internacional durante as três últimas décadas, pois além de se desenvolver sob as mais diversas condições agroclimáticas, principalmente clima tropical, se adapta facilmente a solos pobres. Princípios ativos extraídos dessa planta tiveram sua atividade demonstrada contra cerca de 400 espécies de insetos-pragas (Schmutterer, 1995, Akhtar, 2000, Prates *et al.*, 2003).

A química do nim foi muito estudada na década de 70 e 80 com mais de 150 compostos isolados das sementes, folhas e galhos (Schmutterer, 1990), sendo os mais ativos isolados da semente e a maioria pertencente à classe dos limonóides. A azadiractina isolada e caracterizada em 1972 tem sido o composto considerado o principal "responsável" pela atividade, apesar de existir pouca evidência. Existem poucos estudos na literatura sobre a atividade dos componentes do nim, pois são de difícil separação e as quantidades obtidas são insuficientes para conduzir bioensaios. (Govindachari *et al.*, 1995; 1998).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a variação sazonal da concentração de azadiractina na folha de nim, visando obter extratos ativos para uso direto no controle de pragas, utilizando como modelo para avaliação da atividade biológica, a *Spodoptera frugiperda*, importante espécie-praga do milho e de outras culturas.

Materiais e Métodos

A avaliação da concentração de azadiractina nas folhas de nim foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Shimadzu modelo LC-10A, com detector UV-Vis em $\lambda = 215$ nm, coluna de fase reversa (C-18, Shim-Pack CLC-ODS Shimadzu, 4,6 mm x 25 cm, diâmetro de partícula de 5 μm), fase móvel metanol/água 60:40 com vazão de 1,0 mL/min. O padrão analítico de azadiractina foi adquirido junto à Sigma (Product Number A7430, 95%). Nessas condições, o tempo de retenção da azadiractina, que foi previamente dissolvida em metanol grau HPLC, foi de aproximadamente 6,5 min. O CLAE foi calibrado utilizando-se a técnica do padrão externo, nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, com $R^2 = 99,3$ %, para posterior quantificação nas amostras.

Considerando o alto custo financeiro do padrão analítico de azadiractina e a inviabilidade de adquiri-lo continuamente durante o projeto, foi desenvolvida uma metodologia simplificada para isolamento dessa substância a partir de sementes de nim, com base na metodologia descrita por Yamasaki *et al.* (1986). As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido, desengorduradas com n-hexano e extraídas com metanol P.A. O extrato metanólico foi particionado com diclorometano, concentrado e aplicado em coluna cromatográfica de 23 mm de diâmetro interno, contendo sílica 230-400 mesh. A eluição foi efetuada com éter etílico-metanol 19:1. Após análises por CLAE, as frações com maior concentração de azadiractina foram reunidas, secadas em rotavaporizador e recristalizadas com tetracloreto de carbono.

O isolado de azadiractina das sementes foi caracterizado utilizando o detector de arranjo de diodos do cromatógrafo líquido, por medida do ponto de fusão e por ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio.

Para o estudo da variação da concentração de azadiractina na folha durante o ano, foi escolhida uma planta de nim de porte médio cultivada na Embrapa Milho e Sorgo em área de cerrado, Latossolo Vermelho com textura argilosa. Amostras de folha do terço médio foram coletadas mensalmente de abril de 2004 a agosto de 2005.



FIGURA 1 – A) Árvore de nim na Embrapa Milho e Sorgo; B) Ramo coletado; C) Separação de folhas para extração

A amostragem foi feita no período da manhã, retirando-se, com um podão, cinco ramos (300 a 400 g de folhas frescas) da parte mediana da copa e levadas imediatamente ao laboratório. As

folhas foram separadas dos talos e colocadas sobre bancada para secagem ao ar, à sombra, por um período de trinta dias, até ficarem desidratadas e quebradiças. Para análise de azadiractina nas amostras mensais de folha, foi realizada extração semelhante à realizada para a extração da semente. As amostras que não foram imediatamente analisadas foram armazenadas em freezer. Para avaliar a reprodutibilidade da extração da e análise da folha, foi realizado um teste com três repetições de uma mesma amostra, obtendo um intervalo de confiança de 13,8 %; a eficiência foi avaliada incorporando massa conhecida do padrão isolado da semente à amostra de folha moída e desengordurada, obtendo-se uma recuperação de 92,1 %.

Bioensaios foram conduzidos conforme Waquil *et al.* (2004), tratando-se a superfície de dieta artificial com soluções aquosas contendo o isolado de azadiractina em um gradiente de concentração de 0,3 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando bandejas multicelulares contendo células que, depois de infestadas com larvas recém-eclodidas da lagarta-do-cartucho do milho (LCM), foram cobertas com um plástico adesivo próprio para vedar as lagartas e permitir ventilação. Depois de montadas, as bandejas foram acondicionadas em uma BOD regulada para temperatura de 27°C e aí mantidas por 10 dias. Após esse período, as células foram abertas, o número de insetos mortos foi contado e a biomassa de cada larva foi medida, utilizando uma balança de precisão. Foram realizados também bioensaios com extratos brutos de folhas de nim.

Resultados e Discussão

No que se refere à caracterização do sólido isolado e recristalizado obtido das sementes de nim, observou-se uma correlação satisfatória do espectro de UV-visível com o espectro do padrão analítico entre 200 e 300 nm, obtido pelo detector PDA.

A determinação do ponto de fusão do sólido confirmou a presença de impurezas, já que a fusão ocorreu na faixa de 136,0 a 140,5 °C enquanto o ponto de fusão da azadiractina descrito na literatura é 149-150 °C (Dureja e Johnson, 2000).

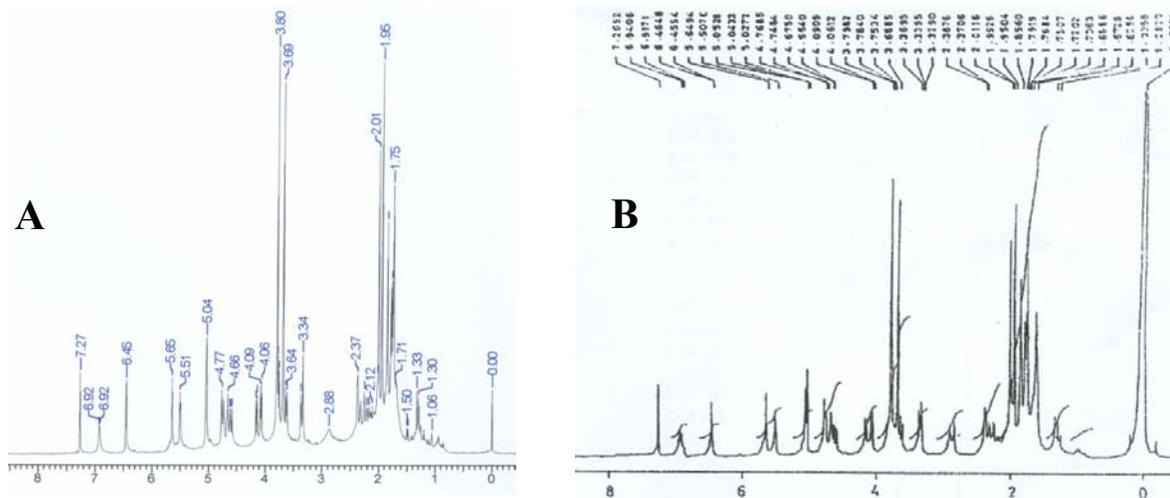


FIGURA 2 – A) Espectro de RMN ^1H do padrão obtido da semente; B) espectro de RMN ^1H da azadiractina apresentado por Dureja e Johnson (2000)

O espectro de RMN ^1H confirma a presença majoritária da azadiractina no sólido obtido, estando presentes todos os picos descritos na literatura. Todavia, a integração desses picos revela desproporcionalidade nos picos integrados entre 1,0 e 3,4 ppm, ou seja, provavelmente

existem nessa região sinais correspondentes a impurezas, podendo ser, inclusive, isômeros da azadiractina.

A análise do isolado recristalizado por CLAE revelou uma concentração de azadiractina de aproximadamente 50 %, sendo suficiente para realizar co-injeções durante as análises das folhas visto que sua pureza espectroscópica está muito próxima à do padrão analítico.

Os resultados da variação da concentração de azadiractina nas folhas da planta selecionada no CNPMS durante 17 meses são mostrados na Figura 3.

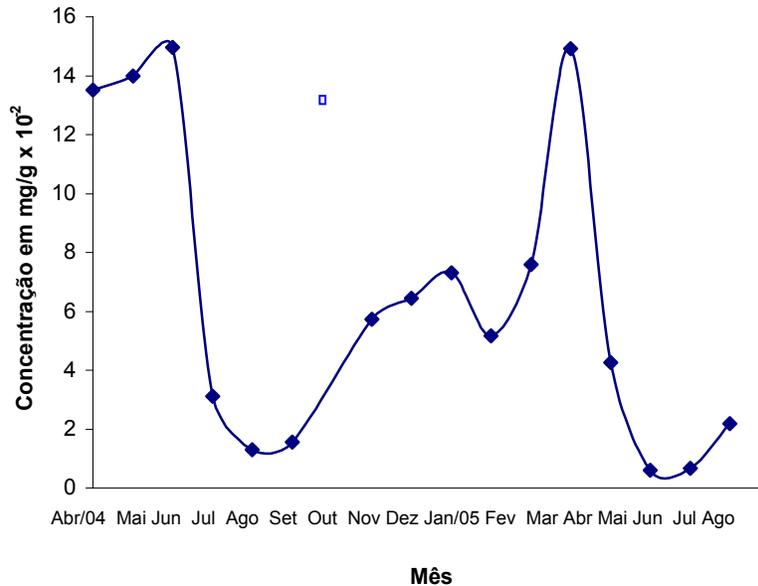


FIGURA 3. Variação temporal da concentração de azadiractina nas folhas de nim da planta selecionada no CNPMS

Observa-se um aumento da concentração da azadiractina na folha da planta selecionada a partir de abril/04, uma forte queda a partir de julho e novo crescimento a partir novembro, atingindo novamente valores máximos entre em abril/05. A amostragem foi concentrada no meio da copa da planta e utilizando folhas maduras, pois foi observado que em folhas novas a concentração de azadiractina é alta ($0,20 \text{ mg.g}^{-1}$) quando comparadas com as folhas maduras. Esta observação explica o ponto espúrio da Figura 3 relativa à amostra coletada em outubro/2004, quando a planta passava por estágio vigoroso de brotamento, tornando inevitável uma amostragem, predominante, de folhas novas. Observa-se, ainda, uma antecipação do ciclo em 2005, com tendência de queda da concentração de azadiractina em maio, sendo que esta queda no ano anterior (2004) ocorreu de julho.

Além do ciclo fisiológico da planta, que passa por perda e renovações de folhas durante o ano, uma outra possível explicação para essa variação é o déficit hídrico sofrido na época de seca, que ocorre na região de Sete Lagoas entre julho e setembro quando foram observadas menores concentrações de azadiractina na folha.

Os bioensaios realizados utilizando a azadiractina isolada das sementes de nim indicaram uma atividade significativa sobre a biologia da LCM, reduzindo o acúmulo de biomassa das larvas (Figura 4). Na faixa de concentração trabalhada ($0,3$ a 20 mg.L^{-1}), não foi verificado efeito significativo da azadiractina sobre a sobrevivência das larvas.

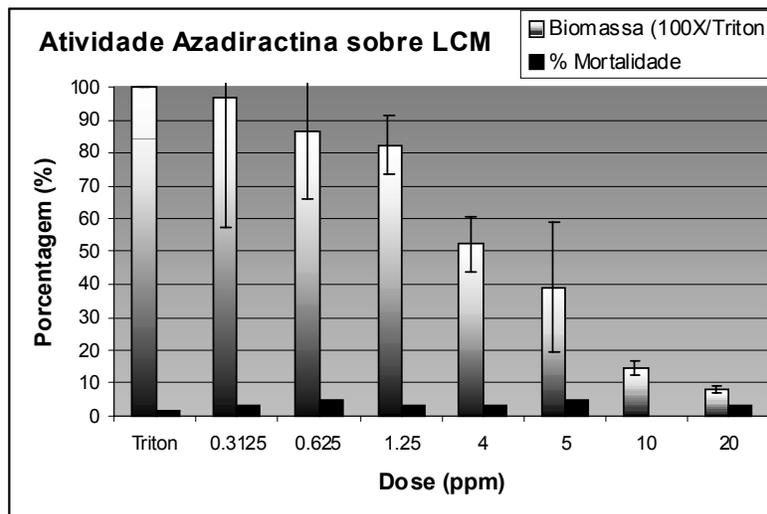


FIGURA 4 - . Porcentagem de mortalidade e de biomassa (% em relação ao controle) da lagarta-do-cartucho submetida a um gradiente de concentração de azadiractina extraída de folhas de nim, partindo-se da concentração de 20 mg.L⁻¹

Foram realizados, ainda, bioensaios utilizando extratos foliares brutos, contendo concentrações de azadiractina próximas às dos bioensaios realizados com a azadiractina isolada na semente (Figura 20). Nota-se que o acúmulo de biomassa foi muito menor nos tratamentos com extrato de folhas do que nos tratamentos com azadiractina purificada, mesmo para as concentrações de azadiractina próximas, 1,25 e 1,5 µg.mL⁻¹; 5 e 4,5 µg.mL⁻¹ e 10 e 9,9 µg.mL⁻¹, respectivamente. Portanto, é possível que outras substâncias, além da azadiractina, presentes nos extratos das folhas também tenham atividade sobre a LCM. Novos estudos devem ser conduzidos para confirmar esse fato e há a possibilidade da identificação de novas substâncias ativas sobre a LCM.

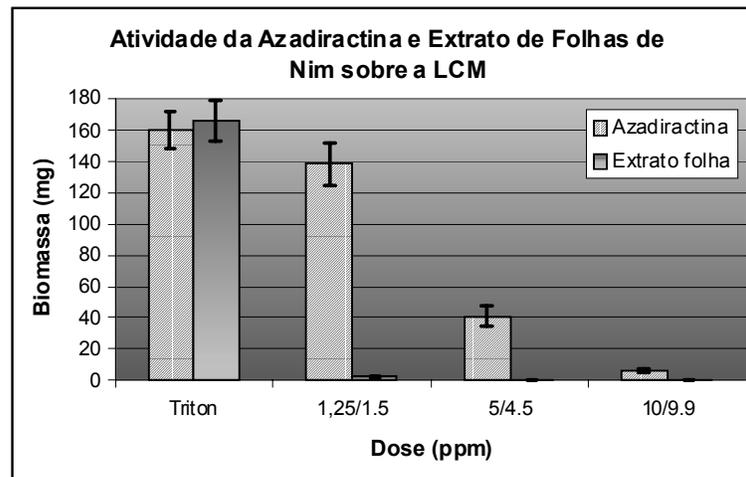


FIGURA 5 - Acúmulo de biomassa da LCM submetida a um gradiente de concentração de azadiractina (1,25; 5,00 e 10,00 µg.mL⁻¹) e de extrato de folhas de nim (1,5; 4,5 e 9,9 µg.mL⁻¹ de azadiractina).

Literatura Citada

- AKHTAR, M. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). **Integrated Pest Management Reviews**. v.5, n.1, p.57-66, 2000.
- DUREJA, P.; JOHNSON, S. Photodegradation of azadirachtin-A: A neem-based pesticide. **Current Science**. v.79, n.12, p.1700-1703, 2000.
- GOVINDACHARI, T. R.; NARASIMHAN, N. S.; SURESH, G.; PARTHO, P. D.; GOPALAKRISHNAN, G.; KRISHNA KUMARI, G. N. Structure-related insect antifeedant and growth regulating activities of some limonoids. **Journal of Chemical Ecology**, v.21, n.10, p.1585-1599, 1995.
- GOVINDACHARI, T. R.; SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHY, B.; MASILAMANI, S. Identification of antifungal compounds from seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**. v.26, n.2, p.109-116, 1998.
- PRATES, H.T.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Atividade de extratos aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.38, n.3, p.437-439, 2003.
- SCHMUTTERER, H. L. (Ed.). **The neem tree**. Germany: Berlin, VCH Publishers. 188p. 1995
- SCHMUTTERER, H. L. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Ann. Rev. Entomol.**, v.35, p.271-297, 1990
- SINDAG. Estatística do setor de defensivos agrícolas
http://www.sindag.com.br/html/estat_dezembro.html Página consultada em 18/02/2003
- WAQUIL, J.M., VILLELA, M.F., FOSTER, J.F. Resistência de milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, v.1, n.3, p.1-11, 2002.
- WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F.; SIEGFRIED, B.D.e FOSTER, J.E. Atividade Biológica das Toxinas do *B.t.*, Cry 1A(B) e Cry1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.2, p. 153-163, 2004.
- YAMASAKI, R. B.; KLOCKE J. A.; LEE, S. M.; STONE, G. A. E DARLINGTON, M. V. Isolation and Purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.356, p.220-226, 1986.