



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

LUCAS GABRIEL PITA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE FOLHAS DE
Annona squamosa* PARA *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger*, *Sitophilus
zeamais

Recife
2019
LUCAS GABRIEL PITA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE FOLHAS DE
Annona squamosa* PARA *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger* E *Sitophilus
zeamais

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para conclusão da disciplina de estágio curricular obrigatório II e obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Coorientador: Msc. Welton Aaron de Almeida

Recife
2019
LUCAS GABRIEL PITA DOS SANTOS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S237 Santos, Lucas Gabriel Pita dos
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE FOLHAS DE *Annona squamosa* PARA *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger*, *Sitophilus zeamais* / Lucas Gabriel Pita dos Santos. - 2019.
52 f. : il.
- Orientador: Emmanuel Viana Pontual.
Coorientador: Welton Aaron de Almeida.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.
1. Atividade inseticida. 2. *Annona squamosa*. 3. metabólitos secundários. 4. inibidor de tripsina. 5. lectina. I. Pontual, Emmanuel Viana, orient. II. Almeida, Welton Aaron de, coorient. III. Título

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE FOLHAS DE
Annona squamosa PARA *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger* E *Sitophilus
zeamais***

Área de concentração: Ciências Biológicas

Data de defesa: 20/12/2019

Resultado:

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Presidente)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Profa. Dra. Cristiane Maria Varela de Araújo de Castro (1° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Msc. Leydianne Leite de Siqueira Patriota (2° Titular)

Departamento de Bioquímica, UFPE

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque (3° Titular)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha namorada, aos familiares e amigos que me deram todo apoio necessário para que este trabalho pudesse ser finalizado, mesmo com todos os contratempos e dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Emmanuel Pontual, pela atenção, orientação e amizade durante todo o período de realização desse trabalho.

Ao Msc. Welton Almeida, pelos conselhos e suporte na pesquisa desenvolvida.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Araújo-Castro, pela orientação no início da graduação e apoio ao longo desta jornada.

À Prof^a. Dr^a. Jaqueline Oliveira, pela amizade e ensinamentos passados durante minha estadia no Programa de Educação Tutorial.

À Emily Queiroz, pelo apoio, suporte, paciência e carinho durante todo o desenvolvimento deste trabalho e de minha vida.

A todos os membros do Programa de Educação Tutorial de Bacharelado em Ciências Biológicas da UFRPE (SEDE), por me acompanharem durante a graduação realizando diversas atividades, contribuindo para melhoria do curso de graduação e a minha evolução pessoal.

RESUMO

SANTOS, L.G.P. **Avaliação da toxicidade do extrato de folhas de *Annona squamosa* para *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger* e *Sitophilus zeamais***. 2019. Monografia – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2019.

A alta toxicidade ambiental dos compostos atualmente utilizados para controle químico de insetos praga e vetores de doença, bem como o surgimento de populações resistentes têm estimulado a busca por novos agentes com atividade inseticida. Neste trabalho, um extrato de folhas de *Annona squamosa* (Annonaceae) foi avaliado quanto à presença de proteínas e metabólitos secundários. O efeito do extrato sobre larvas de *Aedes aegypti* (vetor da dengue, febre amarela, zika e chikungunya) e adultos de *Nasutitermes corniger* (praga urbana) e *Sitophilus zeamais* (praga agrícola) foi também investigado. A caracterização química do extrato revelou a presença de proteínas, atividades de lectina (AHE = 21,3) e inibidor de tripsina (15,6 U/mg), bem como metabólitos secundários da classe dos flavonoides (rutina), derivados cinâmicos (ácido clorogênico), saponinas, antraquinonas, terpenos e esteroides. O extrato foi tóxico para larvas de *A. aegypti* e a concentração necessária para matar 50% das larvas foi de 1,9% (m/v). Por outro lado, o extrato não afetou a sobrevivência de soldados e operários de *N. corniger*. Os adultos de *S. zeamais* apresentaram mortalidade variando de 51,2 a 63,5% em relação ao controle, quando alimentados com dieta contendo o extrato (15 a 75 mg/g), em adição, um forte efeito deterrente alimentar foi detectado. Esse dado revelou que os insetos morreram por inanição e não por intoxicação pela ingestão do extrato. O extrato causou alta mortalidade de indivíduos de *Hyalella* sp. na concentração correspondente à CL₅₀ para *A. aegypti*. Por outro lado, a presença do extrato interferiu no pH e na quantidade de O₂ dissolvido na solução de cultivo, sugerindo que a mortalidade de *Hyalella* sp pode não ser resultado de toxicidade direta do extrato. Em conclusão, o extrato de folhas de *A. squamosa* é um interessante candidato para utilização no controle de populações de *A. aegypti* e como agente para proteção de grãos armazenados contra o ataque por *S. zeamais*. Adicionalmente, a utilização do extrato no ambiente necessita de cautela devido à alta mortalidade detectada para *Hyalella* sp.

Palavras-chave: Atividade inseticida, *Annona squamosa*, *Hyalella*, inibidor de tripsina; lectina; metabólitos secundários

ABSTRACT

SANTOS, L.G.P. **Evaluation of toxicity of *Annona squamosa* leaf extract to *Aedes aegypti*, *Nasutitermes corniger* and *Sitophilus zeamais***. 2019. Monografia – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2019.

The high environmental toxicity of the compounds currently used for control of insect pests, as well as the emergence of resistant populations have stimulated the search for new agents with insecticidal activity. In this work, an extract of *Annona squamosa* (Annonaceae) leaves was evaluated for the presence of proteins and secondary metabolites. The effect of the extract on larvae of *Aedes aegypti* (vector of dengue, yellow fever, zika and chikungunya) and adults of *Nasutitermes corniger* (urban pest) and *Sitophilus zeamais* (agricultural pest) was also investigated. The chemical characterization of the extract revealed the presence of proteins, lectin (HAE = 21,3) and trypsin inhibitor (15,6 U/mg) activities, as well as secondary metabolites the classes of flavonoids (rutin), cinnamic derivatives (chlorogenic acid), saponins, anthraquinones, terpenes and steroids. The extract was toxic to *A. aegypti* larvae and the concentration required to kill 50% of larvae (CL₅₀) was 1.9% (m/v). On the other hand, the extract did not affect the survival of *N. corniger* soldiers and workers. *S. zeamais* adults showed mortality ranging from 51.2 to 63.8% regarding the control when fed with the diet containing the extract (15 to 75 mg/g), but a strong deterrent feeding effect was detected. This data revealed that the insects die from starvation and not from intoxication due to the extract intake. The treatment with the extract resulted in high mortality of *Hyalomma* sp. at the concentration corresponding to the LC₅₀ for *A. aegypti*. However, the presence of the extract interferes with the pH and the amount of dissolved O₂ in the culture solution, suggesting that *Hyalomma* sp mortality cannot be a result of a direct toxicity of the extract. In conclusion, the *A. squamosa* leaf extract is an interesting candidate for use in the control of *A. aegypti* populations and as a protection agent for stored grains against the *S. zeamais* attack. Additionally, the use of the extract in the environment needs caution due to the high mortality detected for *Hyalomma* sp.

Palavras-chave: Insecticidal activity, *Annona squamosa*, *Hyalomma*, trypsin inhibitor, Lectin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Aedes aegypti</i> (Mosquito da dengue)	14
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	15
Figura 3. <i>Sitophilus zeamais</i> (gorgulho-do-milho)	19
Figura 4. <i>Nasutitermes corniger</i> , (a) soldado e (b) operário	17
Figura 5. <i>Hyalella</i> sp.	20
Figura 6. Modos de transferência de doses de inseticidas	22
Figura 7. Árvore (A) e frutos com sementes (B) de <i>Annona squamosa</i>	26
Figura 8. Aspecto do ensaio de atividade larvicida do extrato de folhas de <i>A. squamosa</i> sobre <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 9. Aspecto do ensaio de atividade inseticida contra <i>Nasutitermes corniger</i>	32
Figura 10. Aspecto do ensaio para investigação da toxicidade por ingestão do extrato de folhas de <i>A. squamosa</i> para <i>S. zeamais</i> adultos	33
Figura 11. Análise fitoquímica do extrato de folhas de <i>A. squamosa</i> . (A) Cromatograma do extrato e dos padrões rutina e ácido clorogênico. Espectros de varredura dos picos observados na amostra (B) Ácido clorogênico, (C) Derivado cinâmico e (D) Rutina	37
Figura 12. Efeito do extrato de folhas de <i>Annona squamosa</i> na sobrevivência de larvas de <i>A. aegypti</i>	38
Figura 13. Taxa de crescimento relativo de <i>S. zeamais</i> adultos alimentados com o extrato de folhas de <i>A. squamosa</i> durante 7 dias	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sistemas, reveladores e padrões utilizados na investigação do extrato de folhas de *A. squamosa* quanto à presença d metabólitos secundários30
- Tabela 2.** Os teores de derivados cinâmicos, ácido clorogênico e rutina encontrados no extrato de folhas de *A. Squamosa*37
- Tabela 3.** Atividade larvicida do extrato de folhas de *A. squamosa* contra L₃ de *A. aegypti*38
- Tabela 4.** Efeito do extrato de folhas de *Annona squamosa* na sobrevivência de *S. zeamais* adultos40
- Tabela 5.** Efeito do extrato de folhas de *A. squamosa* na sobrevivência de *Hyaella* sp. e nos parâmetros abióticos da solução de cultivo43
- Tabela 6.** Efeito do extrato de folhas de *A. squamosa* nos parâmetros abióticos da solução de cultivo na ausência dos indivíduos de *Hyaella* sp43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 INSETOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	13
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	13
3.2 INSETOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA	15
3.2.1 <i>Sitophilus zeamais</i>	16
3.3 INSETOS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	17
3.3.1 <i>Nasutitermes corniger</i>	18
3.4 PESTICIDA E SELETIVIDADE.....	19
3.4.1 <i>Hyalella sp.</i> como organismo não alvo	19
3.5 CONTROLE QUÍMICO DE INSETOS PRAGAS	20
3.6 BIOINSETICIDAS	21
3.6.1 Proteínas inseticidas	23
3.6.2 Metabólitos Secundários	25
3.7 <i>Annona squamosa</i>	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 MATERIAL VEGETAL	27
4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATO DE FOLHA DE <i>A. squamosa</i>	28
4.2.1 Quantificação de Proteínas	28
4.2.2 Presença de Lectinas	28
4.2.3 Presença de Inibidores de Tripsina	28
4.2.4 Presença de Metabólitos Secundários	29
4.2.4.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada	29
4.2.4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	29
4.3 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DO EXTRATO DE FOLHAS DE <i>A. squamosa</i>	31
4.3.1 Atividade Larvicida Contra <i>A. Aegypti</i>	31
4.3.2 Efeito Sobre Operários e Soldados De <i>N. Corniger</i>	32

4.3.3 Efeito Sobre <i>Sitophilus Zeamais</i> Adultos	32
4.4 TOXICIDADE DO EXTRATO DE FOLHAS DE <i>A. squamosa</i> PARA <i>Hyalella</i> sp..	34
4.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE FOLHAS DE <i>A. squamosa</i> SOBRE O pH OXIGÊNIO DISSOLVIDO EM ÁGUA	35
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Alguns insetos passam a ser chamados de pragas quando algum fator estimula o crescimento populacional exagerado, causando prejuízos econômicos associados a impactos agrícolas e para saúde pública, atuando como vetores de doenças (JACOBI *et al*, 2016). Uma das formas importantes para controle dessas populações de insetos corresponde à aplicação de inseticidas que podem ser nocivos não apenas para os organismos alvo, mas também para outros animais e até mesmo para plantas (OMS 2019).

No Brasil algumas doenças relevantes são transmitidas por insetos, como exemplo podemos citar a dengue, febre Zika e Chikungunya. Em 2019 foram registrados 1.527.119 de casos prováveis de dengue no Brasil, com 754 óbitos registrados como consequência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Além dos impactos na população a dengue também representa uma perda econômica para o país, que investe em saúde pública. Apenas no ano de 2013 os custos associados ao tratamento da dengue, descontando os valores associados ao controle de vetores, foi estipulado em US\$ 1.228.000,00 (MARTELLI *et al*, 2015).

A controvérsia acerca do uso de inseticidas acarretou no desenvolvimento de pesquisas sobre os impactos dessas substâncias no meio ambiente, bem como na saúde humana e de outros animais. Tem sido relatado que os inseticidas, através de lixiviação, podem ser transportados até estuários onde podem ser bioacumulados por espécies de bivalves de interesse econômico, o que pode causar efeitos deletérios sobre a saúde humana por biomagnificação (NASCIMENTO E MELNYK, 2016; RODRIGUES *et al*, 2018). Além disso, é possível que os efeitos tóxicos de inseticidas em humanos estejam associados ao desenvolvimento de doenças cardíacas, câncer, doenças de Parkinson e Alzheimer (SABARWAL *et al*, 2018; ANAKWUE, 2018).

Nesse contexto, novos métodos de controle químico menos nocivos para o ambiente e para saúde humana se fazem necessários para controlar as populações de pragas urbanas e agrícolas (MOSHI E MATOJU, 2017; PINO-OTIN *et al*, 2019). Uma das possibilidades atualmente investigadas para o controle de insetos-praga é a produção de inseticidas naturais ou bioinseticidas, utilizando principalmente compostos derivados do metabolismo de plantas com usos etnofarmacológicos previamente descritos. A busca por inseticidas naturais já tem resultados interessantes e promissores quanto à criação de produtos comerciais de origem

natural e, portanto, mais ecologicamente seguros (MOSHI, 2017; PINO-OTIN, 2019). Experimentos utilizando preparações vegetais já demonstraram que o potencial químico latente nas plantas pode ser efetivo contra diversas ordens de insetos incluindo Coleoptera, Isoptera, Lepidoptera e Hemiptera (DANTZGER *et al*, 2015; MACEDO *et al*, 2015; SOUZA *et al*, 2018).

Neste trabalho, um extrato de folhas de *Annona squamosa* (Annonaceae), conhecida popularmente como fruta-pinha ou fruta do conde, foi avaliado quanto à presença de proteínas e metabólitos secundários previamente descritos como potenciais inseticidas. Adicionalmente o efeito do extrato sobre larvas de *Aedes aegypti* (mosquito vetor da dengue, febre amarela, febre zika e febre chikungunya), adultos de *Nasutitermes corniger* (cupim, praga urbana) e de *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho, praga agrícola) também foram investigados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do extrato de folhas de *Annona squamosa* para larvas de *Aedes aegypti* e adultos de *Nasutitermes corniger* e *Sitophilus zeamais*.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extrato salino de folhas de *A. squamosa*
- Caracterizar o extrato quanto à presença de proteínas (lectinas e inibidores de proteases) e metabólitos secundários.
- Investigar o efeito larvicida do extrato para larvas de *A. aegypti* em estágio L3.
- Investigar o efeito do extrato na sobrevivência de operários e soldados de *N. corniger*.
- Avaliar o efeito do extrato na sobrevivência e comportamento alimentar de *S. zeamais* adultos.
- Determinar o efeito do extrato na sobrevivência da espécie não-alvo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INSETOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

É reconhecido que muitos artrópodes podem atuar como vetores de doenças para a população humana e, nesse sentido, uma importante estratégia para controle epidemiológico dessas doenças corresponde à redução da população dos vetores até níveis ecologicamente aceitáveis. São exemplos de doenças transmitidas por artrópodes e consideradas como sérios problemas de saúde pública no Brasil a dengue, a febre zika, a febre amarela e a febre Chikungunya (COSTA *et al*, 2005; SEIXAS, 2012; GALVÃO 2014). Essas doenças possuem um impacto relevante no Brasil e são transmitidas por mosquitos da espécie *Aedes aegypti*. Em 2019 foram registrados 1.527.119 de casos prováveis de dengue no Brasil, com 754 óbitos registrados como consequência da doença, para febre Zika e Chikungunya os números foram menores, mas os órgãos responsáveis pelo controle epidemiológico das doenças ainda sugerem um acompanhamento contínuo para evitar que essas doenças retornem causando prejuízos a saúde da população brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Além dos impactos sobre a saúde da população a dengue também representa uma perda econômica para o país, que investe em saúde pública afim de mitigar e controlar a doença. Apenas no ano de 2013 os custos associados ao tratamento da dengue, descontando os valores associados ao controle dos vetores, foi estipulado em US\$ 1.228.000,00, o valor mais alto observado no período de 2009 a 2013 (MARTELLI *et al*, 2015).

Devido à importância já mencionada do mosquito *A. aegypti* como transmissor de algumas dessas doenças, este será tratado com mais detalhes a seguir.

3.1.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é um inseto da ordem Diptera, família Culicidae, nativo do continente africano e considerando uma espécie invasora de importante impacto na saúde pública. Acredita-se que a introdução desse mosquito no Brasil se deu na época da colonização quando foram trazidos da África para as Américas de forma passiva, junto com o transporte de escravos. A aclimatação de *A. aegypti* foi impulsionada principalmente por impactos antrópicos sobre o ambiente natural que já

favorecia a sobrevivência dessa espécie entremeados aos espaços ocupados pelos seres humanos desde aquela época (ZARA *et al*, 2016).

A morfologia externa dos adultos de *A. aegypti* (figura 1) apresenta uma similaridade de estruturas com os demais membros da família, um par de asas funcionais e um par modificado para estruturas de equilíbrio. A identificação dos mosquitos dessa espécie pode ser feita ao observar a coloração preta do inseto juntamente com as marcas brancas em forma de linha no tórax do mosquito (SEIXAS, 2012). Machos e fêmeas de *A. aegypti* possuem hábitos alimentares diferentes. Os machos alimentam-se de néctar, enquanto as fêmeas possuem hábito hematófago diurno. Nesse comportamento de alimentação, as fêmeas infectadas com os vírus da dengue, febre amarela, Zika ou febre Chikungunya podem transmiti-los através da sua picada, daí sua grande importância nas áreas de epidemiologia e saúde pública (SEIXAS, 2012).

Figura 1. *Aedes aegypti* (Mosquito da dengue).

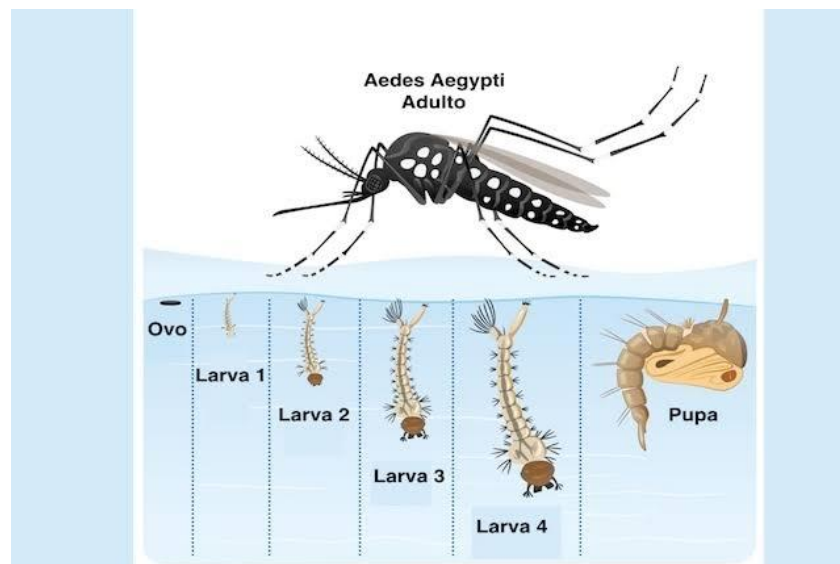


Fonte: Britanica, disponível em: <<https://www.britannica.com/animal/Aedes>>

O ciclo de vida de *A. aegypti* (Figura 2) é baseado principalmente na presença de água parada, com preferência por reservatórios de água limpa. Apesar disso, ele está adaptado a se reproduzir em ambientes onde a água não possui boa qualidade. Após a cópula, ocorre a postura dos ovos na água e cerca de três dias depois ocorre a eclosão dos ovos dando origem a larvas aquáticas. São quatro os estágios larvais (L₁, L₂, L₃ e L₄) antes de se tornar a pupa. Em seguida, ocorre a transformação para o organismo em seu estágio reprodutivo aéreo que atua como vetor das doenças mencionadas (BESERRA *et al*, 2009 e SEIXAS, 2012).

O controle de populações dos vetores ainda permanece sendo a principal e mais eficiente estratégia para erradicar as arboviroses, doenças virais veiculadas por artrópodes, uma vez que ainda não existem vacinas contra Chikungunya e febre Zika, e que a vacina disponível para imunização contra dengue apresenta sérias restrições, tais como a faixa etária restrita, melhor eficácia na porção da população que já entrou em contato com o vírus, além da necessidade de aplicação de múltiplas doses dentro de apenas um ano (LOPES *et al*, 2014; CHIARELLA 2016; ZARA *et al*, 2016; OMS, 2018). Em adição, apesar de existir uma eficiente vacina contra febre amarela, o caráter periodicamente reemergente da doença contribui para a necessidade de manter controlada a densidade populacional de *A. aegypti* (OMS, 2018).

Figura 2. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*



Fonte: disponível em: < <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/> >

3.2 INSETOS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Alguns insetos possuem importância econômica por serem utilizados para gerar produtos que são comercializados. O bicho-da-seda (*Bombyx mori*), por exemplo, é uma espécie de Lepidoptera cujos casulos, nos quais ocorre a transição entre as fases de lagarta e pupa, são utilizados na fabricação de biofibras pela indústria têxtil, principalmente devido a propriedades que os tornam fáceis de modelar (ROCKWOOD *et al*, 2011).

Outro produto comercializado que possui origem na atividade de insetos é o mel. Abelhas africanas da espécie *Apis mellifera* são bastante utilizadas em apiário para

produção de mel no Brasil. A apicultura não só tem aumentado nacionalmente, como também conquistou espaço no mercado internacional, aumentando o impacto econômico desempenhado pelo Brasil até 2010. Nesse sentido, a apicultura é responsável por gerar emprego e renda em todo o país, mas principalmente na região nordeste (PASIN *et al*, 2012).

A despeito desses insetos cuja atividade pode gerar produtos economicamente importantes, existem muitos outros que trazem prejuízos econômicos. Por exemplo cupins, como os da espécie *Nasutitermes corniger*, têm um alto poder de destruição e podem danificar edificações urbanas, livros, roupas, papéis e móveis, principalmente quando se encontram fora de seu ambiente natural, uma vez se tratando de um inseto com resiliência aos controles já conhecidos e que são capazes de gerar prejuízos econômicos a longo prazo (VERMA *et al*, 2009; ALVAREZ, 2016; ALVAREZ e SÓLIS, 2018).

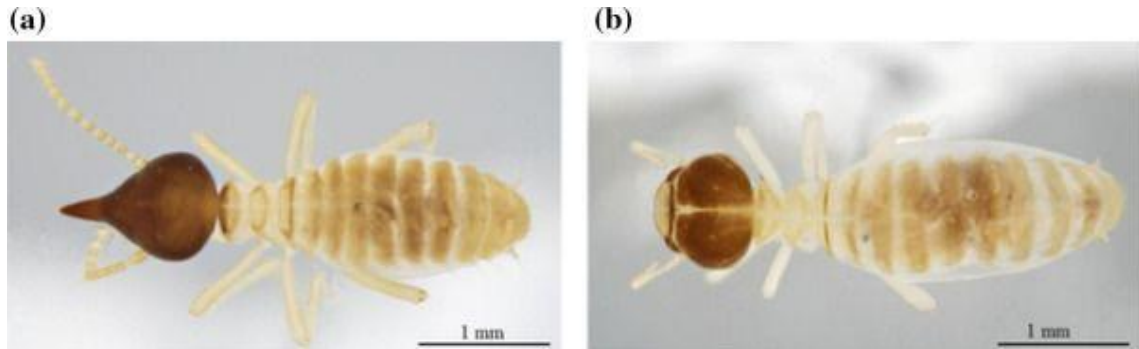
3.2.1 *Nasutitermes corniger*

Nasutitermes corniger pertence à ordem Isoptera e família Termitidae. A capacidade desses organismos de digerir celulose os torna parte importante da comunidade de decompositores de madeira morta, entretanto, quando infestam casas, prédios, madeireiras, estoques de papel, dentre outros tipos de produtos de origem antrópica, eles são capazes de destruir boa parte da produção ou estrutura da construção e com isso causam prejuízos severos à economia (VERMA, 2009; ALVAREZ, 2016). Alguns estudos já demonstram o alto potencial dessa espécie de se proliferar em um imóvel, ou um conjunto de imóvel, nos primeiros dois anos de colonização causando danos severos. O impacto econômico agregado ao *N. corniger* está associado a reparação dos danos causados ao imóvel e bens materiais que também podem ter sido comprometidos, como mobília por exemplo, além dos custos com o tratamento para conter a infestação (ALVAREZ, 2016).

Insetos da espécie *N. corniger* (figura 4a e 4b) constroem suas colônias em árvores, raízes ou no solo e são eu sociais, ou seja, possuem divisão do trabalho e um sistema organizado de castas que compreende um grupo reprodutivo restrito a uma ou mais rainhas, auxiliadas pelos operários estéreis (figura 4a) e um grupo de soldados (figura 4b) para defesa. As castas não reprodutivas possuem caracteres morfológicos bem evidentes, como é o caso dos soldados que apresentam na cabeça uma estrutura bem

desenvolvida, cujo formato pontudo confere a eles o nome de Nasutos (SILVA, 2008; PAIVA *et al* 2011).

Figura 4. *Nasutitermes corniger*, (a) soldado e (b) operário



Fonte: JIMENEZ-FRANCISCO *et al*, 2018

3.3 INSETOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

Pragas agrícolas podem infestar plantações ou armazéns com grãos e farinhas estocados. Nesse caso, elas são responsáveis pelo consumo de boa parte das produções tornando-as impróprias para distribuição e comercialização (LORINI *et al*, 2007; MIKAMI *et al* 2012). Os prejuízos causados nas plantações pela atividade de insetos vão além da competição por alimento e podem incluir a transmissão de patógenos para os vegetais, como é o caso da espécie de pulgões *Aphis gossypii*, praga de algodoeiros do gênero *Gossypium*. A espécie *A. gossypii* pode transmitir uma série de vírus causadores de doenças para as plantações, incluindo a antocianose, vulgarmente conhecida como “vermelhão” (MICHELOTTO e BUSOLI, 2003; WANG *et al*, 2017).

Os dados publicados pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) em 2019, demonstram os potenciais impactos de pragas agrícolas sobre a economia e produção de diversos grãos no Brasil, utilizando modelagens estatísticas, com dados da produção nacional referentes ao período de 2014 até 2017. Dessa forma, o CEPEA estima que ataques pelo “bicudo do algodoeiro” (*Anthonomus grandis*) responderam por prejuízos de 30% sobre a produtividade de algodão. Segundo a modelagem, as culturas de milho também são impactadas por artrópodes, como é o caso das larvas de *Spodoptera* sp., responsáveis por uma redução de 40%

na produção de milho, elevando o preço do produto para os consumidores em quase 13% no mercado interno (CEPEA, 2019).

Insetos do gênero *Sitophilus* também são importantes pragas de grãos armazenados, principalmente milho, e alimentos processados, tais como biscoitos, bolachas e macarrão; sendo assim essa espécie responde por prejuízos agrícolas severos em países em desenvolvimento, podendo chegar a comprometer aproximadamente 30% da produção dos grãos, uma vez que esses insetos reduzem o peso da produção através de seu consumo direto, além de deteriorar as sementes, diminuindo sua qualidade, valor nutritivo e potencial germinativo (BOTTON *et al*, 2005a; ANTUNES, 2011; MIKAM *et al*, 2012; KAMARULZAMAN, 2018). No próximo tópico, a espécie *Sitophilus zeamais* será tratada mais detalhadamente por ser um dos objetos de estudo deste trabalho.

3.3.1 *Sitophilus zeamais*

A espécie *Sitophilus zeamais* (figura 3), conhecida popularmente como gorgulho-do-milho e pertencente a ordem dos coleópteros e família Curculionidae, ataca principalmente grãos de milho (*Zea mays*) armazenados, onde não apenas se alimentam como também realizam reprodução e oviposição (DANHO, 2002).

O ciclo completo de *S. zeamais* inclui as fases de ovo, larva, pupa e adultos e tem duração média de 34 dias, finalizando com a emergência dos insetos adultos de dentro dos grãos perfurados em que as larvas se desenvolveram (BOTTON *et al*, 2005). Os adultos de *S. zeamais* medem entre 2 mm e 3,5 mm, possuem um rostró projetado para frente da cabeça o qual é observado como dimorfismo sexual. A projeção dos machos é curta e grossa e a das fêmeas é mais longa e delgada; ambos apresentam coloração castanha escura com pequenas manchas nos élitros. Cada fêmea consegue ovipositar aproximadamente 280 ovos e o período de oviposição dura cerca de 100 dias. A incubação dos ovos pode oscilar entre 3 e 6 dias até a eclosão das larvas, que possuem coloração amarelada com a porção da cabeça mais escura. As pupas apresentam coloração esbranquiçada (LORINI e SCHENEIDER, 1994).

Figura 3. *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho)



Fonte: bugguide, disponível em: < <https://bugguide.net/node/view/257683> >

3.4 PESTICIDAS E SELETIVIDADE

O uso de pesticidas sintéticos para a proteção de plantações pode causar impactos sobre o ecossistema, devido a sua natureza química. A seletividade é um importante fator quando se fala em defensivos, visto que sua natureza tóxica pode chegar a causar danos sistêmicos aos ecossistemas por afetar organismos que desenvolvem papéis cruciais como polinização e aeração e descompactação do solo, como são realizados por abelhas e minhocas respectivamente (SHORT *et al*, 2021).

Dessa forma a busca por alternativas, tanto de substâncias e compostos como de metodologias alternativas para aplicação e controle de pragas tem se orientado cada vez mais a encontrar soluções mais seletivas para controlar os organismos de interesse (SATPATHY *et al*, 2020).

3.4.1 *Hyalella* sp. como organismo não alvo

Na tentativa de investigar a toxicidade do extrato de folhas de *A. squamosa* contra organismos não alvo, este trabalho avaliou o efeito dessa preparação na sobrevivência do microcrustáceo *Hyalella* sp. (Amphipoda, Malacostraca). Espécies do gênero *Hyalella* são amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos por exemplo para avaliar o impacto da qualidade do sedimento na sobrevivência, desenvolvimento e reprodução desses animais (POYNTON *et al*, 2018).

Figura 5. *Hyalella* sp.



Fonte: acervo do Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) da UFRPE

3.5 CONTROLE QUÍMICO DE INSETOS PRAGA

O aumento da densidade populacional humana tem acarretado no crescimento da demanda mundial por alimentos, alavancando as produções massivas de produtos agrícolas e agropecuários; como consequência tem-se a alta incidência de pragas agrícolas de diversas origens, plantas, fungos e animais (JACOBI *et al*, 2016). Diversos tipos de organismos podem ser considerados pestes: insetos, roedores, fungos e plantas indesejáveis (ervas-daninhas).

A necessidade de controlar as perdas econômicas e os impactos à saúde pública provenientes da proliferação de pragas tem sido realizada através da utilização de pesticidas (KUDSK *et al*, 2018). Por definição, pesticidas são substâncias químicas usadas para controlar populações de organismos indesejados, classificados como pestes, visto que esses causam prejuízos severos, tanto à saúde pública quanto à economia. Devido à sua natureza tóxica e ação inespecífica, essas substâncias podem causar efeitos danosos a organismos que não são o alvo contra o qual o composto está sendo utilizado, incluindo seres humanos (OMS, 2019). Além disso o transporte desses produtos pode ocorrer através de lixiviação, penetrando leitos de rios e até mesmo lençóis freáticos, causando uma série de impactos secundários ao ambiente e a alguns outros organismos (NASCIMENTO, 2016).

Rodrigues *et al* (2018) avaliaram os riscos ambientais do uso de diversos pesticidas em um ambiente estuarino. Essa análise demonstrou níveis elevados de bioacumulação em espécies de bivalves com valor econômico, o que pode acarretar

efeitos deletérios à saúde humana através de biomagnificação, isso é o consumo desses organismos contaminados, além de todos os impactos atrelados à própria dinâmica do ecossistema em questão (MARANHO, 2006; JACOBI *et al*, 2016).

Para Sabarwal *et al* (2018) e Anakwue, (2018) o uso de pesticidas expõe os indivíduos que aplicam os compostos em lavouras a vários riscos de desordem fisiológica; os autores apontaram que essas exposições são responsáveis pelo aumento de incidência de desordens como câncer, doença de Parkinson, Alzheimer e ainda há motivos para crer que o aumento da incidência de doenças cardiovasculares esteja associado a utilização em larga escala de produtos sintéticos.

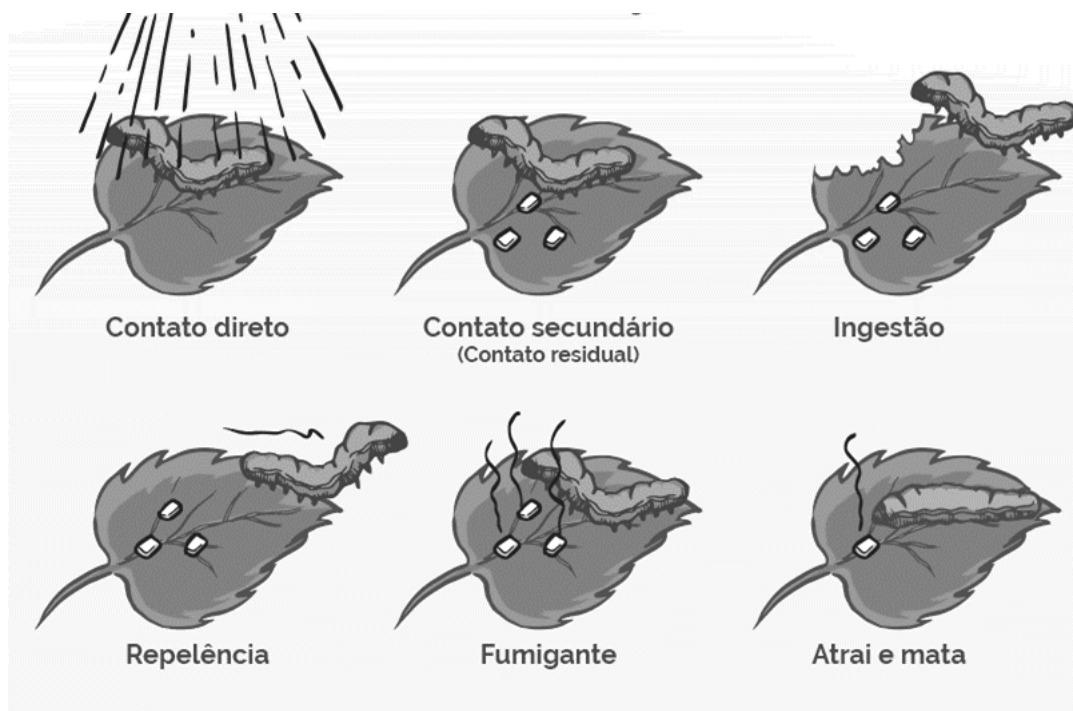
Nesse sentido, a busca por compostos ambientalmente menos nocivos, com utilização mais segura devido a uma ação mais seletiva, um maior grau de biodegradabilidade e menor potencial de bioacumulação tem motivado a cientistas da área de produtos naturais.

3.6 BIOINSETICIDAS

Os reconhecidos impactos ambientais decorrentes do uso de pesticidas sintéticos, além dos prejuízos à saúde humana e à sobrevivência de outros animais tem cada vez mais estimulado a busca por compostos naturais com potencial inseticida (MOSHI e MATOJU, 2017; PINO-OTIN *et al*, 2019). Nesse contexto, os compostos derivados de plantas incluindo proteínas e metabólitos secundários têm sido considerados alternativas promissoras, utilizando-se como material de partida para estudo preferencialmente aquelas plantas que já possuem utilização na medicina popular descrita (MOSHI e MATOJU, 2017; SILVÉRIO *et al*, 2020).

Os insetos podem receber a dose letal do bioinseticida por contato, quando este é absorvido pela quitina, atravessando o exoesqueleto; o contato pode ser direto (por exemplo spray) ou secundário que ocorre quando os insetos incorporam o composto após rastejar em superfícies tratadas (Figura 6) (CORREA e SALGADO, 2011). A toxicidade pode também ocorrer por ingestão ou pelas vias respiratórias (ação fumigante). A ação repelente sem que haja toxicidade direta pode ser mais segura para o homem e para o ambiente, contudo pode não ser tão eficiente, caso o agente seja muito volátil e, conseqüentemente, tenha uma baixa permanência. Adicionalmente, o bioinseticida pode ter ação atraente e causar mortalidade (Figura 5).

Figura 6. Modos de transferência de doses de bioinseticidas.



Fonte: Boas práticas agronômicas, disponível em:

<<https://boaspraticasagronomicas.com.br/artigos/inseticidas>>

Os bioinseticidas integram as estratégias metabólicas para defesa das plantas contra insetos. Estes compostos fazem parte de um metabolismo dividido em primário e secundário (SIMÕES et al., 2010). Carboidratos, lipídeos e proteínas e ácidos nucleicos são definidos como metabólitos primários, os quais estão envolvidos em processos químicos que intervêm diretamente na sobrevivência, no crescimento e na reprodução das plantas (GROENIGEN et al., 2015).

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, geralmente com estrutura complexa de baixo peso molecular e com importantes atividades biológicas, incluindo a função de defesa. São geralmente diferentes entre os grupos de plantas e sua ocorrência está associada a um padrão sazonal (COUTINHO, 2013). São exemplos de metabólitos secundários os compostos fenólicos, os terpenos e os alcaloides. Cada família e espécie de plantas produz um ou uma mistura desses constituintes químicos cuja presença pode ser utilizada como caracteres taxonômicos na classificação dos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2009). A seguir será comentado sobre a atividade de proteínas vegetais e de metabólitos secundários como bioinseticidas.

3.6.1 PROTEÍNAS INSETICIDAS

O longo processo de coevolução ocorrido entre as plantas e seus predadores, onde estratégias de defesa estavam em constante aprimoramento, possibilitou a seleção daqueles vegetais que expressavam proteínas tóxicas para insetos. A diversidade de proteínas e receptores remete à quantidade de mecanismos que podem ser utilizados para provocar a toxicidade nos organismos que se quer combater. Merecem destaque aqui as classes de proteínas lectinas, inibidores de proteases, inibidores de α -amilase, ureases entre outras capazes de gerar efeitos letais ou subletais para controlar a população de pragas (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Presentes principalmente em sementes e tubérculos, os inibidores de proteases são um importante grupo de proteínas que atuam de forma competitiva sobre as proteases, gerando uma disputa com o substrato pelo sítio ativo da enzima e impedindo a formação do complexo enzima-substrato. Os inibidores de tripsina são interessantes exemplos dessa classe de compostos com ampla atividade biológica devido à ocorrência ubíqua da enzima tripsina nos seres vivos, inclusive nos insetos. A tripsina possui importância na digestão e absorção de nutrientes e, portanto, sua inativação resulta no comprometimento da nutrição do organismo, que pode morrer por inanição (DANTZGER *et al*, 2015).

Experimentos com flores da planta pantropical *Moringa oleifera* (Moringaceae), a qual possui aplicações variadas inclusive na gastronomia, revelaram que uma fração rica em proteínas e contendo atividade inibidora de tripsina causou mortalidade de *N. corniger* e inibiu o crescimento da microbiota intestinal dos insetos, o que pode ter dificultado a digestão e absorção de celulose (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Outro estudo que também demonstrou o potencial inseticida dos inibidores de proteases foi realizado por Dantzger *et al* (2015) que purificaram um inibidor a partir de sementes de *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae) e trataram os insetos da ordem Lepidoptera, *Anagasta kuehniell* e *Diatraea saccharalis*. O tratamento causou mortalidade de larvas e, em concentrações subletais, redução do peso das mesmas, sugerindo danos aos processos de digestão e absorção de nutrientes, bem como atraso no desenvolvimento.

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos de maneira reversível e específica, estando estes livres ou conjugados, ou até mesmo fazendo parte da

superfície de células. As lectinas são reportadas como agentes cicatrizantes, imunomoduladores, antibacterianos, antifúngicos, antivirais e inseticidas (COELHO *et al*, 2018). A capacidade inseticida das lectinas já foi observada contra diferentes ordens como Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera. A afinidade por carboidratos permite que as lectinas se associem a glicoproteínas ou outras estruturas glicosadas no organismo dos insetos, causando desordem nos processos fisiológicos e provocando efeitos deletério sobre fecundidade, nutrição, duração de estágios evolutivos e até mesmo reduzindo a taxa de sobrevivência (MACEDO *et al*, 2015).

Zapata *et al* (2016), purificaram lectinas do bulbo de *Phycella australis* (Amaryllidaceae) através de cromatografia de afinidade com manose e cromatografia de troca iônica e avaliaram seu efeito sobre os parâmetros reprodutivos, a nutrição e o comportamento alimentar de pulgões das espécies *Acyrtosiphon pisum* e *Myzus persicae*. A lectina purificada de *P. australis* causou mortalidade de ambas as espécies de pulgão, mas apenas apresentou efeito deterrente alimentar para *A. pisum*.

A lectina isolada de sementes de *Moringa oleifera* exerceu atividade deletéria sobre mosquitos *A. aegypti*. Estudos revelaram que larvas desse mosquito, quando expostas a fração proteica e preparação aquosa de extratos de semente de moringa, possuem um retardo no seu desenvolvimento, além disso as fêmeas submetidas ao tratamento exibiram redução no ganho de peso além de redução em relação a parâmetros de fertilidade, como oviposição (DE SANTANA SILVA *et al*, 2019).

Sitophilus zeamais também sofre com a atividade das lectinas. As proteínas presentes em extrato salino de folhas de *Schinus terebinthifolius*, além da própria fração proteica dessa preparação, exerceram efeitos sobre a sobrevivência e nutrição desses insetos. A inanição pareceu ser a principal causa de mortalidade no experimento realizado por Camaroti *et al* (2018), em decorrência de um forte efeito deterrênte observado ao longo do ensaio.

A atividade inseticida de lectinas tem sido atribuída: (1) à resistência à atividade proteolítica no intestino dos insetos; (2) à interação com componentes da membrana peritrófica, alterando as suas propriedades; (3) à ligação entre as lectinas e células do epitélio intestinal dos insetos, danificando o potencial transmembrana e prejudicando a absorção de nutrientes; (4) à complexação com o alimento ingerido impedindo sua digestão e absorção e (5) à ligação com moléculas de enzimas digestivas dos insetos, causando desbalanço da sua atividade (PAIVA *et al.*, 2012; NAPOLEÃO *et al.*, 2018).

3.6.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são capazes de exercer mudanças fisiológicas em organismos através de interações com células e tecidos variados impedindo ou dificultando a nutrição, atrapalhando o processo de maturação sexual e reprodução, além de comprometer o desenvolvimento embrionário e acarretar em surgimento de malformações (CHOWAŃSKI *et al*, 2016).

Souza *et al* (2018) realizaram testes com óleos essenciais de duas espécies de plantas do gênero *Alpinia* (Zingiberaceae), com o objetivo de investigar os efeitos inseticidas e repelentes contra *Rhodnius nasutus*, uma das espécies que atuam como vetor da doença de Chagas. O estudo indicou o potencial inseticida dos óleos essenciais de *Alpinia zerumbet* e *Alpinia vittata* que causaram mortalidade de 73,3% e 83,3% para *R. nasutus*, respectivamente, sob a concentração de 125 µg/µL. O mesmo estudo também identificou que na preparação de *A. zerumbet* havia uma concentração elevada de terpinen-4-ol, enquanto a preparação de *A. vittata* possuía o β-pineno como um dos compostos majoritários. Ao expor os insetos a terpinen-4-ol a 25 µg/µL e β-pinene à 44 µg/µL, os autores registraram uma mortalidade de 100% em *R. nasutus*, o que sugere que estes são os princípios inseticidas nos óleos essenciais investigados.

Ainda se tratando de atividade inseticida, os óleos essenciais de *Lippia grata* se mostraram eficientes em inibir atividade de proteínas importantes como amilases e acetilcolinesterase em larvas de mosquitos *A. aegypti*. Esse efeito se dá por conta da constituição desses óleos, que possuem moléculas provenientes do metabolismo secundário da planta em questão (FELIX *et al*, 2021).

3.7 *Annona squamosa*

Annona squamosa, conhecida popularmente como pinha, fruta pinha ou fruta do conde, é uma planta pertencente à família. As árvores dessa espécie (Figura 7A) são grandes, podendo chegar até 8 metros de altura. Seus frutos (Figura 7B) são originados a partir de inflorescências pequenas e são redondos, em forma de cunha; têm importância comercial e são consumidos em diversas regiões do país. A área de ocorrência das populações de *A. squamosa* abrange principalmente a América do sul e oeste da Índia, sendo encontrada no Brasil em cultivares amplamente difundidos pelo país (MA *et al*, 2017; CHEN *et al*, 2011; CORDEIRO *et al*, 2000).

Figura 7. Árvore (A) e frutos com sementes (B) de *Annona squamosa*



Fonte: MA *et al*, 2017

Existem registros do uso de *A. squamosa* na medicina tradicional Indiana há centenas de anos para tratar náuseas e vômito, além do uso como tônico muscular. Na América Latina, a medicina popular utiliza preparações de folhas de *A. squamosa* para reduzir os níveis de ácido úrico, enquanto na China há relatos de eficácia no tratamento de furúnculos, úlceras e prolapsos em crianças que utilizaram infusões de folhas (MA *et al*, 2017). O painel de usos etnofarmacológicos de *A. squamosa* faz dela um interessante objeto para investigações científicas (MOSHIE MOTOJU, 2017).

As pesquisas realizadas por Kalidini *et al* (2015) utilizando extratos de *A. squamosa* com diferentes solventes revelaram que as preparações avaliadas apresentaram efeitos inibitórios sobre o crescimento de colônias de fungos das espécies: *Alternaria alternate*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Microsporium canis* e *Aspergillus nige* (KALIDINI *et al*, 2015). A atividade antibacteriana de extratos de *A. squamosa* também foi relatada em estudos realizados por Patel e Kumar (2008). Os autores utilizaram quatro preparações de extratos de folhas (aquoso, metanólico, clorormico e éter de petróleo) que foram ativas contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Muito ainda pode ser revelado sobre *A. squamosa* e a sua composição de metabólitos secundários e proteico, além de seu potencial biotecnológico (MA *et al*, 2017). Nesse sentido, o presente trabalho de conclusão de curso teve como hipótese que *A. squamosa* é fonte de metabólitos primários e/ou secundários com atividade inseticida contra pragas de importância média e/ou econômica. Dessa forma, um extrato salino de folhas de *A. squamosa* foi caracterizado quanto à presença de proteínas e metabólitos secundários, bem como quanto à toxicidade para larvas de *A. aegypti* e adultos de *N. corniger* e *S. zeamais*.

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

Todos os procedimentos descritos neste trabalho foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o registro AAF0F08. Folhas de *Annona squamosa* foram coletadas em dezembro de 2018 (estação seca) no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA, Pernambuco, Brasil). A identificação foi realizada por especialista no Herbário Dárdano de Andrade-Lima (IPA, Pernambuco, Brasil) e uma exsiccata foi depositada (Nº 93899). Após coletadas, as folhas foram secas ao ar durante 4 dias ($28 \pm 5^\circ \text{C}$) e trituradas em liquidificador para obtenção de uma farinha. A farinha de folhas secas (10 g) foi misturada com uma solução de NaCl 0,15 M (100 mL) por 16 horas, utilizando um homogeneizador magnético. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro e a solução livre de material em suspensão correspondeu ao extrato de folhas de *A. squamosa*. O extrato foi mantido em refrigerador a -4°C até a sua utilização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE FOLHAS DE *A. squamosa*

4.2.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, PRESENÇA DE LECTINA E INIBIDORES DE TRIPSINA

O extrato foi avaliado quanto à concentração de proteínas seguindo o método descrito por Lowry *et al* (1951), utilizando uma curva padrão de albumina de soro fetal bovino com valores entre 0 e 500µg/mL.

A presença de lectinas no extrato foi investigada através do ensaio de atividade hemaglutinante (AH) de acordo com Oliveira *et al* (2016). A capacidade do extrato de aglutinar eritrócitos de coelho glutarizados (BING *et al.*, 1967) foi avaliada em microplaca e a AH foi definida como o inverso da maior diluição do extrato capaz de promover total hemaglutinação. A atividade hemaglutinante específica (AHE) correspondeu à razão entre a AH e a quantidade total de proteínas (mg) no ensaio. O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE aprovou o método de coleta dos eritrócitos (processo 23076.033782/2015-70).

A presença de atividade inibidora de tripsina no extrato foi determinada em placa de microtitulação seguindo o método descrito por Pontual *et al.* (2014). Uma solução de tripsina bovina em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo CaCl₂ 0,02 M (5 µL, 0,1 mg/mL) foi adicionada a 5 µL do substrato N-α-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). A mistura foi incubada com o extrato a 1,2 mg. O volume de cada poço foi ajustado para 200 µL com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M. Controles do substrato (ausência da enzima e inibidor), da amostra (ausência de enzima e substrato) e controle 100% (ausência do inibidor) foram realizados. Após 30 min de incubação, a hidrólise do BAPNA foi acompanhada pela medida da absorbância a 405 nm. Uma unidade de atividade inibidora de tripsina correspondeu à quantidade de extrato que causa um aumento de 0,01 na absorbância em relação ao controle (PONTUAL *et al.*, 2014).

4.2.2 PRESENÇA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.2.2.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O extrato de folhas (1 mg) foi submetido à liofilização durante 48 h e em seguida diluído em metanol P.A (1 mL). Todos os padrões foram utilizados na concentração de 0,5 mg/mL. O extrato e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel[®], Alemanha). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Tabela 1). A cuba foi saturada durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 0,5 cm e com uma distância de 0,5 cm entre elas e das bordas das placas. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 5 cm. As amostras foram aplicadas a 0,5 cm da origem e com término 0,5 cm do final da placa. Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível, em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Tabela 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

4.2.2.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O extrato (10 mg) foi liofilizado durante 48 h e diluído com água destilada até o volume de 25 mL. A solução foi filtrada para vials HPLC com auxílio de filtros de PVDF (0,45 µm). A análise por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 350 nm. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 26 ± 1 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa de

gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 5-20% de B; 10-14 min, 20-25% de B; 14-18 min, 25-40% de B; 18-25 min, 40-80% de B; 25-30 min, 80% de B; 30-34 min, 80-5% de B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

Tabela 1. Sistemas, reveladores e padrões utilizados na investigação do extrato de folhas de *A. squamosa* quanto à presença de metabólitos secundários.

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Taninos Hidrolisáveis		FeCl ₃	Ác. Gálico
Taninos condensados	90:5:5	VC	Catequina
Flavonoides			Quercetina
Derivados Cinâmicos		AlCl ₃	Ác. Cafeico
Terpenos e Esteroides	70:30	LB + Δ	β-Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	LB + Δ	Escina
Quinonas	50:6,75:5	HNO ₃ + KOH 10%	Senosídeo A
Alcaloides	50:6,75:5	Dragendorff	Atropina

Sistemas: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 – Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:6,75:5 – Acetato de etila: metanol: água.

Reveladores: FeCl₃: cloreto férrico a 5% em metanol; VC: Vanilina clorídrica; AlCl₃: cloreto de alumínio a 5% em metanol; LB: Lieberman-Burchard; Δ: Aquecimento; HNO₃: ácido nítrico; KOH: hidróxido de potássio.

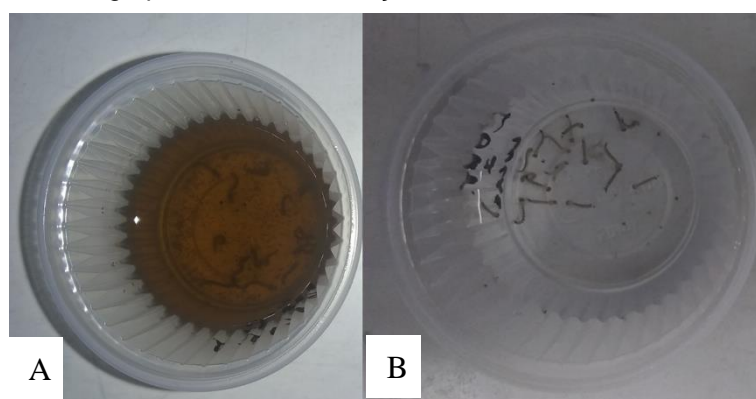
Os teores de derivados cinâmicos, ácido clorogênico e rutina encontrados no extrato de folhas de *A. squamosa* foram calculados utilizando a equação da reta do padrão de rutina (> 94%, Sigma-Aldrich®) e do padrão de ácido clorogênico (> 97%, Sigma-Aldrich®).

4.3 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DO EXTRATO DE FOLHAS DE *A. squamosa*

4.3.1 ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA *A. aegypti*

Larvas de *A. aegypti* foram obtidas através de colônias mantidas ($26^{\circ}\text{C} \pm 1$) no Laboratório de Ecologia Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), alimentadas com ração para gatos (Whiskas®). O efeito do extrato sobre larvas no quarto estágio de desenvolvimento (L₄) foi investigado utilizando o método descrito por Navarro *et al* (2003). Vinte L₃ foram colocadas em recipientes plásticos contendo 20mL do extrato em concentrações variando de 0,9 a 3% (m/v), 12,15,18 e 20ml de extrato diluídos em água (Figura 8A). Os ensaios foram conduzidos no escuro entre 25–27 °C durante 48 h, sem a adição de alimento. As larvas foram consideradas mortas quando não foram capazes de responder a estímulos ou quando não realizaram movimentos em direção à superfície da solução (Organização Mundial de Saúde, 1981). No grupo controle, as larvas foram mantidas em água destilada (Figura 8B). Três ensaios independentes foram realizados em triplicata. A concentração de extrato necessário para matar 50% das larvas (CL₅₀) foi calculada por análise de probitos com intervalo de confiança de 95 % utilizando o programa SPSS 8.0 para Windows.

Figura 8. Aspecto do ensaio de atividade larvicida do extrato de folhas de *A. squamosa* sobre *Aedes aegypti* (A: larvas expostas ao extrato de folhas na concentração de 0,9%, 12ml de extrato. B: grupo controle sem adição de extrato de folhas.



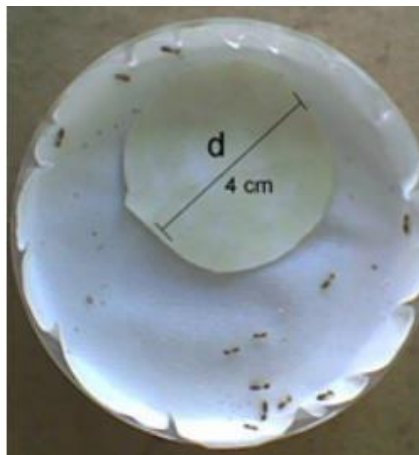
Fonte: acervo pessoal

4.3.2 EFEITO SOBRE OPERÁRIOS E SOLDADOS DE *N. corniger*

Pedaços de cupinzeiro foram coletados em fragmento de Mata Atlântica localizado nos arredores do campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e levados imediatamente para o Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional da UFRPE, onde o ensaio já estava pré-montado.

O ensaio de atividade inseticida contra *N. corniger* seguiu a metodologia sugerida por Kang *et al* (1990) e foi realizado em placas de Petri com o fundo completamente coberto por papel filtro. Em seguida, discos de papel filtro de 4cm de diâmetro foram embebidos com solução salina 0,15M (solução controle) ou com o extrato de folhas de *A. squamosa* (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 e 1 mg/mL) (Figura 9). Vinte insetos foram adicionados a cada placa, sendo 16 operários e 4 soldados. O experimento foi realizado em quintuplicata e mantido a $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ no escuro. A sobrevivência dos insetos foi registrada diariamente até que todos os insetos do controle estivessem mortos.

Figura 9. Aspecto do ensaio de atividade inseticida contra *N. corniger*



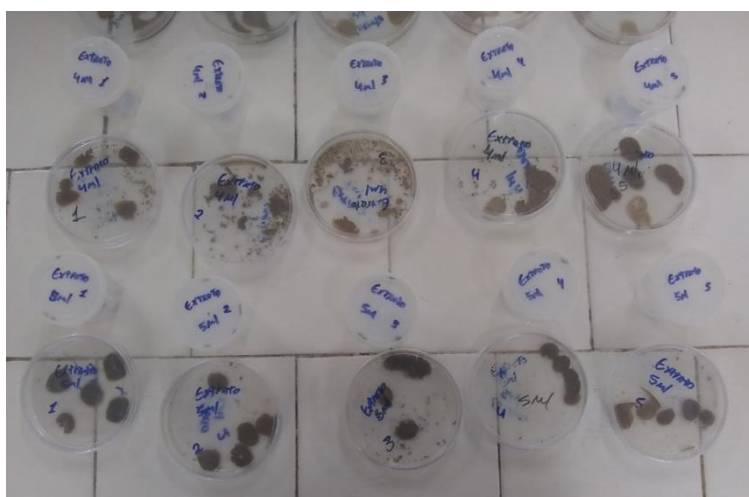
Fonte: Almeida *et al* (2016)

4.3.3 EFEITO SOBRE *Sitophilus zeamais* ADULTOS

Colônias de *S. zeamais* foram mantidas no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional da UFRPE. A colônia foi criada na temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em recipientes de vidro fechados com tecido fino do tipo TNT para permitir a aeração. A dieta alimentar consistiu de grãos de milho, selecionados quanto o tamanho e à integridade.

Discos de farinha foram preparados de acordo com o método de Xie *et al.* (1996) modificado por Liu *et al.* (2007). Para cada bioensaio, uma alíquota da solução-estoque do extrato foi adicionada a uma mistura constituída por 2,0 g de farinha de trigo e o volume completado para 5 mL utilizando NaCl 0,15 M. O extrato foi avaliado nas concentrações de 15 a 75 mg/g de farinha de trigo. No tratamento controle, solução de NaCl 0,15 M foi adicionado. A mistura foi homogeneizada para obter uma suspensão e, em seguida, alíquotas de 200 µL foram medidas utilizando micropipetas acopladas a ponteiras descartáveis com uma abertura alargada obtida através do corte de cerca de 1 cm a partir da ponta mais estreita utilizando lâmina de barbear. Cinco alíquotas de 200 µL foram dispostas em placa de Petri para formar discos e postos para secar a 28 °C por 24 h. Ao final, 20 insetos foram transferidos para a placa. Os bioensaios foram realizados em quintuplicata de cinco experimentos independentes e conduzidos no escuro a 28 ± 2 °C. Após 7 dias, foi registrada a taxa de mortalidade dos insetos. A Figura 10 mostra o aspecto do ensaio de toxicidade por ingestão.

Figura 10. Aspecto do ensaio para investigação da toxicidade por ingestão do extrato de folhas de *A. squamosa* para *S. zeamais* adultos.



Fonte: acervo pessoal

Para determinação do efeito do extrato sobre os parâmetros nutricionais de *S. zeamais*, foram realizados ensaios conforme descritos acima e os pesos dos discos de farinha e dos grupos de vinte indivíduos foram determinados antes do início dos experimentos e após 7 dias. Os seguintes índices nutricionais foram calculados da seguinte forma:

a. Taxa de crescimento relativo (indica em quantas vezes o valor da biomassa inicial dos insetos aumentou por dia):

$$\text{Taxa de Crescimento Relativo} = \frac{\text{Biomassa final (mg)}}{\text{Biomassa inicial (mg)} \times \text{Tempo (dias)}}$$

b. Taxa de consumo relativo (indica a quantidade diária de alimento que foi ingerida por miligrama de biomassa do inseto):

$$\text{Taxa de Consumo Relativo} = \frac{\text{Massa Final de alimento (mg)} - \text{Massa Inicial de alimento (mg)}}{\text{Biomassa do Inseto (mg)} \times \text{Tempo (dias)}}$$

c. Eficiência de conversão do alimento ingerido (%) (indica o quanto de massa ingerida foi convertido em biomassa dos insetos):

$$\text{Eficiência na conversão de alimento ingerido (\%)} = \frac{\text{Biomassa Final do inseto (mg)} - \text{Biomassa Inicial do inseto (mg)}}{\text{Massa final de alimento (mg)} - \text{Massa inicial de alimento (mg)} \times 100}$$

O índice de deterrência alimentar (IDA) foi determinado através da equação:

$$\text{IDA} = \frac{[100 \times C - T]}{C}$$

onde C corresponde à massa ingerida no controle e T à massa ingerida no teste.

4.4 TOXICIDADE DO EXTRATO DE FOLHAS DE *A. squamosa* PARA ESPÉCIE NÃO-ALVO

O ensaio de toxicidade aguda contra o microcrustáceo de água doce *Hyalella* sp. (Amphipoda) (Figura 10) foi realizado na tentativa de investigar a ação do extrato sobre organismos não-alvo.

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Comportamento Animal da UFRPE. Os microcrustáceos foram mantidos em recipientes plásticos com água de torneira a 25°C ± 1 e pH 6,1 e alimentados com

microalgas e ração comercial de peixe macerada (Alcon®). Dez indivíduos de *Hyalella* sp. foram separados dos juvenis com o uso de duas peneiras de abertura de malha de 200µm e 63µm respectivamente, afim de selecionar os organismos juvenis. Em seguida foram preparadas soluções do extrato de folhas de *A. squamosa* diluído em água de cultivo para concentrações finais variando de 1,4 a 2,4% (m/v). Cada tratamento foi realizado em frascos de vidro de 20ml e o pH de cada solução de tratamento foi ajustado para 7,0 utilizando solução de NaOH.

Os ensaios foram realizados em triplicata e mantidos por 48 horas a 25°C ± 1 e fotoperíodo de 12:12, claro:escuro. Após as 48 horas a taxa de mortalidade foi determinada e os animais foram separados da solução através do uso de uma peneira de 200µm, e o conteúdo dos recipientes de vidro foi submetido à análise de condições abióticas (pH e oxigênio dissolvido) com o uso de medidor multiparâmetros para análise de água – KR8405 (Akron®), seguindo instruções do fabricante.

4.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *A. squamosa* SOBRE O pH E TÉOR DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO NA ÁGUA

Na tentativa de fornecer *insights* a respeito do mecanismo da ação do extrato sobre *Hyalella*, o ensaio descrito acima foi repetido na ausência dos animais e utilizando o extrato em concentrações variando de 1,4 a 2,4 % (m/v). Foram então determinados os valores de pH e oxigênio dissolvido antes (T0) e após 48 horas (T48 h) a 25°C ± 1 e fotoperíodo de 12:12, claro:escuro. Foram utilizados como controle a solução de cultivo (controle 1) e água destilada (controle 2).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média entre as replicatas ± desvio padrão e as diferenças entre os tratamentos foram determinadas utilizando o teste T de Student, considerando significativos valores de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas de três experimentos independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi estimulado pela necessidade de novos agentes inseticidas que se acumulem menos no ambiente e que sejam menos tóxicos para organismos não-alvo quando comparados aos inseticidas sintéticos atualmente utilizados.

A solução de NaCl a 0,15 M foi eficiente em solubilizar proteínas das folhas de *A. squamosa*, uma vez que foi detectada uma concentração proteica de 22,9 mg/mL no extrato. Quando, à uma solução contendo proteínas, é adicionada uma pequena quantidade de um sal, as cargas provenientes da dissociação do sal passam a interagir com as moléculas de proteínas reduzindo a interação entre elas e prevenindo a formação de agregados proteicos. Através desse fenômeno conhecido como *salting in*, ocorre um aumento na solubilidade das proteínas em meio aquoso (XU *et al*, 2015). Uma vez que um conteúdo de proteínas foi encontrado no extrato, este foi avaliado quanto às atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina.

O ensaio de atividade hemaglutinante revelou que o extrato foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho com AHE de 21.333, sugerindo a presença de lectinas na preparação. No ensaio de atividade inibidora de tripsina, foi detectado que a presença do extrato reduziu a habilidade da enzima em hidrolisar o substrato BApNA com atividade específica de 15,6 U/mg.

A análise fitoquímica por CCD indicou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas, antraquinonas, terpenos e esteroides. Esse resultado foi confirmado na análise por CLAE (Figura 11) que evidenciou picos correspondentes à presença de derivados cinâmicos (Figura 11 C) (máximos de absorção em 217 e 329 nm, pico 1, correspondente à presença do ácido clorogênico (Figura 11 B); e, 216 e 326 nm, pico 2) e flavonoides (Figura 11 D) (máximos de absorção em 202, 257 e 356 nm, pico 3, correspondente à presença de rutina). O cromatograma do extrato e dos padrões rutina e ácido clorogênico, bem como os espectros de varredura dos picos evidenciados no extrato são mostrados na figura 11. Os teores de derivados cinâmicos, ácido clorogênico e rutina encontrados no extrato de folhas de *A. squamosa* foram determinados estão mostrados na tabela 2.

Uma vez que a caracterização química do extrato de folhas de *A. squamosa* indicou a presença de metabólitos que tem sido relatado como potenciais agentes inseticidas, essa preparação foi avaliada quanto ao efeito sobre *A. aegypti*, *N. corniger* e *S. zeamais*.

Tabela 2. Os teores de derivados cinâmicos, ácido clorogênico e rutina encontrados no extrato de folhas de *A. squamosa*.

Amostra	Ácido clorogênico	Derivado cinâmico*	Rutina
Extrato de <i>A. squamosa</i>	0,023 g% (0,31%)	0,012 g% (0,63%)	0,53 g% (0,14%)

*Calculado como ácido clorogênico. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como média (desvio padrão relativo).

O ensaio larvicida revelou que L₃ de *A. aegypti* foram sensíveis ao tratamento com o extrato, o qual causou mortalidade significativa ($P < 0,0001$) das larvas em relação ao controle. O efeito larvicida do extrato mostrou uma curva dose-dependente (Figura 12) e os valores de CL₂₀, CL₅₀, CL₈₀ e CL₁₀₀ são mostrados na tabela 3.

Figura 11. Análise fitoquímica através de CLAE do extrato de folhas de *A. squamosa*. (A) Cromatograma do extrato e dos padrões rutina e ácido clorogênico realizado em CLAE num sistema HPLC com comprimento de onda fixado em 350nm; as separações cromatográficas foram obtidas utilizando uma coluna de C-18 e fase móvel de água ultra pura e metanol. Espectros de varredura dos picos observados na amostra (B) Ácido clorogênico, (C) Derivado cinâmico e (D) Rutina.

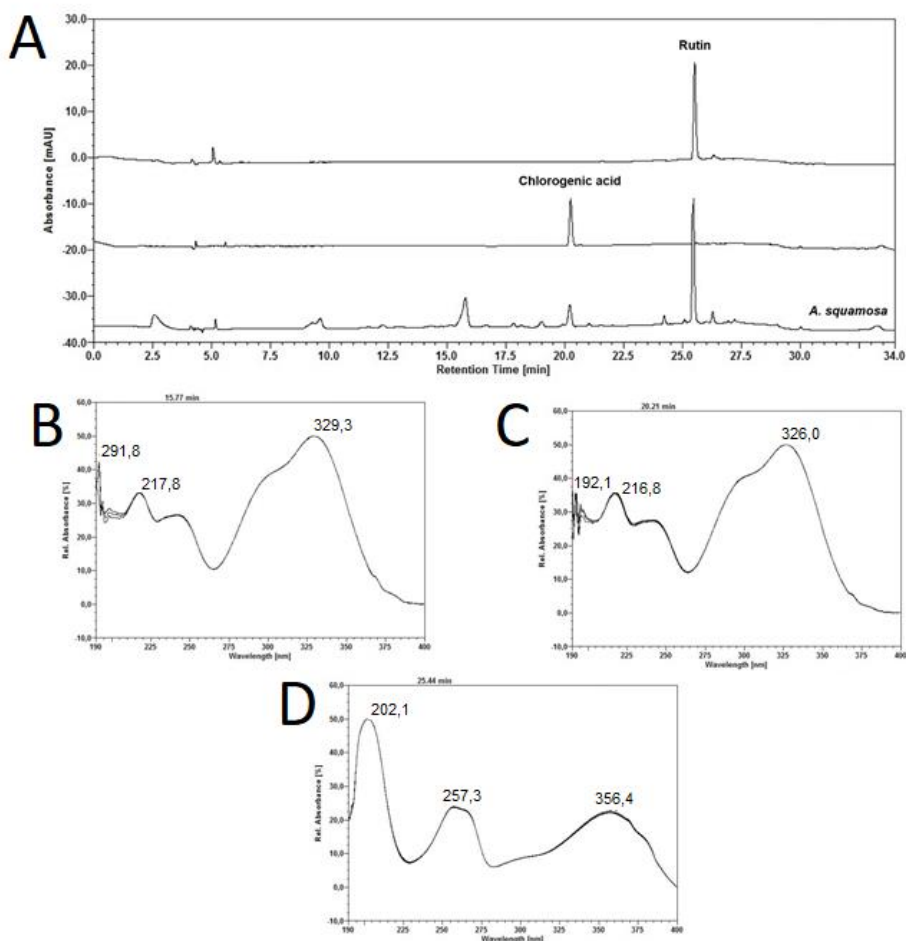


Figura 12. Efeito do extrato de folhas de *Annona squamosa* na sobrevivência de larvas de *A. aegypti* em 48 horas. A linha azul corresponde à média entre três replicatas e as linhas tracejadas indicam o intervalo de confiança a 95%.

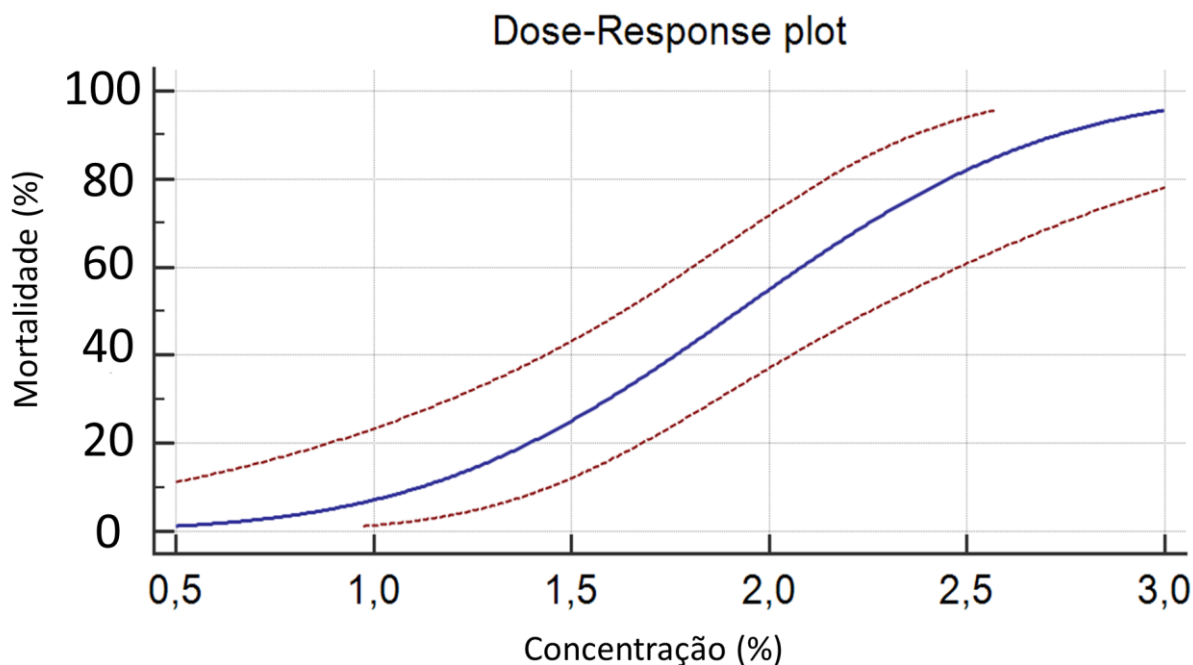


Tabela 3. Atividade larvicida do extrato de folhas de *A. squamosa* contra L₄ de *A. aegypti*.

Amostra	Concentração letal (% m/v)			
	CL ₂₀	CL ₅₀	CL ₈₀	CL ₁₀₀
Extrato de folhas de <i>A. squamosa</i>	1,39	1,9	2,4	3,15

Procópio et al (2015) reportaram que o extrato salino de folhas de *Schinus terebinthifolia* obtido em NaCl 0,15 M também causou mortalidade de larvas de *A. aegypti*, tendo observado a CL₅₀ na concentração de 0,62% para larvas não alimentadas, menor que a CL₅₀ encontrada para *A. squamosa*. Os autores demonstraram que o extrato causou danos severos às células da parede gastrointestinal das larvas e mostraram que a presença de derivados cinâmicos estava relacionada com a atividade larvicida. Nesse sentido, a presença de derivados cinâmicos no extrato de folhas de *A. squamosa* pode também ter contribuído para o efeito larvicida do extrato.

Metabólitos da classe dos flavonoides também tem sido apontado como princípio ativo na atividade inseticida através de mecanismos similares aos dos derivados cinâmicos. Os danos provocados no trato gastrointestinal das larvas de Lepidoptera, por exemplo, induzem mudanças morfológicas no tecido digestivo, dificultando a absorção de nutrientes (CRUZ *et al* 2017). Sob essa óptica, a presença do flavonoide rutina no extrato de folhas de *A. squamosa* pode também estar envolvida no efeito larvicida contra *A. aegypti*.

Oliveira *et al* (2016) purificaram lectinas de sementes de *M. oleifera* que se mostraram tóxicas para larvas e ovos de *A. aegypti* de forma dose dependente, encontrando a CL₅₀ para as larvas em 0,89mg/mL e para ovos na concentração de 0.14 mg/mL. Pontual *et al* (2014) descreveram que o inibidor de tripsina das flores de *M. oleifera* é um agente inseticida por matar larvas, encontrando CL₅₀ dessa proteína para larvas recém eclodidas em 0,3mg/mL. Além disso Pontual *et al* (2014) ainda apontam que a presença do inibidor de tripsina foi responsável por reduzir a proliferação da microbiota intestinal das larvas, o que também pode ser considerado um fator de toxicidade. As atividades de lectinas e inibidores de tripsina encontradas no extrato de folhas de *A. squamosa* podem também ter contribuído para o efeito larvicida através do mecanismo de inibição de proteases.

Gutierrez *et al* (2014) mostraram que os extratos metanólicos de folhas de *Tinospora rumphii*, *Citrus grandis* e *Jatropha curcas* exerceram atividade larvicida contra *A. aegypti* com valores de CL₅₀ de 10, 11 e 43 mg/mL, respectivamente. É interessante perceber que valor da CL₅₀ do extrato de folhas de *A. squamosa* (1,9%, equivalente a 19 mg/mL) é maior que os valores reportados para *T. rumphii* e *C. grandis*, porém, é menor que aquele descrito para *J. curcas*.

Apesar dos resultados promissores contra larvas de *A. aegypti*, o ensaio de atividade termiticida revelou que o extrato de folhas de *A. squamosa* não interferiu significativamente ($P > 0,0001$) na sobrevivência de soldados e operários de *N. corniger*. Esse dado parece interessante por sugerir algum grau de seletividade na ação do extrato.

Quando o extrato de folhas de *A. squamosa* foi oferecido aos adultos de *S. zeamais*, uma significativa ($p < 0,05$) mortalidade (51,2 a 63,5%) em relação ao controle foi detectada (Tabela 4). Contudo, não houve diferenças significativas entre as taxas de mortalidade registradas nos tratamentos com o extrato.

Interessantemente, ao avaliar o consumo da dieta oferecida aos adultos de *S. zeamais*, observou-se um resultado similar em todos os tratamentos com o extrato de folhas de *A. squamosa* correspondendo a um forte efeito deterrente alimentar, uma vez que o peso da dieta não foi alterado entre o início e o fim do experimento. Esse dado sugere que os insetos podem ter morrido por inanição devido à ausência de ingestão de alimentos durante os 7 dias de experimento. Em adição, o efeito deterrente alimentar pode ser a causa da ausência de diferença significativa nas taxas de mortalidade (Tabela 4) entre os tratamentos com o extrato, levando-se em consideração que a condição de inanição ocorreu igualmente em todos esses grupos.

Tabela 4. Efeito do extrato de folhas de *A. squamosa* na sobrevivência de *S. zeamais* adultos.

Preparações	Mortalidade (%)
Controle	7,4 ± 2,1a
15 mg/g	57,4 ± 4,3b
30 mg/g	51,2 ± 6,3b
60 mg/g	53,8 ± 11,2b
75 mg/g	63,5 ± 11b

Letras diferentes indicam diferenças significativas utilizando o teste T de Student ($p < 0,05$).

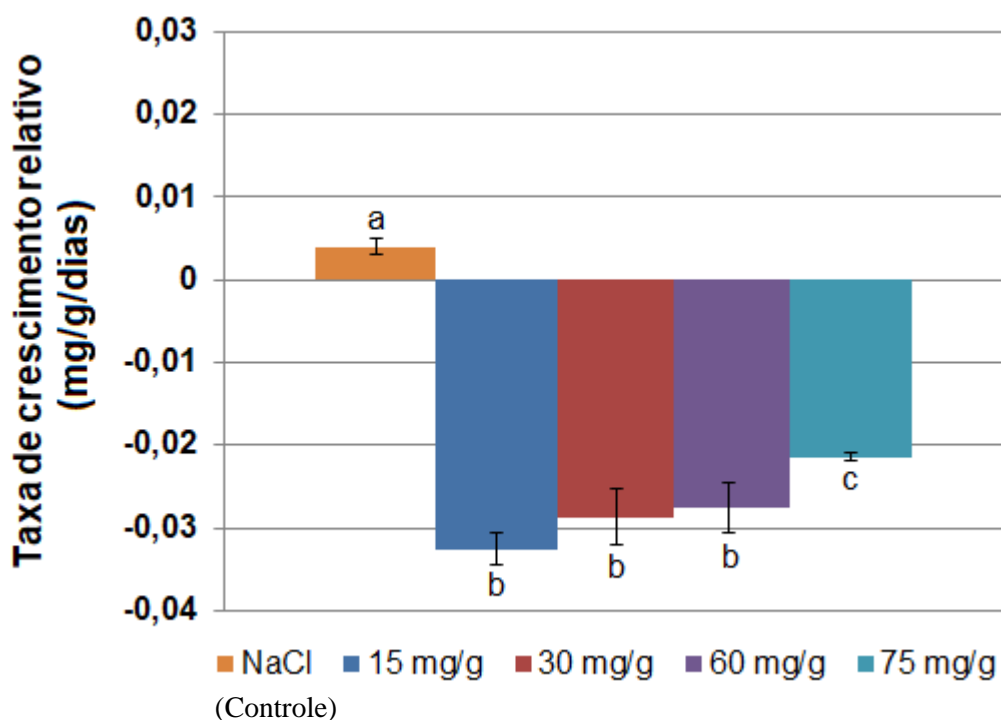
Devido à ausência de consumo da dieta pelos insetos tratados com o extrato, não foi possível determinar a taxa de consumo relativo e a eficiência de conversão do alimento ingerido. Contudo, o cálculo da taxa de crescimento relativo revelou valores negativos para os grupos tratados com o extrato, ao contrário do controle, indicando que eles apresentaram perda de peso (Figura 13). Esse resultado corrobora com o efeito deterrente do extrato e fortalece a hipótese que os a mortalidade dos insetos ocorreu por inanição.

Camaroti *et al* (2018) avaliaram os parâmetros nutricionais de *S. zeamais* adultos alimentados com o extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* e mostraram um efeito anti-nutricional relacionado com a presença de lectina no extrato entre as concentrações de 1mg/g e 5mg/g, de forma dose dependente.

O extrato metanólico de *Melicope subunifoliolata* também apresentou efeito deterrente alimentar para *S. zeamais* adultos e este foi relacionado com a presença

de flavanoides polioxigenados; similar ao extrato de folhas de *A. squamosa*, essa preparação também foi tóxica para larvas de *Aedes aegypti* (HO *et al*, 2003).

Figura 13. Taxa de crescimento relativo de *S. zeamais* adultos alimentados com o extrato de folhas de *A. squamosa* durante 7 dias.



Letras diferentes indicam diferenças significativas utilizando o teste T de Student ($p < 0,05$)

Tem sido reportado que preparações de plantas contendo ácido clorogênico geralmente apresentam forte deterrência alimentar sobre insetos. A literatura sugere que a presença dessa molécula em folhas acarreta em rejeição desse alimento e, conseqüentemente, perda de peso e atraso no desenvolvimento dos insetos, prevenindo que a planta sofra herbivoria. Esses efeitos foram previamente observados em *Heliothis zea* (Lagarta-da-espiga), *Spodoptera litura* (Curuquerê Oriental) e algumas espécies de besouro-da-folha, *Galerucella lineola*, *Lochmae caprae*, *Phrotara polaris* e *Plagioderma versicolor* (VADASSERY E KUNDU, 2019). Nesse sentido, a presença de ácido clorogênico no extrato de folhas de *A. squamosa* pode estar associada com o efeito deterrente alimentar descrito aqui.

Silva *et al* (2016) alimentaram larvas de *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho) com dieta contendo rutina, o que resultou na redução de peso, atraso no desenvolvimento e baixa sobrevivência dos insetos. Esse relato sugere que a

presença de rutina no extrato de folhas de *A. squamosa* pode também estar envolvida no efeito deterrente alimentar para *S. zeamais*.

De fato, existe uma busca intensiva por novos agentes inseticidas que apresentem baixa toxicidade para organismos não alvo. Contudo, nossos resultados mostraram que *Hyalella* sp. foi sensível ao tratamento com o extrato de folhas de *A. squamosa* apresentando uma taxa de mortalidade de 100% (Tabela 5) em concentração equivalente à CL₅₀ determinada para *A. aegypti* neste trabalho. Esse resultado indica que é necessário cautela caso o extrato venha a ser utilizado como agente inseticida no ambiente. Por outro lado, a investigação da toxicidade do extrato sobre outros organismos não alvo é necessária para fortalecer essa discussão.

Quando os parâmetros abióticos da solução de cultivo onde foi realizado o ensaio com *Hyalella* sp. foram avaliados, uma discreta redução no pH e uma drástica diminuição na quantidade de O₂ dissolvido foram detectadas (Tabela 5). O pH influencia processos bioquímicos, inclusive de absorção e excreção de substâncias orgânicas e iônicas; desse modo, alterações no pH podem apresentar forte impacto no metabolismo e sobrevivência dos indivíduos. O O₂ é um componente essencial para o metabolismo dos organismos em ambientes aquáticos. Nesse sentido, alterações na quantidade de O₂ dissolvido podem não ser toleradas (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2013). Assim, a mortalidade de *Hyalella* sp. pode ter resultado da toxicidade direta do extrato de folhas de *A. squamosa* ou da alteração nos parâmetros abióticos.

O efeito do extrato de folhas de *A. squamosa* sobre o pH e O₂ dissolvido na água foi avaliado na ausência dos indivíduos de *Hyalella* sp. na tentativa de indicar se a redução desses parâmetros referida acima ocorreu devido à presença do extrato na água ou por alguma alteração no metabolismo dos microcrustáceos. O resultado revelou que é a presença do extrato que causa alteração dos parâmetros abióticos (Tabela 5).

Uma vez que o extrato contém alto teor de proteínas e outros compostos que podem ser utilizados como fonte de energia, sua presença pode ter possibilitado o crescimento de microrganismos na solução, cujo metabolismo pode ter sido responsável pela redução no pH e O₂ dissolvido. Experimentos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Tabela 5. Efeito do extrato de folhas de *A. squamosa* na sobrevivência de *Hyalella* sp. e nos parâmetros abióticos da solução de cultivo.

Amostra	Mortalidade (%)	pH	O₂ dissolvido (%)
Controle	0 ± 0	8,21	80,8
Concentração			
1,4%	86 ± 1,15	7,63	13,5
1,5%	100 ± 0	7,55	7,5
1,9%	100 ± 0	7,33	7,3
2,4%	100 ± 0	7,35	7,4
2,5%	100 ± 0	7,17	3,7

Tabela 6. Efeito do extrato de folhas de *A. squamosa* nos parâmetros abióticos da solução de cultivo na ausência dos indivíduos de *Hyalella* sp.

Amostra	T0		T48 h	
	pH	O₂ dissolvido (%)	pH	O₂ dissolvido (%)
Controle 1*	7,3	105	7,84	109,9
Controle 2**	7,5	103	8,45	105,8
Extrato				
1,4%	6,5	97,9	7,4	8,5
1,5%	6,7	94	7,8	9,3
1,9%	6,7	95	7,5	7,5
2,3%	6,6	93	7,26	8,3
2,4%	6,6	93	7,28	11,5

*Solução de cultivo. **Água destilada

6. CONCLUSÕES

- O extrato de folhas de *A. squamosa* contém proteínas, atividades de lectina e inibidor de tripsina, bem como metabólitos secundários da classe dos flavonoides (rutina), derivados cinâmicos (ácido clorogênico), saponinas, antraquinonas, terpenos e esteroides.
- O extrato foi tóxico para larvas de *A. aegypti* e adultos de *S. zeamais*.
- Um forte efeito deterrente alimentar foi detectado sobre *S. zeamais* adultos
- O extrato causou alta mortalidade de indivíduos de *Hyalella* sp. na concentração correspondente à CL₅₀ para *A. aegypti*.
- A presença do extrato interferiu no pH e na quantidade de O₂ dissolvido na solução de cultivo, sugerindo que a mortalidade de *Hyalella* sp pode não ser resultado de toxicidade direta do extrato. A utilização do extrato no ambiente necessita de cautela devido à alta mortalidade de *Hyalella* sp.
- Os resultados descritos acima apontam o extrato de folhas de *A. squamosa* como um interessante candidato para utilização no controle de populações de *A. aegypti* e como agente para proteção de grãos armazenados contra o ataque por *S. zeamais*.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Águas (ANA). **Monitoramento da qualidade da água em rios e reservatórios**. Apostila, 2013. Disponível em <<https://capacitacao.ana.gov.br/conhecerh/handle/ana/76>>. Acesso: 12 dezembro 2019
- ALMEIDA, Welton Aaron et al. Preparação de flores de Moringa oleifera causa mortalidade de *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) por bloquear a atividade de tripsina e inibir o crescimento da microbiota intestinal dos insetos. **Revista Arrudea-A revista do Jardim Botânico do Recife**, v. 1, n. 2, p. 47-60, 2016.
- ALVAREZ, Sergio. Potential economic costs of invasive structural pests: conehead termites, *Nasutitermes corniger*, in Florida. **Journal of Environmental Planning and Management**, v. 59, n. 12, p. 2145-2162, 2016.
- ALVAREZ, Sergio; SOLÍS, Daniel. Rapid Response Lowers Eradication Costs of Invasive Species. **Choices**, v. 33, n. 4, p. 1-9, 2018.
- ANAKWUE, Raphael. Cardiotoxicity of pesticides: are Africans at risk? **Cardiovascular toxicology**, p. 1-10, 2018.
- ANTUNES, Luidi EG et al. Physicochemical characteristics of corn damaged by *Sitophilus zeamais* during storage. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 6, p. 615-620, 2011.
- BESERRA, Eduardo B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia Ser Zool**, v. 99, n. 3, p. 281-5, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika)**, Semanas Epidemiológicas 1 a 49. Volume 50, Nº38. Brasília, 2019
- Bing, D. H., Weyand, J. G. M., Stavitsky, A. B. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 124(4), 1166-1170.
- BOTTON, MARCOS; LORINI, Irineu; AFONSO, Ana PS. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae) danificando a cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 355-356, 2005a.

BOTTON, M. et al. O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado. **Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2005.

CAMAROTI, João Ricardo Sá Leitão et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (StELL). **Industrial crops and products**, v. 116, p. 81-89, 2018.

CARLINI, Célia R.; GROSSI-DE-SÁ, Maria Fátima. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CEPEA. Mensuração econômica da incidência de pragas e doenças no Brasil: uma aplicação para as culturas de soja, milho e algodão. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/estudos.aspx>>. Acesso em 8 de novembro de 2019.

CHEN, Jianwei; CHEN, Yong; LI, Xiang. Beneficial aspects of custard apple (*Annona squamosa* L.) seeds. In: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. Academic Press, 2011. p. 439-445.

CHOWAŃSKI, Szymon et al. A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 60, 2016.

CHIARELLA, Josely Marchi. Vacina da dengue: um desafio nacional. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 18, n. 2, p. 123-124, 2016.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins as antimicrobial agents. *Journal of applied microbiology*, v. 125, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

COUTINHO, M.R. **Extração de tanino em folhas, sementes e frutos verdes de cinamomo (*Melia azedarach* L.) com diferentes tipos de solventes**. [monografia]. Curitiba (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde; 2013.

CORDEIRO, M. C. R. et al. Sugar apple or sweetsop (*Annona squamosa* L.) in Brazil. **Circular Técnica-Embrapa Cerrados**, n. 9, 2000.

CORREA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N.. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

COSTA, Jackson Mauricio Lopes et al. **Epidemiologia das leishmanioses no Brasil**. 2005.

CRUZ, N. A. et al. Post-ingestive effects of flavonoids in the midgut epithelium of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818)(Lepidoptera: Erebididae) larvae. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

DANHO, Mathias; GASPAR, Charles; HAUBRUGE, Eric. The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 3, p. 259-266, 2002.

DANTZGER, Miriam et al. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224-235, 2015.

DEVI, Salam Rita et al. Biology, morphology and molecular characterization of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of stored products research**, v. 73, p. 135-141, 2017.

DE SANTANA SILVA, Livia Lais et al. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, p. 109583, 2019.

FELIX, Stênio Freitas et al. Chemical Composition, Larvicidal Activity, and Enzyme Inhibition of the Essential Oil of *Lippia grata* Schauer from the Caatinga Biome against Dengue Vectors. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 250, 2021.

GALVÃO, Cleber. **Vetores da doença de chagas no Brasil**. SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

GROENIGEN, J.V. et al. **The soil N cycle: new insights and key challenges**. *Soil*, v.1, n.1, p.235-256. 2015.

GUTIERREZ, Pedro M. et al. Larvicidal activity of selected plant extracts against the dengue vector *Aedes aegypti* mosquito. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 23-32, 2014.

HO, Shuit Hung et al. Meliternatin: a feeding deterrent and larvicidal polyoxygenated flavone from *Melicope subunifoliolata*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1121-1124, 2003.

JACOBI, Pedro Roberto; GIATTI, Leandro; FERRAZ DE TOLEDO, Renata. A REFLEXIVIDADE EM OPOSIÇÃO À MASSIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 3, 2016.

JIMÉNEZ-FRANCISCO, M.; CRUZ-ESTRADA, R. H.; CARRILLO, J. G. Water absorption and termite attack on a Kraft paper-based composite treated with recycled polystyrene and three commercial resins. **European journal of wood and wood products**, v. 76, n. 2, p. 469-479, 2018.

KALIDINDI, Narasimharaju et al. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Journal of food and drug analysis**, v. 23, n. 4, p. 795-802, 2015.

KAMARULZAMAN, Puteri Sarah Diba et al. Effectiveness of neem based biopesticide to enhance rice (*Oryza sativa*) productivity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 7, p. 36-40, 2018.

KANG, H. Y. et al. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. I. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana*). **Mokuzai Gakkaishi= Journal of the Japan Wood Research Society**, v. 36, n. 1, p. 78-84, 1990.

KUDSK, Per; JØRGENSEN, Lise Nistrup; ØRUM, Jens Erik. Pesticide Load—A new Danish pesticide risk indicator with multiple applications. **Land Use Policy**, v. 70, p. 384-393, 2018.

LIU, Z.L., Goh, S.H., Ho, S.H., 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **J Stored Prod Res.** 43, 290-296.

LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LORINI, Irineu *et al.* Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. **Embrapa Trigo-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2007.

LORINI, I.; SCHNEIDER, S. Pragas de grãos armazenados: resultados de pesquisa. **Embrapa Trigo-Docmentos (INFOTECA-E)**, 1994.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, 193, 265-275.

MA, Chengyao et al. A review on *Annona squamosa* L.: phytochemicals and biological activities. *The American journal of Chinese medicine*, v. 45, n. 05, p. 933-964, 2017.

MACEDO, Maria Lígia R.; OLIVEIRA, Caio FR; OLIVEIRA, Carolina T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.

MARANHO, Lucineide Aparecida. **Biomagnificação do heptacloro num modelo de simulação em condições ex-situ**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MARTELLI, Celina Maria Turchi et al. Economic impact of dengue: multicenter study across four Brazilian regions. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, 2015.

MICHELOTTO, M. D.; BUSOLI, A. C. Eficiência de ninfas e adultos de *Aphis gossypii* Glov. na transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro. **Bragantia**, V. 62, n. 2, p. 255-259, 2003.

MOSHI, Anselm P.; MATOJU, Ivy. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. Review. **Crop Protection**, v. 92, p. 16-28, 2017.

MIKAMI, A. Y.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; VENTURA, Maurício Ursi. Resistance of maize landraces to the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical entomology**, v. 41, n. 5, p. 404-408, 2012.

NASCIMENTO, Luciano; MELNYK, Anastasiia. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2016.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest management Science**, p. 1-10. 2018.

Navarro, M.A.F., Oliveira, P.E.S., Potting, R.J.P., Brito, A.C., Fital, S.J.F., Sant'Ana, A.E.G. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **J Appl Entomol**, v.127, p.46–50, 2003.

OLIVEIRA, Ana Patrícia Silva et al. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1683-1690, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Topics, Pesticides. Disponível em: <<https://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: 13 de setembro de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue and severe dengue. Fact-sheets, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. p 1–6, 1981.

PAIVA, Patrícia MG et al. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.

PAIVA, P. M.G. et al. Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae. **Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**, v.1, p.37-55. 2012.

PASIN, Luiz Eugênio Veneziani; TERESO, Mauro José Andrade; BARRETO, Lídia Maria Ruv Carelli. Análise da produção e comercialização de mel natural no Brasil no período de 1999 a 2010. **Agroalimentária**, p. 29-42, 2012.

PATEL, Jayshree D.; KUMAR, Vipin. *Annona squamosa* L.: phytochemical analysis and antimicrobial screening. **J Pharm Res**, v. 1, n. 1, p. 34-38, 2008.

PINO-OTÍN, Ma Rosa et al. Ecotoxicity of a novel biopesticide from *Artemisia absinthium* on non-target aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 216, p. 131-146, 2019.

PONTUAL, E. V., de Lima Santos, N. D., de Moura, M. C., Coelho, L. C. B. B., Navarro, D. M. D. A. F., Napoleão, T. H., & Paiva, P. M. G. (2014). Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology research**, 113(2), 727-733.

PROCÓPIO, Thamara Figueiredo et al. Schinus terebinthifolius leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 2015.

POYNTON, Helen C. et al. The Toxicogenome of *Hyaella azteca*: a model for sediment ecotoxicology and evolutionary toxicology. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 10, p. 6009-6022, 2018.

ROCKWOOD, Danielle N. et al. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612, 2011.

RODRIGUES, Elsa Teresa et al. Environmental and human health risk indicators for agricultural pesticides in estuaries. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 150, p. 224-231, 2018.

SABARWAL, Akash; KUMAR, Kunal; SINGH, Rana P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders. **Environmental toxicology and pharmacology**, 2018.

SATPATHY, S.; GOTYAL, B. S.; BABU, V. Ramesh. Role of novel insecticides in crop protection and their selectivity to natural enemies: A review. **Journal of Environmental Biology**, v. 41, n. 2, p. 149-160, 2020.

SEIXAS, Gonçalo Filipe Rocha. **Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas**. 2012. Tese de Doutorado.

SHORT, Stephen et al. Off-target stoichiometric binding identified from toxicogenomics explains why some species are more sensitive than others to a widely used neonicotinoid. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 5, p. 3059-3069, 2021.

SILVA, Talita Roberta Ferreira Borges et al. Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 2, p. 165-170, 2016.

SILVA, V. S. G. **Comportamento de forrageamento de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky)(Isoptera: Termitidae) e sua ocorrência em áreas urbanas**. 2008. Tese de

Doutorado. Tese (Doutorado)-Campos dos Goytacazes–RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro–UENF.

SILVÉRIO, Máira Rosato Silveiral et al. Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 2020.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: p.1102. 2010.

SOUZA, Thamiris de A. de et al. Alpinia essential oils and their major components against *Rhodnius nasutus*, a vector of chagas disease. **The Scientific World Journal**, v. 2018, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009

VADASSERY, Jyothilakshmi; KUNDU, Anish. Chlorogenic acid-mediated chemical defense of plants against insect herbivores. 2019.

VERMA, Monica; SHARMA, Satyawati; PRASAD, Rajendra. Biological alternatives for termite control: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 959-972, 2009.

Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G., 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. **Canadian Entomol.** 128, 865–875.

XU, H. N., LIU, Y., ZHANG, L. (2015). Salting-out and salting-in: competitive effects of salt on the aggregation behavior of soy protein particles and their emulsifying properties. **Soft matter**, 11(29), 5926-5932.

WANG, SiYi et al. Sublethal and transgenerational effects of short-term and chronic exposures to the neonicotinoid nitenpyram on the cotton aphid *Aphis gossypii*. **Journal of pest science**, v. 90, n. 1, p. 389-396, 2017.

ZAPATA, Nelson et al. Insecticidal activity of a protein extracted from bulbs of *Phycella australis* Ravenna against the aphids *Acyrtosiphon pisum* Harris and *Myzus persicae* Sulzer. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 2, p. 188-194, 2016.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.