

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

Fabiele Schaefer Rodrigues

**INSETICIDA DE EXTRATO DE SEMENTES DE *Annona squamosa*
SOBRE *Chrysodeixis includens***

Santa Maria, RS
2022

Fabiele Schaefer Rodrigues

**INSETICIDA DE EXTRATO DE SEMENTES DE *Annona squamosa* SOBRE
*Chrysodeixis includens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Leone Zobot
Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Arrué Melo

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Rodrigues, Fabiele Schaefer
INSETICIDA DE EXTRATO DE SEMENTES DE Annona squamosa
SOBRE Chrysodeixis includens / Fabiele Schaefer
Rodrigues.- 2022.
57 p.; 30 cm

Orientador: Giovani Leone Zobot
Coorientador: Adriano Arrué Melo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2022

1. Extratos vegetais 2. Annona squamosa 3. Efeito
inseticida 4. Chrysodeixis includens 5. Efeitos
toxicológicos I. Zobot, Giovani Leone II. Melo, Adriano
Arrué III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FABIELE SCHAEFER RODRIGUES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Fabiele Schaefer Rodrigues

**INSETICIDA DE EXTRATO DE SEMENTES DE *Annona squamosa* SOBRE
*Chrysodeixis includens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Aprovada em 10 de março de 2022.

Giovani Leone Zabet

Giovani Leone Zabet, Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientador)

Adriano Arruê Melo

Adriano Arruê Melo, Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Co-orientador)

Vania Lucia Loro

Vania Lucia Loro, Dra. (UFSM) - Videoconferência

Emanuele Junges

Emanuele Junges, Dra. (IFFar) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2022

À minha família, a base de tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar comigo ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Jairo Batista Barbosa Rodrigues e Beatris Hahn Schaefer Rodrigues, ao amor em forma de auxílio, incentivo e ajuda para a conclusão desta etapa. Sem vocês esta realização não seria possível, o meu eterno agradecimento!

Ao meu namorado Mozer Schunck Lorenzo, pela compreensão, apoio e incentivo durante todo este percurso.

À minha irmã Franciele Schaefer Rodrigues, pela ajuda nas anotações de dados e auxílio em laboratório.

Ao meu orientador Prof. Dr. Giovani Leone Zobot, dedico um agradecimento especial, por todos os ensinamentos, orientações, apoio e auxílio na realização deste trabalho, e também pela amizade e ajuda durante toda a duração do mestrado. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Adriano Arrué Melo pelo auxílio no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Oderlei Bernardi pela orientação, auxílio e acompanhamento durante a realização dos experimentos, agradeço também pela disponibilização do Laboratório de Entomologia para a realização da pesquisa. A mestranda Jéssica Santi Boff e ao bolsista de iniciação científica Alexandre Castro Reis, pelos ensinamentos e ajuda durante a realização dos experimentos. A acadêmica Beatriz de Andrade Araujo, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos laboratoriais realizados ao decorrer da pesquisa.

À Prof^a Dr^a. Vânia Lucia Loro, pela orientação e auxílio na realização desta pesquisa, pela disponibilização do Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTAQ) e pela amizade e apoio. Às doutorandas Tamires Rosso Storck e Jaíne Ames pela ajuda e ensinamentos durante a realização do experimento de toxicologia aquática.

Ao Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti pela disponibilização do laboratório Biotec Factory, e pela orientação ao decorrer da realização deste trabalho. À doutoranda Silvana Schmaltz pelo apoio e ensinamentos durante a realização das etapas da pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn pelo auxílio, disponibilidade e treinamento, e aos Profs. Drs. Marcus Vinícius Tres e Walter Boller pelas orientações durante a realização desta pesquisa.

À Rudi Klein e Marli Mielke pela doação das frutas-do-conde utilizadas neste trabalho, e à Patrícia Hahn Jotz, Rodrigo Jotz e Darci Jotz pela realização de coleta das frutas. Muito obrigada!

Aos membros da banca de defesa desta dissertação, professoras Emanuele Junges (IFFar) e Vania Lucia Loro (UFMSM), pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições.

À Universidade Federal de Santa Maria pelo ensino de qualidade e pela oportunidade de realização do mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e conclusão deste trabalho, a vocês o meu sincero muito obrigada!

“O Homem é parte da natureza e sua guerra contra a natureza é inevitavelmente uma guerra contra si mesmo.”

- Rachel Carson

RESUMO

INSETICIDA DE EXTRATO DE SEMENTES DE *Annona squamosa* SOBRE *Chrysodeixis includens*

AUTORA: Fabiele Schaefer Rodrigues
ORIENTADOR: Prof. Dr. Giovani Leone Zabot
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Adriano Arrué Melo

O uso constante e excessivo dos agrotóxicos vem acarretando um agravante ambiental de grande proporção. A utilização de defensivos agrícolas é, muitas vezes, essencial em determinadas situações na produção vegetal e no manejo das culturas. Todavia, os efeitos destas substâncias no meio ambiente vêm interferindo negativamente na saúde humana, no meio ambiente e em todo ciclo natural dos ecossistemas. Diante desta problemática, a procura de métodos de controle alternativos ao combate de pragas agrícolas se torna uma questão imprescindível para a conciliação da eficiência agrícola e do desenvolvimento sustentável. Relatos promissores sobre a utilização de extratos vegetais para o controle de pragas agrícolas vêm sendo difundidos. A fruta-do-conde (*Annona squamosa*) é uma planta promissora como uso inseticida. Portanto, este trabalho tem como objetivo a obtenção do extrato vegetal de semente de *Annona aquamosa* para a avaliação do efeito inseticida sobre uma das principais pragas agrícolas, a lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), analisando efeitos toxicológicos em organismo aquático não-alvo. Para a avaliação e comparação dos efeitos inseticida e toxicológicos, os experimentos foram realizados com o extrato vegetal das sementes de fruta-do-conde obtido por extração assistida por ultrassom e do inseticida biológico Dipel®. Bioensaios de ingestão foram realizados para verificar a ação inseticida do extrato sobre a lagarta falsa-medideira. Os insetos foram expostos a doses de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 7,5 e 10,0 g/L para o extrato e 5 g/L para o Dipel®. Para a quantificação das doses foi considerado um volume de calda de aplicação de 100 L/ha. A avaliação de efeitos toxicológicos em organismo não-alvo foi realizada utilizando-se como modelo experimental o peixe-zebra (*Danio rerio*). Os peixes foram expostos às diferentes doses de extrato (0,84, 1,68, 2,52, 3,36 e 16,8 µg/L) e ao bioinseticida Dipel® (16,8 µg/L). Ao final de 120 h de exposição, os peixes foram anestesiados e eutanasiados para a coleta dos tecidos biológicos de interesse e posterior realização de análises bioquímicas, sendo elas: acetilcolinesterase (AChE), glutational-S-transferase (GST), peroxidação lipídica (PLO) e a proteína carbonil (PC). A alteração nos níveis destas análises possibilitou a verificação de danos oxidativos nos peixes. Os resultados deste trabalho indicam a ação inseticida do extrato de sementes de fruta-do-conde contra a lagarta falsa-medideira, sendo que a análise dos diferentes tratamentos do extrato evidenciou que a dose de 1 g/L não difere estatisticamente das doses maiores e também do tratamento Dipel®. Através dos biomarcadores de exposição a contaminantes (PLO, PC, GST e AChE) evidenciou-se a ocorrência de efeitos toxicológicos e consequentes danos oxidativos aos peixes. Considerando a mesma concentração de produto (16,8 µg/L), o tratamento com o bioinseticida Dipel® apresentou maiores alterações nos biomarcadores, indicando a ocorrência de danos oxidativos superiores quando comparados ao extrato das sementes de fruta-do-conde.

Palavras-chave: Extratos vegetais. *Annona squamosa*. Efeito inseticida. *Chrysodeixis includens*. Efeitos toxicológicos.

ABSTRACT

Annona squamosa SEED EXTRACT AS INSECTICIDE AGAINST *Chrysodeixis includens*

AUTHOR: Fabiele Schaefer Rodrigues
ADVISOR: Prof. Dr. Giovanni Leone Zabot
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Adriano Arru  Melo

The constant and excessive use of pesticides has been causing a major environmental aggravating factor. The use of pesticides is often essential in certain situations in plant production and crop management. However, the effects of these substances on the environment have been negatively interfering with human health, the environment and the entire natural cycle of ecosystems. Based on this problem, the search for alternative control methods to prevent agricultural pests' development becomes an essential issue for reconciling agricultural efficiency and sustainable development. Promising reports on the use of plant extracts to control agricultural pests have been reported. The custard apple (*Annona squamosa*) is a promising plant for acting as an insecticide. The objective of this work was to carry out the plant extract of custard apple seed for the investigation of the insecticide effect on one of the main agricultural pests, the false-medideira caterpillar (*Chrysodeixis includens*), and the analysis of toxicological effects on a non-target aquatic organism. For the investigation and comparison of the insecticidal and toxicological effects, both experiments will be carried out with the vegetal extract of the seeds of custard apple and the biological bioinsecticide Dipel®. Ingestion bioassays were carried out to verify the insecticidal action of the extract on the false-medideira caterpillar. The insects were exposed to dosages of 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 7.5 and 10.0 g/L for the extract, and 0.5 g/L for the Dipel®. To quantify the dosages, a spray volume of 100 L/ha was considered. The evaluation of toxicological effects in a non-target organism was carried out using the zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model. The fish was exposed to different dosages of extract (0.84, 1.68, 2.52, 3.36 and 16.80 µg/L) and to the bioinsecticide Dipel® (16.80 µg/L). At the end of 120 h of exposure, the fish was anesthetized and euthanized for the collection of biological tissues of interest and subsequent biochemical analysis, namely: acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), lipid peroxidation (PLO), and protein carbonyl (PC). The change in the levels of these analyses allowed the verification of oxidative damage in fish. The results of this work indicate the insecticidal action of the seed extract of custard apple against the false-medideira caterpillar, and the analysis of the different treatments showed that the extract at a dosage of 1 g/L does not differ statistically from the higher concentrations and also the Dipel® treatment. Based on the biomarkers of exposure to contaminants (PLO, PC, GST, and AChE), the occurrence of toxicological effects and consequent oxidative damage to fish was evidenced. Considering the same concentration of product (16.8 µg/L), treatment with the bioinsecticide Dipel® showed higher changes in biomarkers, indicating the occurrence of higher oxidative damage when compared to the extract of custard apple seeds.

Keywords: Plant extracts. *Annona squamosa*. Insecticide effect. *Chrysodeixis includens*. Toxicological effects.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Resumo das atividades realizadas ao decorrer do trabalho	15
FIGURA 2	– Classes toxicológicas dos agrotóxicos conforme padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos	18
FIGURA 3	– Distribuição de detecções regulares e irregulares, por grupo químico, considerando-se o número de detecções por grupo superior a 60	19
FIGURA 4	– Morfologia da fruta-do-conde	25
FIGURA 5	– Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>).....	30
FIGURA 6	– Ciclo de desenvolvimento da lagarta <i>Chrysodeixis includens</i>	31
FIGURA 7	– Localização da cidade de Vale Real, Rio Grande do Sul, Brasil	32
FIGURA 8	– Etapas realizadas para a obtenção do extrato	33
FIGURA 9	– Esquema do experimento de bioensaio de ingestão	35
FIGURA 10	– Esquema do experimento de toxicologia aquática e da coleta dos tecidos biológicos	38
FIGURA 11	– Mortalidade das lagartas frente aos tratamentos BE25, BE50, BE100, BE150, BE200, BE250, BE500 e BD500, após 120h de exposição	40
FIGURA 12	– Curva de mortalidade dos insetos nos diferentes tratamentos realizados após 120h de exposição	41
FIGURA 13	– Resultados da análise bioquímica de peroxidação lipídica	43
FIGURA 14	– Resultados da análise bioquímica de proteína carbonil.....	44
FIGURA 15	– Resultados da análise bioquímica da enzima glutathione S-transferase	45
FIGURA 16	– Resultados da análise bioquímica da enzima acetilcolinesterase	46

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Espécies com atividade inseticida descritas na literatura	22
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Meios de dispersão de agrotóxicos, fatores e consequências	21
TABELA 2 – Partes utilizadas de <i>Annona squamosa</i> como fitoinseticida contra diferentes espécies de insetos	27
TABELA 3 – Tratamentos realizados no experimento de toxicologia aquática	36
TABELA 4 – Resultados obtidos durante a realização dos bioensaios de ingestão nos diferentes tratamentos estipulados	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
1.2	HIPÓTESES	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	AGROTÓXICOS E SEUS EFEITOS NOCIVOS.....	17
2.2	EXTRATOS VEGETAIS COMO MÉTODO DE CONTROLE	21
2.3	FRUTA-DO-CONDE	25
2.3.1	Extratos da fruta-do-conde	26
2.4	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM	28
2.5	ECOTOXICOLOGIA.....	28
2.5.1	Peixe-zebra como bioindicador de toxicidade aquática	29
2.6	LAGARTA <i>Chrysodeixis includens</i>	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	MATÉRIA-PRIMA	32
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL.....	32
3.3	BIOENSAIOS DE INGESTÃO EM LAGARTAS	34
3.4	ENSAIOS DE TOXICOLOGIA AQUÁTICA.....	35
3.4.1	Análises bioquímicas	36
3.4.1.1	Acetilcolinesterase	36
3.4.1.2	Glutathione S-transferase.....	37
3.4.1.3	Peroxidação lipídica.....	37
3.4.1.4	Proteína carbonil	37
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	EFEITO INSETICIDA	39
4.2	EFEITOS TOXICOLÓGICOS	42
5	CONCLUSÃO	49
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICE A – RESULTADOS DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	57

1 INTRODUÇÃO

O uso excessivo de agrotóxicos vem acarretando um agravante ambiental de proporções gigantescas, interferindo negativamente na saúde humana, no meio ambiente e em todo ciclo natural dos ecossistemas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Os impactos causados pelo uso indiscriminado dos agrotóxicos são na maioria das vezes incalculáveis, devido à contaminação destas substâncias quando misturadas apresentarem níveis altíssimos de toxicidade e persistência química no ambiente (CEQUINEL; RODRIGO, 2018). Desta forma, as estimativas dos impactos e efeitos nocivos do emprego dos agrotóxicos aumentam, e são evidenciados pelos estudos e pesquisas científicas que relatam a constante degradação ambiental que está ocorrendo (SILVA; GARRIDO, 2021; GONÇALVES et al., 2020; BATISTA et al., 2020; ISMAEL; ROCHA, 2019).

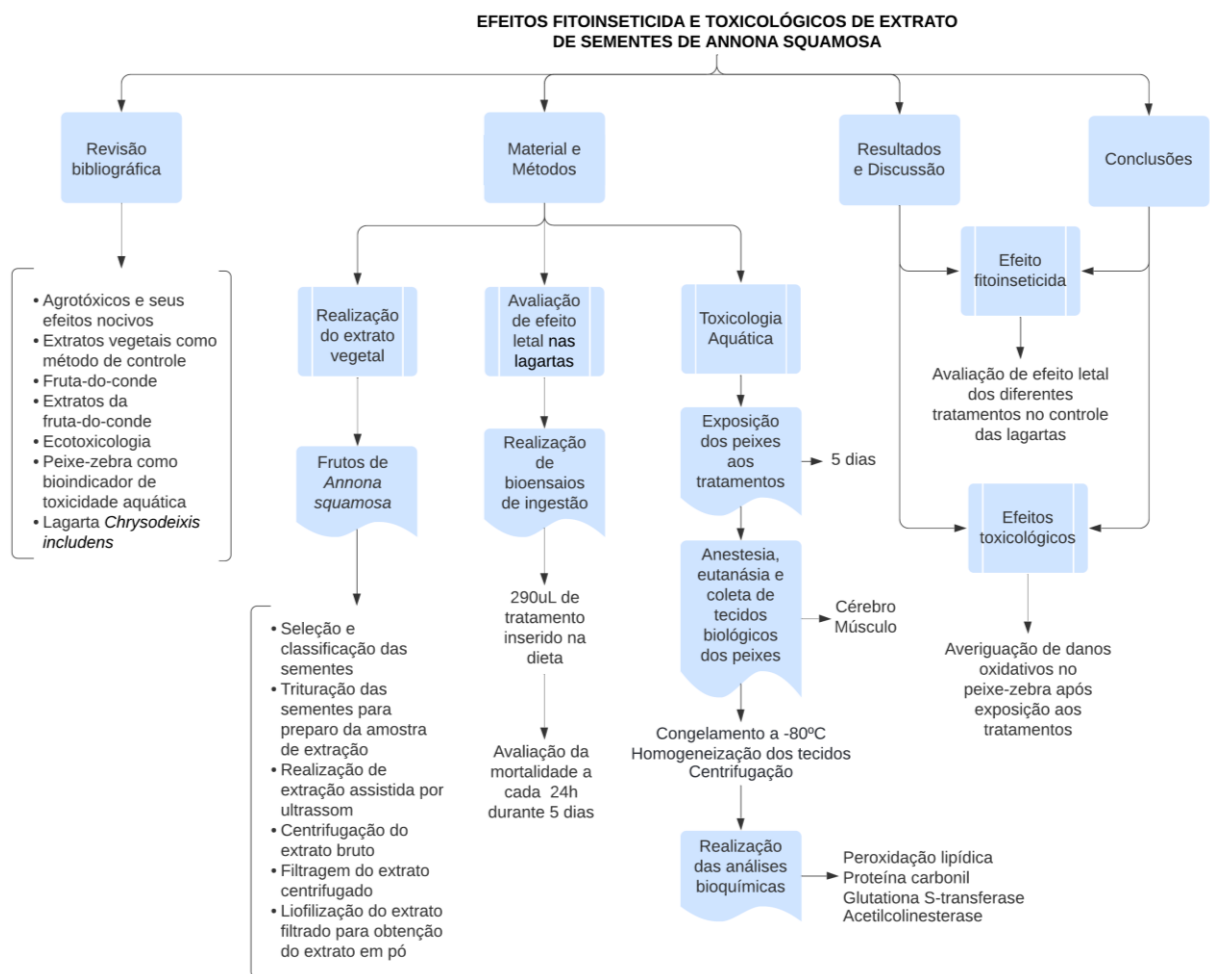
O prejuízo ambiental decorrente de tal situação se estende por todos os segmentos, através da poluição do ar, da contaminação dos recursos hídricos e dos mananciais, da degradação das florestas, da destruição da fauna e da flora, da enorme perda da biodiversidade e do desalinhamento do ciclo natural do ecossistema (TUDI et al., 2021). Não distante, os impactos negativos também são evidenciados na saúde humana, e vão desde a intoxicação em decorrência do consumo do alimento tratado até casos mais graves como o desenvolvimento de doenças como o câncer (INCA, 2019; RÓDIO et al., 2021).

Diante dessa problemática, a necessidade de métodos de controle alternativos ao combate de pragas agrícolas se torna uma questão imprescindível para a conciliação da eficiência agrícola e do desenvolvimento sustentável, sendo uma ação essencial para garantir a qualidade da vida humana, a segurança alimentar e o direito a um meio ambiente ecologicamente equilibrado. Neste segmento, relatos promissores sobre a utilização de extratos botânicos vem sendo cada vez mais difundidos na busca de métodos de controle com menor agressividade ambiental, e ainda sim eficientes na substituição de produtos químicos (JABRAN et al., 2015). Muitos extratos vegetais apresentam diversas vantagens quando comparados ao uso de produtos sintéticos, como a baixa toxicidade das substâncias devido à origem ser de fontes naturais, a geração de novos compostos evitando resistência devido à dificuldade de inativação dos princípios ativos, além da disponibilidade de diversos compostos e de sua rápida degradação no meio ambiente (FERRAZ et al., 2008).

Buscando promissoras plantas com atividade fitoinseticida, a *Annona squamosa*, L. (fruta-do-conde) se apresenta como uma alternativa propícia no controle de pragas, devido aos seus frutos e, principalmente, as sementes apresentarem grandes quantidades de acetogeninas

anonáceas (ACGs), o que pode conceder aos extratos propriedades antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, moluscidas, inseticidas e acaricida (CHAMPY, 2011). Devido a isto, formulações que utilizam o extrato da fruta-do-conde podem se tornar um método alternativo de controle de pragas extremamente importante, principalmente para pragas que atacam culturas de grande interesse comercial, como é o caso da lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) na cultura da soja. Na Figura 1, está representado as etapas e atividades realizadas na elaboração deste trabalho.

Figura 1 – Resumo das atividades realizadas ao decorrer do trabalho



Fonte: Autora, 2022.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito inseticida do extrato de sementes de fruta-do-conde sobre uma das principais pragas agrícolas da cultura da soja: a lagarta falsa-medideira.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato das sementes da fruta-do-conde através do método de extração assistida por ultrassom;
- Realizar bioensaios para avaliar a ocorrência de efeito letal nas lagartas e testar diferentes doses do extrato para o controle da lagarta falsa-medideira em comparação com o inseticida biológico Dipel® WG;
- Realizar experimentos de toxicologia aquática para verificar a toxicidade do inseticida Dipel® e do extrato de sementes de fruta-do-conde e seus efeitos em organismo não-alvo (peixe-zebra);
- Coletar os tecidos biológicos de interesse do peixe-zebra e realizar análises bioquímicas para avaliar a eventual ocorrência de danos oxidativos causados pela exposição às substâncias.

1.2 HIPÓTESES

- Encontrar potencial inseticida nos extratos de semente de fruta-do-conde para o controle da lagarta falsa-medideira;
- Obter um promissor fitoinseticida que seja eficaz no combate a insetos-praga e ambientalmente seguro para organismos não-alvo;
- Verificar que, na mesma dosagem, o extrato de sementes da fruta-do-conde apresenta menores efeitos toxicológicos e no peixe zebra do que o inseticida comercial Dipel.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS E SEUS EFEITOS NOCIVOS

Os agrotóxicos são insumos químicos nas formas de herbicidas, fungicidas, acaricidas, inseticidas e nematicidas, entre outros. Seu uso contínuo e indiscriminado, juntamente com o desconhecimento de impactos ambientais e ausência de fiscalização da aplicação, acarretam contaminação alimentar, intoxicação dos trabalhadores rurais, além de diversos impactos ambientais devido à poluição do solo e dos recursos hídricos (LAZZARINI; SANTIAGO, 2015).

Conforme o Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, entende-se por agrotóxicos:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (BRASIL, 2002).

Grande parte dos agrotóxicos são misturas ou preparações com um ou mais princípios ativos, podendo conter também em sua composição aditivos, solventes, coadjuvantes, excipientes e impurezas, que podem ser tão ou mais tóxicos que o princípio ativo principal (CEQUINEL; RODRIGO, 2018). Desta forma, como inúmeros agrotóxicos de diferentes formulações são aplicados diariamente no meio ambiente, não é possível calcular com exatidão o potencial poluidor da junção destas composições.

Estudos demonstram importante interferência dos agrotóxicos no equilíbrio do ecossistema e, conseqüentemente, na vida animal e humana. Os impactos vão desde a alteração da composição do solo, passando pela contaminação da água e do ar, podendo interferir nos organismos vivos terrestres e aquáticos, alterando sua morfologia e função dentro do ecossistema. A alteração do ecossistema e da morfologia de muitos animais e vegetais usados na alimentação humana também pode interferir negativamente na saúde humana. (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Devido a isto, os efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente apresentam-se de forma extremamente nociva e cada vez mais torna-se necessário estudos e avaliações que visem minimizar os efeitos destas substâncias no meio ambiente e na saúde da população. Conforme Souza et al. (2017), os agrotóxicos, quando utilizados, podem facilmente mudar sua ação inicial

de combate a pragas e acabar afetando organismos não-alvos, causando diversos impactos ambientais.

Visando implementar um sistema de regras internacionais de classificação dos agrotóxicos e tornar mais claro os critérios de avaliação e de classificação toxicológica dos agrotóxicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o novo marco regulatório para agrotóxicos através da Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 294, de 29 de junho de 2019. Este marco estabelece novos critérios de avaliação e de classificação toxicológica dos produtos no Brasil, além de mudanças na rotulagem, como a adoção do uso de informações, palavras de alerta e imagens. Conforme a resolução, as mudanças do novo marco regulatório são propostas com base nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) e a nova classificação toxicológica dos agrotóxicos prevê seis classificações, sendo cinco categorias e uma não classificada. Assim sendo, os agrotóxicos podem ser classificados em extremamente tóxico, altamente tóxico, moderadamente tóxico, pouco tóxico, improvável de causar dano agudo e não classificado (BRASIL, 2019). Na Figura 2 é possível visualizar um resumo sobre a nova classificação toxicológica dos agrotóxicos conforme os padrões GHS.

Figura 2 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos conforme padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERADAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
ORAL	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
DÉRMICA	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
INALATÓRIA	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	VERMELHO	VERMELHO	AMARELO	AZUL	AZUL	VERDE

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2019).

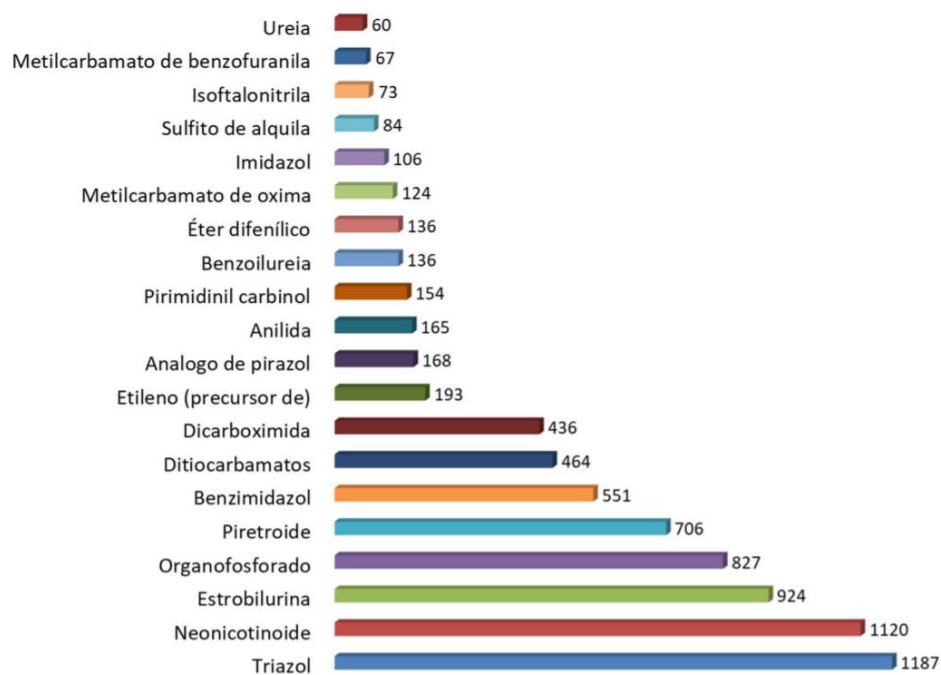
Quando uma substância contaminante é inserida no ambiente, pode ocorrer o contato dessa substância com os sistemas biológicos e, possivelmente, ocasionar efeitos adversos à saúde. Assim, a rota de exposição permite o contato dos indivíduos com os contaminantes e inclui diversos segmentos que interligam os fatores relacionados à fonte de contaminação com a população receptora. Os componentes que constituem a rota de exposição são: fontes de contaminação, compartimentos ambientais, mecanismos de transporte, ponto de exposição, vias de exposição e população receptora (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Desta forma, uma das ações da ANVISA, criado em 2001, é o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). O programa é coordenado pela ANVISA em conjunto com órgãos estaduais e municipais de vigilância sanitária e laboratórios estaduais de saúde pública. O principal objetivo do programa é:

Monitorar resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, visando mitigar o risco à saúde decorrente da exposição a essas substâncias pela dieta, mediante avaliação do cenário de irregularidades e risco à saúde, a partir dos resultados das análises das amostras coletadas. (ANVISA, 2019).

Conforme relatório do PARA no ciclo 2017/2018, nas 4.616 amostras analisadas, detectou-se resíduos de 122 ingredientes ativos diferentes, o que resultou no total de 8.270 detecções. A Figura 3 apresenta a distribuição de detecções irregulares por grupo químico.

Figura 3 – Distribuição de detecções regulares e irregulares, por grupo químico, considerando-se o número de detecções por grupo superior a 60



Fonte: ANVISA (2019).

Dentro das detecções, observa-se que o grupo químico dos organofosforado apresenta maior percentual de detecções irregulares, o que exemplifica um dado de alerta na área ambiental, devido aos impactos extremamente negativos que os organofosforados apresentam para a saúde humana e para todo o ecossistema. Segundo Silva e Garrido (2021), os compostos organofosforados e organoclorados estão relacionados a acidentes ocupacionais e quadros de suicídio e quando absorvidos em altas concentrações podem provocar danos ao sistema nervoso central. Todavia, mesmo apresentando potencial tóxico ao ambiente e às formas de vida presentes, estes produtos continuam sendo largamente utilizados no controle de pragas agrícolas.

Com o aumento do uso de agrotóxicos ocorridos nos últimos anos e também com a autorização de novos registros destes produtos químicos, muitos impactos ambientais vêm sendo apurados. Giordani et al., (2020) avaliaram a toxicidade de agrotóxicos de efeito fungicida e fungicida + inseticida sobre organismos não-alvo, especificamente a minhoca da espécie *Eisenia andrei*. Os resultados mostraram que nas concentrações testadas os produtos não afetaram a taxa de mortalidade das minhocas. Entretanto, mesmo nas menores concentrações, são capazes de reduzir a reprodução desses organismos, evidenciando efeitos nocivos associados ao uso desses produtos. Em estudo realizado por Ismael e Rocha (2019), objetivou-se estimar o potencial de contaminação das águas subterrâneas e superficiais por agrotóxicos aplicados em uma área sucroalcooleira. Os resultados da estimativa de contaminação das águas subterrâneas mostraram que 52% dos princípios ativos avaliados apresentaram tendência de contaminação potencial. Para a contaminação das águas superficiais, concluiu-se que a maior parcela dos princípios ativos analisados demonstrou condições propícias ao transporte por meio de escoamento superficial após a sua dissolução em água.

Os agrotóxicos lançados no meio ambiente podem afetar indiretamente organismos-alvo e não-alvo, e esta interação frequentemente pode acontecer de forma contrária ao seu uso pretendido. Desta forma, os impactos diretos dos pesticidas no meio ambiente são amplificados ou compensados por seus efeitos indiretos (SÁNCHEZ-BAYO, 2021).

O uso e o manejo inadequados de pesticidas e o seu comportamento no meio ambiente acarreta um grande agravante ambiental, poluindo o solo, a água e o ar e ocasionado a contaminação de alimentos, impactando a saúde humana através da contaminação ambiental e alimentar (TUDI et al., 2021). Após o uso dos agrotóxicos na agricultura, ocorre o início das reações físicas, químicas, físico-químicas e biológicas que podem influenciar no seu comportamento no ambiente (SALOMÃO; AMÉRICO-PINHEIRO, 2018). A Tabela 1 apresenta os múltiplos meios de dispersão dos agrotóxicos no ambiente e suas consequências.

Tabela 1 – Meios de dispersão de agrotóxicos, fatores e consequências

Processos	Consequências	Fatores
Deriva	Movimento pela ação do vento	Velocidade do vento e tamanho das gotas
Volatilização	Perda por evaporação do solo, da planta ou do ecossistema aquático	Pressão de vapor, velocidade do vento e temperatura
Adsorção	Remoção pela interação com plantas, solo e sedimento	Conteúdo mineral e matéria orgânica, tipo de mineral e umidade
Absorção	Absorção pelas raízes ou ingestão animal	Transporte pela membrana celular, tempo de contato e suscetibilidade
Lixiviação	Translocação lateral e vertical através do solo	Conteúdo de água, macroporos, textura do solo, quantidade do mineral e conteúdo da matéria orgânica
Erosão	Movimento pela ação da água ou vento	Chuva, velocidade do vento, tamanho das partículas do mineral e da matéria orgânica com moléculas adsorvidas

Fonte: PIERZYNSKI et al. (1994) apud SALOMÃO; AMÉRICO-PINHEIRO (2018).

Diante dessa problemática, a cada dia se torna mais importante o uso de produtos e processos alternativos que desempenham funções semelhantes aos agrotóxicos. Porém, estes produtos devem agir sem agredir o meio ambiente e a saúde humana, conciliando a eficiência com o desenvolvimento sustentável, sendo uma ação essencial para garantir a qualidade da vida humana, a segurança alimentar e o direito a um meio ambiente ecologicamente equilibrado.

2.2 EXTRATOS VEGETAIS COMO MÉTODO DE CONTROLE

As plantas produzem uma série de compostos de defesa com potencial inseticida, herbicida e fungicida naturais (MORAES et al., 2016). A procura frequente de uma agricultura sustentável e eficaz no controle e manejo de agentes como fungos, insetos, ervas daninhas, pragas e demais doenças possibilitou a ampliação de estudos e o interesse da manipulação de produtos naturais. Dentre estes produtos naturais, relatos promissores sobre a utilização de extratos botânicos vem sendo cada vez mais difundidos na busca de métodos de controle com menor agressividade ambiental, e ainda sim eficientes na substituição de produtos químicos (JABRAN et al., 2015). A utilização de compostos bioativos no controle de pragas e doenças exhibe vantagens em relação aos produtos sintéticos, devido ao fato de muitos destes compostos serem facilmente decompostos, não possuem propriedades residuais ou fitotóxicas, e não poluírem o meio ambiente (PIMENTA NETO et al., 2020). Diante disso, a utilização de extratos vegetais como método alternativo de controle torna-se uma importante solução para a diminuição da dependência de substâncias químicas altamente tóxicas e nocivas ao ecossistema, como os agrotóxicos.

Pode-se citar as como vantagens dos extratos vegetais em relação aos agrotóxicos, aspectos como: novos compostos que as pragas ainda não são capazes de inativar, menor toxicidade do que compostos químicos, múltiplos modos de ação, além de biodegradação rápida, a junção destes fatores possibilita múltiplos usos dos extratos vegetais, além da sua ação seletiva dentro de cada classe de praga (MICHETEN; PESSENTI, 2021).

Muitos estudos tem demonstrado que os produtos derivados de plantas podem resultar em potenciais biodefensivos, apresentando-se como uma alternativa na busca de novos métodos de controle de pragas, em diferentes modos de ação, sejam elas inseticida, fungicida, nematicida, herbicida, bactericida, larvicida, dentre outros (SBHATU et al., 2021; PINHEIRO; VASCONCELOS, 2020; AFZAL et al., 2019; GOMES et al., 2018; SILVA, et al., 2017, COUTINHO, 2021).

Quadro 1 – Espécies com atividade inseticida descritas na literatura

(continua)			
Família	Espécie	Inseto-praga	Referência
Achariaceae	<i>Mayna parvifolia</i> (J.F.Macbr.) Sleumer**	<i>Atta laevigata</i>	Gouvêa et al. (2010)
Anacardiaceae	<i>Anacardium humile</i> Saint Hill *	<i>Aedes aegypti</i>	Porto et al. (2008)
Annonaceae	<i>Annona montana</i> Macfad.*	<i>Aphis craccivora</i>	Bandeira et al. (2017)
	<i>Annona mucosa</i> Jacq.*	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ribeiro, Ansante e Vendramim (2016)
Araceae	<i>Dieffenbachia costata</i> H. Karst. Ex Schott***	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Cerda et al. (2019)
	<i>Xanthosoma purpuratum</i> K. Krause*	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Cerda et al. (2019)
Arecaceae	<i>Orbignya phalerata</i> Mart.*	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Santos et al. (2016)
	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)
	<i>Ageratum conyzoides</i> L.*	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
		<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith);	Knaak et al. (2012)
	<i>Artemisia obsinthium</i> L.	<i>Sitophilus oryzae</i> L.;	Vitorino et al. (2012)
<i>Brevicoryne brassicae</i> L.	Boller e Deboni (2013)		
Asteraceae	<i>Artemisia verlotorum</i> Lamotte**	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
	<i>Baccharis genistelloides</i> (Lam). Pers.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
	<i>Bidens pilosa</i> L.**	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)
	<i>Clibadium</i> sp.*	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Cerda et al. (2019)
	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	<i>Papiliothoas brasiliensis</i>	Sousa e Mussury (2010)
	<i>Tanacetum vulgare</i> L.**	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
Bignoniaceae	<i>Tanaecium nocturnum</i>	<i>Sitophilus zeamais</i> Motsch.;	Fazolin et al. (2007b)
	Bureau & K. Schum.***	<i>Tenebrio molitor</i> L.	Fazolin et al. (2007a)
	<i>Cordia verbenácea</i> DC.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i> L.	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)

Quadro 1 – Espécies com atividade inseticida descritas na literatura

(continuação)

Família	Espécie	Inseto-praga	Referência
Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i> L	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Sousa e Mussury (2010)
		<i>Papiliothoas brasiliensis</i>	Knaak et al. (2012)
Brassicaceae	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Tavares e Vendramim (2005)
		<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Knaak et al. (2012)
		<i>Sitophilus zeamais</i> Mots.	Boiça Júnior et al. (2005)
Fabaceae	<i>Copaifera</i> sp. L.*	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Santos et al. (2016)
	<i>Dalbergia inundata</i> Spruce ex Benth.***	<i>Cryptotermes brevis</i>	Silva (2010)
	<i>Derris urucu</i> (Killip & Sm.)	<i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné	Fazolin, Estrela e Argolo (2002) Knaak et al. (2012)
	<i>Erytrina berteroana</i> *	<i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné	Fazolin, Estrela e Argolo (2002)
	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth*.	<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius	Cavalcante, Moreira e Vasconcelos (2006)
	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam) De Wit**		
	<i>Senna silvestris</i> (Vell.) H. S. Irwin & Barneby*	<i>Cryptotermes brevis</i>	Silva (2010)
	<i>Enterolobium contortisilliquum</i> (Vell.) Morong	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Torres, Barros e Oliveira (2001)
	<i>Prosopis juliflora</i> (SW.)DC	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Torres, Barros e Oliveira (2001)
	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart) Coville	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)
	<i>Deguelia utilis</i> (ACSm.)***	<i>Plutella xylostella</i> (L.) <i>Brevicoryne brassicae</i> L.	Cerda et al. (2019) Cerda et al. (2019)
	Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)
<i>Plutella xylostella</i> (L.)			Boiça Júnior et al. (2005)
Malvaceae	<i>Malva silvestres</i> L.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer);	Fazolin, Estrela e Argolo (2002)
		<i>Plutella xylostella</i> (L.);	Boiça Júnior et al. (2005)
		<i>Eriopsis connexa</i>	Sausen et al. (2007)
		<i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné	Venzon et al. (2007)
		<i>Papilio thoas brasiliensis</i>	Sousa e Mussury (2010)
	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.***	<i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné	Fazolin, Estrela e Argolo (2002)
		<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Santos et al. (2016)
		<i>Atta laevigata</i> Smith	Brunherotto e Vendramim (2001)
	<i>Melia azedarach</i> L.**	<i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné	Dequech et al. (2008)
		<i>Microtheca ochroloma</i> Sta	Fazolin, Estrela e Argolo (2002)
<i>Tuta absoluta</i> (Meyrick)		Jung et al. (2013)	

Quadro 1 – Espécies com atividade inseticida descritas na literatura

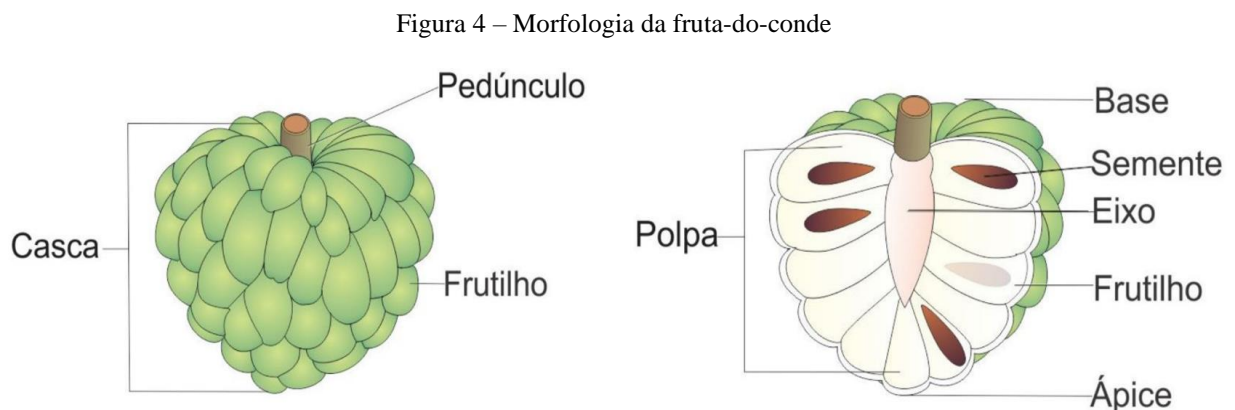
(conclusão)

Família	Espécie	Inseto-praga	Referência	
Meliaceae	<i>Trichilia catigua</i> A. Juss.*	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
	<i>Trichilia pallida</i> Sw.*	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Roel et al. (2000)	
		<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Boiça Júnior et al. (2005)	
Myristicaceae	<i>Viola guianensis</i> Aubl.***	<i>Cryptotermes brevis</i>	Silva (2010)	
	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Microtheca ochroloma</i> Stal.	Dequech et al. (2008)	
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	<i>Atta laevigata</i> Smith;	Jung et al. (2013)	
		<i>Microtheca ochroloma</i>	Dequech et al. (2008)	
	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels**	<i>Microtheca ochroloma</i>	Dequech et al. (2008)	
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
Phaseaceae	<i>Canavalia ensiformes</i> (L.) DC.*	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)	
Phytolaccaceae	<i>Petiveria alliacea</i> L. (Tipi, Guiné)**	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Fazolin, Estrela e Argolo (2002)	
		<i>Cerotoma tingomarianus</i> Bechyné	Knaak et al. (2012)	
Piperaceae	<i>Piper hispidinervum</i> C. DC.*	<i>Tenebrio molitor</i> L.	Fazolin et al. (2007b)	
	<i>Piper hispidum</i> Kunth*	<i>Hypothenemus hampei</i>	Santos et al. (2010)	
	<i>Piper nigrum</i> L.**	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq.*	<i>Alabama argillacea</i> (HUEBNER, 1818)	Miranda et al. (2002)	
	<i>Pothomorphe umbellata</i> L.*	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
Plumbaginaceae	<i>Plumbago capensis</i> Thunb	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
Primulaceae	<i>Clavija weberbaueri</i> Mez***	<i>Atta laevigata</i>	Gouvêa et al. (2010)	
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf **	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)	
Rubiaceae	<i>Palicourea marcgravii</i> St. Hil.*	<i>Aphis spiraecola</i>	Gonzaga et al. (2007)	
		<i>Toxoptera citricida</i>	Gonzaga et al. (2008)	
		<i>Aetalion</i> sp.	Silva et al. (2009)	
Rutaceae	<i>Ruta graveolens</i> L.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Sousa e Mussury (2010)	
		<i>Papiliothoas brasiliensis</i>	Knaak et al. (2012)	
Salicaceae	<i>Banara guianensis</i> Aubl.*	<i>Atta laevigata</i>	Gouvêa et al. (2010)	
	<i>Ryania speciosa</i> Vahl*			
Sapindaceae	<i>Sapindus saponaria</i> L.*	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
Simaroubaceae	<i>Quassia amara</i> L.***	<i>Heliothis virescens</i> ,	Almeida et al. (2007)	
		<i>Spodoptera frugiperda</i>		
Solanaceae	<i>Atropa belladonna</i> L	<i>Papiliothoas brasiliensis</i>	Sousa e Mussury (2010)	
	<i>Capsicum frutescens</i> L.**	<i>Microtheca ochroloma</i>	Dequech et al. (2008)	
	<i>Datura suaveolens</i> Humb & Bonpl. ex. Willd	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)	
			<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)
			<i>Liriomyza huidobrensis</i>	Sausen et al. (2007)
			<i>Microtheca ochroloma</i>	Dequech et al. (2008)
	<i>Nicotiana tabacum</i> L.**	<i>Eriopsis conexa</i> (Germar)	Dequech et al. (2010)	
<i>Solanum cernuum</i> Vell	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Boiça Júnior et al. (2005)		
<i>Witheringia solanácea</i> L'Hér**	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Cerda et al. (2019)		
Zingiberaceae	<i>Curcuma zedoaria</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)	
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Knaak et al. (2012)	

Fonte: Spletzer et al. (2021).

2.3 FRUTA-DO-CONDE

A fruta-do-conde (*Annona squamosa*, L.), também conhecida popularmente pelos nomes ata ou pinha, é uma espécie paterna da atemoia, originária das terras baixas da América Central. A árvore da fruta-do-conde, a ateira, é classificada como uma árvore baixa, bastante ramificada e com altura entre 4-6 metros. Suas folhas são de coloração verde, apresentando lâminas oblongo-elípticas, de ápice obtuso ou acuminado, medindo de 5-15 cm de comprimento e 2-6 cm de largura. Seu fruto é considerado um sincarpo arredondado, coberto externamente por uma saliência achatada em forma de tubérculos. A fruta-do-conde apresenta uma polpa doce e aromática, de coloração branca, e com um grande número de sementes (MOSCA et al., 2006). Na Figura 4 está apresentada a morfologia da *Annona squamosa* L.



Fonte: CEAGESP (2021).

Conforme a caracterização físico-química dos frutos da fruta-do-conde, realizado por Salvador (2013), a polpa representa cerca de 40% do peso do fruto, a casca 44 % e as sementes 16%. Souza (2016) avaliou os resultados de caracterização dos frutos da fruta-do-conde e verificou a ocorrência de variação no comprimento dos frutos de 4,27 a 9,1 cm, e no diâmetro de 5,31 a 10,10 cm, sendo esta variação justificada em decorrência de distintos períodos, regiões e tratos culturais aplicados.

As sementes da *Annona squamosa* L. apresentam grandes quantidades de ACGs. Estudos químicos realizados nas sementes da fruta-do-conde identificaram o isolamento de 74 ACGs, sendo que estes compostos também foram relatados na casca e na polpa do fruto. As sementes do fruto da fruta-do-conde são de coloração marrom escuro a preto, medindo cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento e 0,5 a 0,8 cm de largura, com cutícula brilhante (CHAMPY, 2011). O número médio de sementes da fruta-do-conde é de aproximadamente 67,80 sementes, com variação de 66,05 a 69,55 (BOMFIM et al., 2014).

2.3.1 Extratos da fruta-do-conde

A utilização de extratos vegetais utilizando diversas partes da fruta-do-conde vem sendo amplamente estudada (KRINSKI et al., 2014), principalmente devido às grandes quantidades de acetogeninas presentes nesta planta (CHAMPY, 2011). A bioatividade de extratos de frações obtidas a partir de sementes e pericarpo de *Annona squamosa* na germinação de conídios de *Aspergillus nidulans* foi investigada por Guidoti et al. (2021) a fim de verificar a genotoxicidade destes extratos. Os resultados demonstraram que ambas frações utilizadas constituem uma rica fonte de compostos bioativos, sendo que a fração acetato de etila das sementes atuou de forma pró-apoptótica em todas as concentrações. Este resultado foi possivelmente obtido devido à ativação do mecanismo de morte celular programada realizada pelas acetogeninas presentes.

O uso de extratos de sementes, folhas e casca da fruta-do-conde foram utilizados como recurso no combate aos cupins de madeira seca (*Cryptotermes brevis*). Os experimentos realizados demonstraram que o extrato das sementes de *Annona squamosa* são muito eficientes no controle dos cupins, apresentando mortalidade superior do que os extratos de folhas e cascas testados (ALVES et al., 2021). Com o intuito de encontrar uma nova estratégia de controle alternativo da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*), Zarate (2018) desenvolveu uma formulação emulsionável do extrato etanólico da semente da fruta-do-conde. Os resultados do trabalho demonstraram a ação inseticida do extrato etanólico emulsionado de sementes de *Annona squamosa*, evidenciando que nas condições de campo a emulsão do extrato se mostrou superior ao produto comercial Azamax® na mortalidade de lagartas de 3º instar.

Maciel et al. (2020) analisaram os efeitos letais e subletais do extrato hexânico e da microencapsulação de sementes de *Annona squamosa* sobre a *Tetranychus urticae* através da avaliação das propriedades ovicida, repelente, residual, e crescimento populacional instantâneo. Os autores evidenciaram que o extrato de sementes da fruta-do-conde pode ser uma alternativa para o manejo do ácaro *Tetranychus urticae* devido à ocorrência de toxicidade subletal em ambos os experimentos.

Conforme Champy (2011), as acetogeninas presentes nas sementes da fruta-do-conde são inibidores do complexo mitocondrial I (NADH ubiquinona oxido redutase) e apresentam elevada citotoxicidade, com valores de índice de citotoxicidade (IC₅₀) variando de 10 mM a 10⁻⁴ nm. Estas propriedades das ACGs conferem atividades antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, moluscidas, inseticidas e acaricida.

Tabela 2 – Partes utilizadas de *Annona squamosa* como fitoinseticida contra diferentes espécies de insetos

Parte da planta utilizada*	Espécies de insetos (Ordem**)	Referência
F	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.)	Monzon et al. (1994)
S	<i>Aedes albopictus</i> (Dip.)	Kempraj e Bhat (2011)
F	<i>Anopheles gambiae</i> (Dip.)	Daniel et al. (2011)
	<i>Anopheles gambiae</i> (Dip.)	Allisson et al. (2013)
PI	<i>Anopheles stephensi</i> (Dip.)	Saxena et al. (1993)
F	<i>Anopheles subpictus</i> (Dip.)	Kamaraj et al. (2011)
F	<i>Bemisia tabaci</i> (Hem.)	Cruz-Estrada et al. (2013)
S	<i>Callasobruchus chinensis</i> (Col.)	Kotkar et al. (2002)
S	<i>Ceratitis capitata</i> (Dip.)	Epino e Chang (1993)
S	<i>Crocidolomia pavonana</i> (Lep.)	Dadang e Prijono (2009)
S	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.)	Pérez-Pacheco et al. (2004)
	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.)	Daniel et al. (2011)
F	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.)	Allisson et al. (2013)
	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.)	Monzon et al. (1994)
	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.)	Magadula et al. (2009)
F	<i>Culex tritaeniorhynchus</i> (Dip.)	Kamaraj et al. (2011)
S	<i>Drosophila melanogaster</i> (Dip.)	Kawazu et al. (1989)
S	<i>Dysdercus koenigii</i> (Hem.)	Reddy et al. (1993)
S	<i>Epilachna vigintioctopunctata</i> (Col.)	Karunaratne e Arukwatta (2009)
G	<i>Musca domestica</i> (Dip.)	Sharma et al. (2011);
F	<i>Musca domestica</i> (Dip.)	Begum et al. (2010);
S	<i>Musca nebulo</i> (Dip.)	Qadri and Rao (1977)
F	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Col.)	Sreeletha e Geetha (2012)
F	<i>Periplaneta americana</i> (Blat.)	Kesetyaningsih (2012)
	<i>Plutella xylostella</i> (Lep.)	Laetamia e Isman (2004)
S	<i>Plutella xylostella</i> (Lep.)	Dadang e Prijono (2009)
	<i>Plutella xylostella</i> (Lep.)	Sinchaisri et al. (1991)
R	<i>Plutella xylostella</i> (Lep.)	Grainge et al. (1984)
S	<i>Sitophilus oryzae</i> (Col.)	Ashok et al. (2010)
S	<i>Spodoptera litura</i> (Lep.)	Babu et al. (1998)
	<i>Spodoptera litura</i> (Lep.)	Pratibha et al. (2010)
F	<i>Tribolium castaneum</i> (Col.)	Anita et al. (2012)
S	<i>Tribolium castaneum</i> (Col.)	Khalequzzeman e Sultana (2006)
S	<i>Trichoplusia ni</i> (Lep.)	Seffrin et al. (2010)
S	<i>Trogoderma granarium</i> (Dip.)	Rao et al. (2005)

*F= folhas; G= galhos; R= raiz; S= sementes; PI= planta inteira.

**Blat. = Blattodea; Col.= Coleoptera; Dip. = Diptera; Hem.= Hemiptera; Lep. = Lepidoptera.

Fonte: Adaptado, KRINSKI et al., (2014).

2.4 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

O ultrassom é definido como um som acima da audição humana, abrangendo frequências superiores a 20 kHz, por ser uma onda sonora, o ultrassom é transmitido através de substâncias sólidas, líquidas e gasosas, sendo o movimento de suas ondas passadas às moléculas de um determinado meio, criando ciclos de expansão e compressão que o percorrem (CASTRO et al., 2011). Dentre múltiplos efeitos o ultrassom pode produzir vibração, cavitação, esmagamento e mistura, sendo um processo onde parâmetros físicos como potência, frequência e amplitude são fundamentais (WEN et al., 2018).

Os métodos de extração dependem fortemente das propriedades do composto a ser extraído, sendo a extração assistida por ultrassom (UAE) um dos métodos mais eficientes na extração de compostos bioativo de plantas (VINATORU et al., 2017). A extração assistida por ultrassom, quando comparada com outros métodos de extração comum, é uma técnica de extração mais eficiente, barata e simples, facilitando a extração dos compostos, sedimentando os materiais particulados em suspensão e provocando a quebra de células vegetais (ZOU et al., 2011; FERREIRA et al., 2014).

O ultrassom se propaga através de múltiplas ondas de compressão e rarefação induzidas sobre as moléculas. Em altas potências ocorre a cavitação, e bolhas de gás se formam, e crescem por um processo de difusão retificada. O destino destas bolhas quando colapsam em sucessivos ciclos de compressão que geram energia, e durante a sonicação de um material vegetal em um solvente, ocorre o colapso assimétrico destas bolhas provocados pelos sólidos em suspensão, este movimento gera jatos de solventes em direção às partículas dos materiais vegetais, rompendo estes materiais e facilitando a difusão do solvente, e desta forma, aumentando a transferência de massa e consequentemente a eficiência de extração (VINATURU et al., 2017).

Dentre as principais vantagens da utilização da extração por ultrassom destacasse a qualidade, eficiência, custo reduzido, menor tempo de operação, redução do uso de solventes orgânicos, menor temperatura, maior rendimento, maior teor de compostos bioativos dos extratos e melhor pureza destes compostos (WEN et al., 2018).

2.5 ECOTOXICOLOGIA

A toxicologia é descrita como uma ciência que estuda os efeitos nocivos resultantes das interações de substâncias químicas com um determinado organismo. É uma ciência

multidisciplinar que engloba diversas áreas como: biologia, química, bioquímica, farmacologia, física, patologia, imunologia, fisiologia, dentre outros (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Por sua vez, a ecotoxicologia pode ser caracterizada como a avaliação de toxicidade para os ecossistemas, analisando a relação entre os poluentes químicos, ambiente de liberação e os organismos presentes. Neste contexto, a avaliação ecotoxicológica apresenta-se como de extrema relevância nas etapas de controle, regulamentação e classificação das substâncias tóxicas quanto a seu potencial de risco ambiental (SILVA et al., 2015).

A toxicidade apresenta-se como uma característica particular que cada substância tem de ocasionar efeitos danosos a algum organismo, quando este é exposto a estabelecidas doses ou concentrações, por um determinado período de tempo. Os principais fatores que influenciam a toxicidade podem ser descritos como: a rota de administração da substância, a duração e a frequência de exposição e a presença de processos físicos, químicos e biológicos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Assim, a toxicidade das substâncias é determinada a partir de testes de toxicidade. Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais desenvolvidos em condições específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, bem como amostras ambientais, de águas ou sedimentos (COSTA et al., 2008).

O uso excessivo de agrotóxicos liberados nos ecossistemas vem ocasionando diversos impactos e modificações ambientais, devido principalmente a dois fatores: a contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe; e a acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas, como a biota, solo, água, ar, dentre outros (AMÉRICO, 2015). A regulação de agrotóxicos baseia-se nos efeitos dos produtos químicos de forma individualizada. Todavia, a toxicidade combinada dos pesticidas necessita ser avaliada devido à ocorrência de exposição dos organismos não-alvo por estas misturas de produtos que afetam e impactam os ecossistemas aquáticos (WANG et al., 2018). Desta forma, a realização de ensaios ecotoxicológicos utilizando peixes é de extrema importância para a avaliação da qualidade dos corpos hídricos e dos possíveis efeitos ecotoxicológicos dos agrotóxicos no ecossistema (AMÉRICO, 2015). Conforme Ribeiro e Américo-Pinheiro (2018), múltiplos danos ocasionados por substâncias tóxicas podem ser observados nos peixes, como alterações histológicas e morfológicas na estrutura óssea e órgãos.

2.5.1 Peixe-zebra como bioindicador de toxicidade aquática

A seleção de um determinado organismo como referência para testes de toxicidade depende principalmente da sua sensibilidade a poluentes específicos (SALOMAO; AMÉRICO-

PINHEIRO, 2018). Os peixes são amplamente utilizados em estudos ecotoxicológicos devido ao fato destes organismos aquáticos estarem frequentemente expostos a um grande número de substâncias químicas provenientes de diversas fontes, servindo como indicadores de qualidade ambiental (STORCK, 2020).

Os peixes são considerados eficientes bioindicadores da qualidade aquática por possuírem grande diversidade ecológica, que implica em apresentarem diferentes estilos de vida e habitats durante seu ciclo de vida. Assim, respondem de várias maneiras à contaminação, como por exemplo nas mudanças na taxa de crescimento e na maturação sexual. (RIBEIRO e AMÉRICO-PINHEIRO, 2018).

O peixe-zebra (*Danio rerio*), também conhecido como peixe-zebra ou paulistinha, é considerado um dos mais importantes organismos modelo de vertebrados na área da genética. O *Danio rerio* (Figura 5), pertence à família de peixes de água doce Cyprinidae, raramente excede 4 cm de comprimento padrão, e apresenta um padrão de cor distinto exibindo listras horizontais escuras e claras alternadas (SPENCE et al., 2008).

Figura 5 – Peixe-zebra (*Danio rerio*)



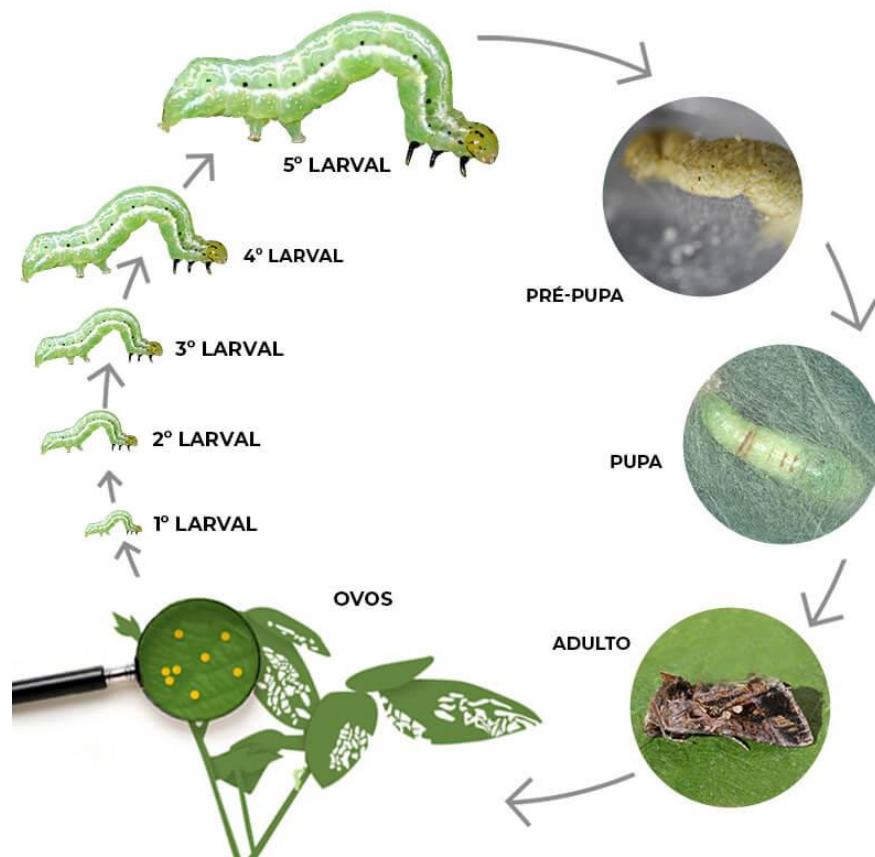
Fonte: Laboratórios de Investigação Médica (2019).

Segundo o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o peixe-zebra apresenta alta taxa reprodutiva com embriões transparentes e exibe 70% de equivalência genética com os seres humanos. Ele também apresenta um rápido desenvolvimento, se tornando adulto aos três meses de vida. Devido a todas estas características, o *Danio rerio* está sendo muito utilizado em pesquisas científicas (INCQS, 2019).

2.6 LAGARTA *Chrysodeixis includens*

A lagarta *Chrysodeixis includens*, popularmente conhecida como lagarta falsa-medideira, pertence à família Noctuidae e subfamília Plusiinae (BOTELHO et al., 2019). Esta lagarta, apresenta mais de 170 espécies vegetais como plantas hospedeiras, atingindo em torno de 30 famílias botânicas, como soja, algodão, girassol, fumo, dentre outros (SPECHT et al, 2015). É um inseto polífono que acarreta a perda da produtividade agrícola, sendo uma das principais pragas das culturas da soja e algodão no Brasil (IRAC, 2022). O ciclo de desenvolvimento desta espécie (Figura 6), inclui as fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulto, durando, em média, 26,6 dias da fase de ovo até o período de pré-oviposição (MITCHELL, 1967; CANERDAY; ARANT, 1967).

Figura 6 – Ciclo de desenvolvimento da lagarta *Chrysodeixis includens*.



Fonte: PROMIP (2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

Utilizou-se como matéria-prima sementes da fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.). As frutas foram coletadas na cidade de Vale Real/RS (29° 23' 52" S, 51° 15' 14" O), oriundas da safra de 2020. Inicialmente, as frutas foram lavadas com água e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio (10%). Na sequência, os frutos foram separados manualmente, conforme seu estado de maturação, em três partes: semente, casca e polpa. Após a separação e classificação, as biomassas foram armazenadas sob refrigeração de -18°C para serem utilizadas posteriormente. Na Figura 7, é possível observar a localização da cidade de Vale Real/RS.

Figura 7 – Localização da cidade de Vale Real, Rio Grande do Sul, Brasil



Fonte: Adaptado de Wikipedia (2021).

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

Para a obtenção do extrato utilizou-se a tecnologia de extração assistida por ultrassom. O procedimento foi realizado no Laboratório de Bioprocessos, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, na cidade de Santa Maria/RS. Primeiramente as sementes da fruta-do-conde foram moídas em um aparelho liquidificador comum e, então, adicionou-se água destilada como solvente da extração. A proporção utilizada de sementes e água destilada foi de 1:4, tendo sido adicionadas 20 g de sementes ao frasco de extração. Após preparada a amostra, a mesma foi inserida em uma unidade de extração assistida por ultrassom acoplada a um banho ultratermostático. A sonda utilizada é o modelo UP400S, da marca

Hielscher. A ponta sonda ultrassônica possui 22 mm de diâmetro, e densidade de potência acústica de 85 W/cm². A extração ocorreu durante 1 h, com amplitude de potência de 100% (400W) frequência de trabalho de 24kHz e ciclo de 0,5. O processo ocorreu sob refrigeração constante de 5°C durante todo o período, em banho ultratermostático (modelo SL 152, Solab, Brasil). Após a extração, a amostra passou por um processo de centrifugação (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha) em rotação de 4000 rpm por 10 min a 10°C. As frações foram separadas e o sobrenadante foi transferido para um béquer, o qual foi filtrado através de um papel filtro inserido em um funil Buchner com bomba de vácuo para se obter o extrato. Após a filtração, o extrato obtido foi levado para secagem em liofilizador para a obtenção do extrato seco em pó. O liofilizador (modelo L101, Liotop, Brasil), foi usado para a liofilização da amostra durante o período de 48 h. Ao finalizar o processo de liofilização, o material obtido foi macerado para posterior utilização. Na Figura 8 é possível visualizar as etapas envolvidas para a obtenção do extrato vegetal.

Figura 8 – Etapas realizadas para a obtenção do extrato



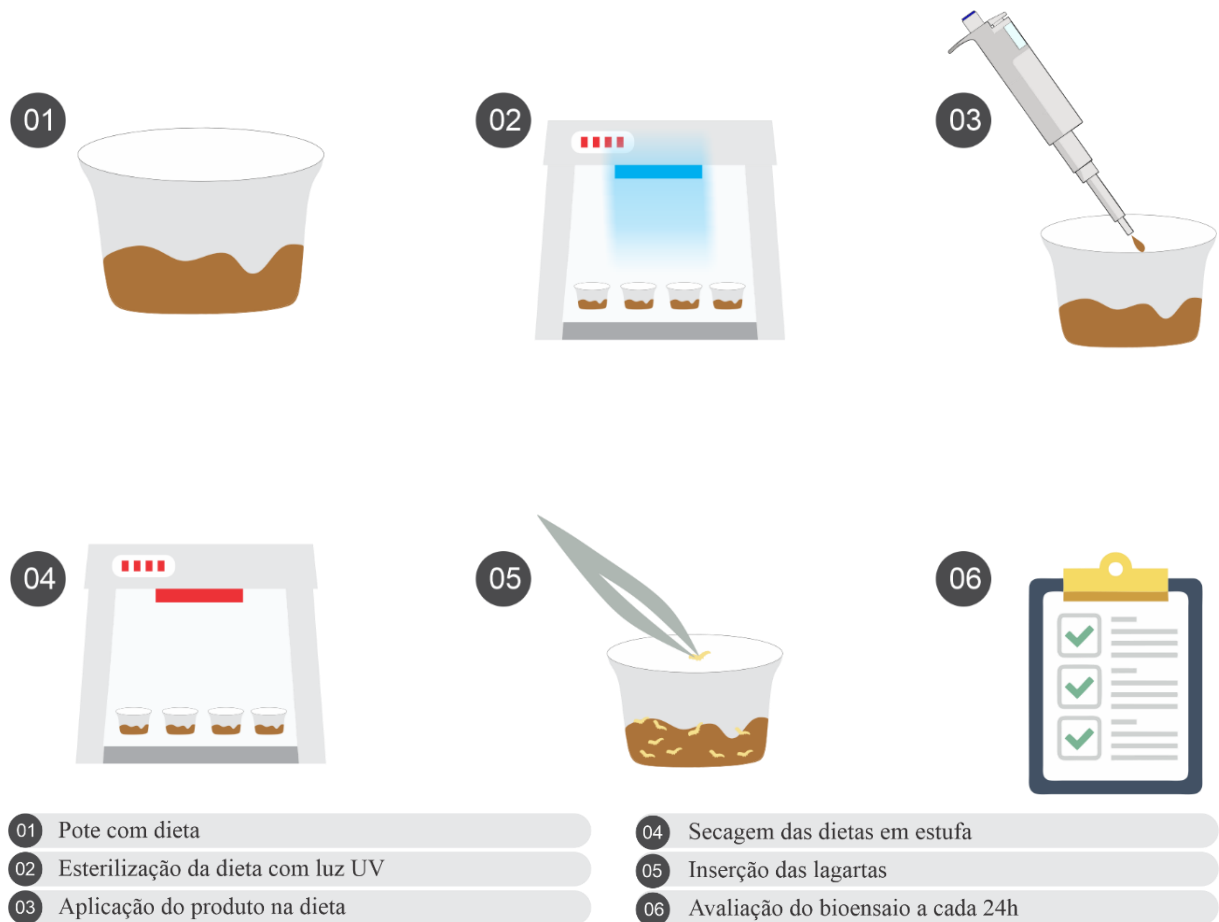
3.3 BIOENSAIOS DE INGESTÃO EM LAGARTAS

Para verificar a ação inseticida do extrato das sementes da fruta-do-conde sobre a lagarta-falsa-medideira, foram realizados bioensaios de ingestão. As lagartas utilizadas para os bioensaios foram oriundas de uma população suscetível criada no Laboratório de Entomologia, no Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria.

As lagartas foram mantidas em dieta artificial proposta por Greene et al. (1976) até a realização dos bioensaios. Utilizaram-se, para a realização dos experimentos, lagartas no terceiro ínstar de crescimento. Para a quantificação das doses foi considerado um volume de calda de aplicação de 100 L/ha. Os insetos foram expostos ao extrato das sementes da fruta-do-conde sob diferentes doses (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g/L), equivalendo-se aos tratamentos de 25; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 750 e 1000 g/ha. Como controle positivo utilizou-se o inseticida comercial Dipel® WG, classificado como inseticida microbiológico de ingestão. Para fins de comparação realizou-se os bioensaios do inseticida Dipel® na dose de 5 g/L (tratamento DIPEL 500 g/ha). Para o controle negativo (testemunha), os insetos não receberam nenhum tratamento ao longo da avaliação, apenas foram mantidos na dieta artificial.

Para a realização dos bioensaios de ingestão, 290 µL de cada tratamento foram aplicados sobre a superfície da dieta e deixado secar. Os insetos foram colocados em dieta específica em potes transparentes com tampa e mantidos em uma sala sob as condições de temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e um fotoperíodo de 14:10 h (claro:escuro). Todos os tratamentos utilizados foram realizados com dez repetições, sendo que cada repetição continha dez lagartas, exceto os tratamentos de 300; 350; 400; 450; 750 e 1000 g/ha, que foram realizados com cinco repetições cada. A mortalidade dos insetos foi avaliada a cada 24 h até o período de 5 dias após a exposição aos tratamentos. As lagartas que não apresentaram nenhum movimento ao toque foram consideradas mortas. Na Figura 9, as etapas envolvidas na realização do experimento de bioensaio de ingestão são apresentadas.

Figura 9 – Esquema do experimento de bioensaio de ingestão



Fonte: Autora, 2022.

3.4 ENSAIOS DE TOXICOLOGIA AQUÁTICA

Com o intuito de avaliar os efeitos toxicológicos dos tratamentos em organismos não-alvo, foi realizado um experimento de toxicologia aquática. Para isso, utilizou-se peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecido como peixe-zebra.

Para a realização deste experimento, seis peixes-zebra foram colocados em aquários, cada um contendo 4 L de solução, sob diferentes concentrações do extrato de semente da frutadocóndea (0,84; 1,68; 2,52; 3,36; 16,8 $\mu\text{g/L}$), do bioinseticida Dipel® (16,8 $\mu\text{g/L}$) e do tratamento de controle negativo, o qual não recebeu nenhum produto, a especificação de cada tratamento pode ser visualizada na Tabela 3. Cada concentração adotada na realização do experimento foi realizada em triplicata. Os peixes foram colocados nos aquários sob aeração constante, durante todo o período de 5 dias. A averiguação do experimento foi realizada a cada 12 h por 5 dias para avaliar a possível ocorrência de efeito letal nos peixes.

Tabela 3 – Tratamentos realizados no experimento de toxicologia aquática

Tratamento	Concentração no aquário (ug/L)	Solução
D500	16,8	Água + Dipel
E25	0,84	Água + ESAS
E50	1,68	Água + ESAS
E75	2,52	Água + ESAS
E100	3,36	Água + ESAS
E500	16,8	Água + ESAS
CTL	0	Água

ESAS: Extrato de semente de *Annona squamosa*.

Fonte: Autora, 2022.

Após a exposição, os peixes foram anestesiados utilizando banho de gelo e depois eutanasiados por secção da medula espinhal. O tecido cerebral e muscular foi removido, homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5. Os homogenados foram centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos e congelados a -80°C para posterior análise. Na Figura 10 é possível observar o esquema realizado para o experimento de toxicologia aquática e a coleta dos tecidos biológicos dos peixes.

3.4.1 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas dos tecidos biológicos coletados foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTAQ), no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Foram realizadas as seguintes análises bioquímicas: acetilcolinesterase (AChE), glutationa-S-transferase (GST), peroxidação lipídica (PLO) e a proteína carbonil (PC).

3.4.1.1 Acetilcolinesterase

Esta enzima foi dosada em cérebro e músculo, devido a sua importância na transmissão neuromuscular. Os ensaios foram realizados em triplicata, considerando um n de 3 (unidade experimental). A enzima acetilcolinesterase (AChE) foi ensaiada usando metodologia descrita por Ellman et al. (1961). A atividade enzimática foi expressa como: μmol de ASCh hidrolisado/min/mg de proteína. Mais detalhes sobre esta análise podem ser vistos em trabalho desenvolvido por Guerra et al. (2021).

3.4.1.2 Glutathione S-transferase

A enzima glutathione-S-transferase (GST) foi medida de acordo com metodologia descrita em Habig et al. (1974). O meio de reação continha 1 mmol de 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) preparado em álcool etílico, 10 mmol glutathione reduzida (GSH), 20 mmol de tampão fosfato (pH 6.5). Neste meio de reação foi adicionado 10 µL do homogenado de cérebro. Uma unidade enzimática (GST) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a conjugação de 1 mmol de CDNB com GSH por minuto em um meio de reação a 25 °C. A atividade foi expressa como: µmol GS-DNB/min/mg proteína.

3.4.1.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada através da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a estimativa de peroxidação lipídica ocorre pela produção de TBARS, que representa a oxidação de lipídeos. A metodologia utilizada foi a de Draper e Hadley (1990). Brevemente descrevendo, 80 µL de homogenado de cérebro foi misturado com 160 µL de ácido tricloroacético (10%), após foi centrifugado (3.000 x g, 10 min). O sobrenadante resultante foi utilizado para dosar peroxidação lipídica. Para o ensaio foi utilizado 100 µL de homogenado, misturado com 100 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) na concentração de 0,67%. Após agitação breve, a mistura foi colocada em banho maria na temperatura de 100°C durante 30 minutos. Os níveis de TBARS foram expressos como nmol MDA/mg tecido.

3.4.1.4 Proteína Carbonil

Para a determinação da proteína carbonil, a dosagem ocorreu utilizando-se a metodologia descrita em Parvez e Raissudin (2005). Esta metodologia foi adaptada para dosagem em peixe zebra no Laboratório de Toxicologia Aquática. Mais detalhes podem ser acessados em Guerra et al. (2021). As proteínas das amostras foram determinadas pelo reagente azul de comassie utilizando-se albumina bovina como padrão, de acordo com o método de Bradford (1976). A proteína carbonil foi expressa em nmol carbonil/mg proteína.

Figura 10 – Esquema do experimento de toxicologia aquática e da coleta dos tecidos biológicos



Fonte: Autora, 2022.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para averiguar a mortalidade das lagartas nos diferentes tratamentos realizados durante os bioensaios de ingestão, os dados obtidos no final do período de avaliação (após 120 h), foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, expressa em média \pm desvio padrão. A verificação da ocorrência de efeitos toxicológicos a partir das análises bioquímicas, foi analisada através de uma ANOVA de uma via, expressa em média \pm desvio padrão. Após a realização da ANOVA, os resultados de ambos experimentos foram analisados através do Teste Tukey, sendo que os resultados significativos foram considerados com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO INSETICIDA

Os bioensaios realizados foram avaliados a cada 24 h após o período de exposição durante o período de cinco dias. A cada avaliação, a quantificação de lagartas mortas foi aferida. Na Tabela 4 é possível visualizar os dados obtidos durante a realização dos bioensaios nos diferentes tratamentos.

Tabela 4 – Resultados obtidos durante a realização dos bioensaios de ingestão nos diferentes tratamentos estipulados

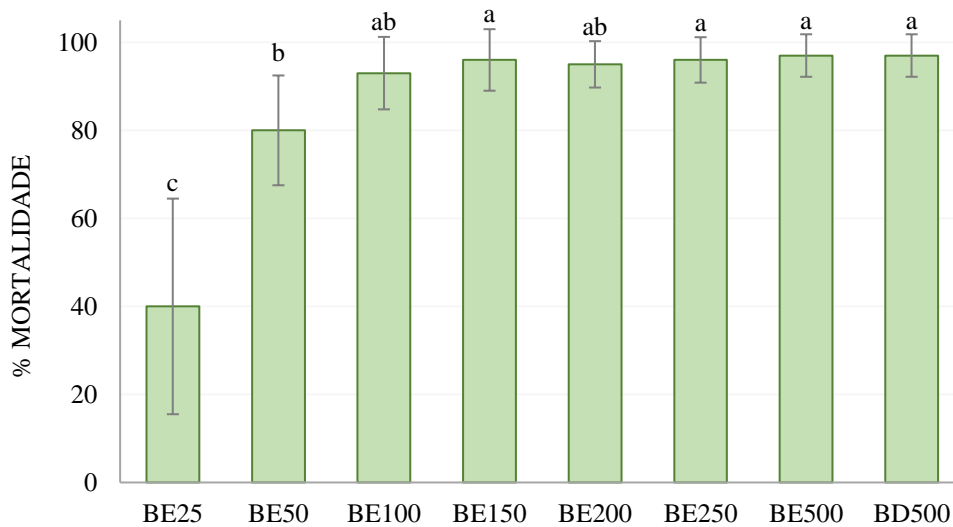
Codificação	Tratamento	Dose (g/L)	Mortalidade (%)				
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
BE25	25 g/ha	0,25	3	11	31	37	43
BE50	50 g/ha	0,5	9	31	60	73	83
BE100	100 g/ha	1	18	50	88	94	96
BE150	150 g/ha	1,5	27	74	96	98	99
BE200	200 g/ha	2	63	81	90	96	98
BE250	250 g/ha	2,5	61	85	97	99	99
BE300	300 g/ha*	3	58	84	100	100	100
BE350	350 g/ha*	3,5	60	86	100	100	100
BE400	400 g/ha*	4	63	82	100	100	100
BE450	450 g/ha*	4,5	66	84	100	100	100
BE500	500 g/ha	5	64	84	100	100	100
BE750	750 g/ha*	7,5	63	96	100	100	100
BE1000	1000 g/ha*	10	67	98	100	100	100
BD500	DIPEL 500 g/ha	5	39	89	99	99	100
TEST	Testemunha	0	0	1	2	3	3

*Tratamentos realizados com metade das repetições

Fonte: Autora, 2022.

Conforme mostrado na Tabela 4, a ocorrência do efeito letal dos produtos nas lagartas foi aumentando gradativamente conforme o passar do tempo da exposição. Dosagens mais altas apresentam maior quantificação de mortalidade nas primeiras 48 h, e após começam a equiparar-se a partir do tratamento BE100. Para proceder a análise estatística, os dados dos tratamentos foram corrigidos conforme a averiguação da mortalidade das testemunhas. Desta forma, após a correção, em 120 h de exposição aos tratamentos, os resultados obtidos são apresentados na Figura 11.

Figura 11 – Mortalidade das lagartas frente aos tratamentos BE25, BE50, BE100, BE150, BE200, BE250, BE500 e BD500, após 120h de exposição

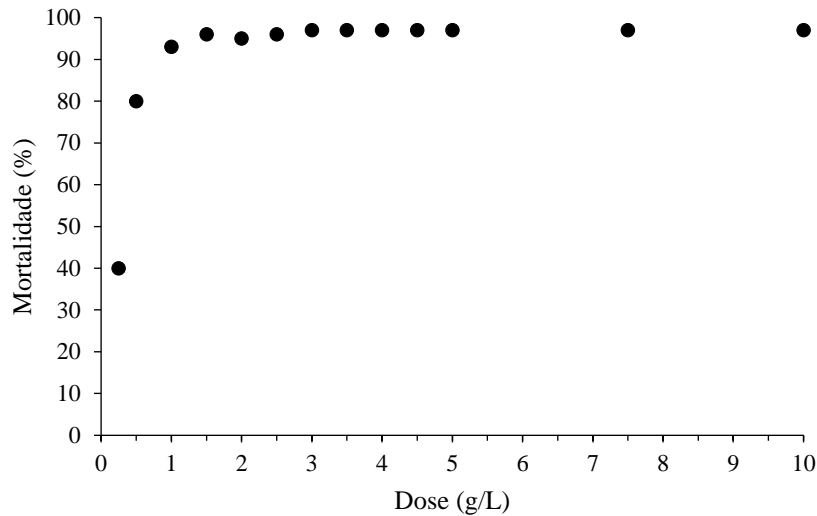


Fonte: Autora, 2022.

Como pode ser visualizado na Figura 11, das sete doses de extrato testadas (BE25, BE50, BE100, BE150, BE200, BE250 e BE500), cinco destas (BE100, BE150, BE200, BE250 e BE500) não apresentaram diferença quando comparado ao tratamento BD500. Assim, pode-se constatar que para o controle da lagarta falsa-medideira doses de extrato de sementes de fruta-do-conde a 1 g/L são tão eficientes quanto às doses superiores testadas para o tratamento extrato e também do tratamento BD500.

Na Figura 12 estão apresentadas as médias dos treze diferentes tratamentos do extrato de sementes de fruta-do-conde realizados nos bioensaios de ingestão para o controle das lagartas *Chrysodeixis includens*. Conforme apresentado é possível constatar, que a nível laboratorial, a dose de 0,5 g/L apresenta eficiência de controle das lagartas de 80% o que já atenderia de maneira satisfatória o controle das lagartas falsa-medideira nas lavouras se a mortalidade permanece neste mesmo nível nas aplicações a campo. A partir da dose 1 g/L a mortalidade dos insetos se estabiliza mesmo com o aumento das concentrações.

Figura 12 – Curva de mortalidade dos insetos nos diferentes tratamentos realizados após 120h de exposição



Fonte: Autora, 2022.

O extrato de sementes de fruta-do-conde, realizado nas condições deste estudo, se mostrou eficiente no controle da lagarta falsa-medideira, sendo que outros trabalhos científicos também relatam a eficiência de extratos desta espécie vegetal. A microencapsulação do extrato de sementes de fruta-do-conde foi eficiente na mortalidade do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), sendo uma alternativa eficaz para o seu controle (MACIEL et al., 2019). Os extratos aquosos de sementes de fruta-do-conde induziram a toxicidade contra todos os estágios dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. Além de serem seguros em organismos aquáticos não-alvo, estes resultados demonstram que o extrato de sementes de fruta-do-conde pode atuar como um agente inseticida alternativo para o controle de mosquitos-alvo (RAMANIBAI et al., 2016).

Conforme Ribeiro et al. (2018), o extrato de sementes de fruta-do-conde apresentou efeito letal e subletal contra o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*), o gorgulho do feijão mexicano (*Zabrotes subfasciatus*) e o gorgulho do feijão-fradinho (*Callosobruchus maculatus*). Além do efeito de toxicidade aguda, o extrato apresentou eficácia superior ao bioinseticida comercial Anoson®. Saleem et al. (2019) avaliaram a eficiência de pesticidas botânicos e os resultados obtidos demonstraram que o extrato de sementes de fruta-do-conde foi o que apresentou maior eficiência de redução (80 e 76%) contra o pulgão do algodão (*Aphis gossypii* Glov.) e o ácaro de duas manchas (*Tetranychus urticae* Koch.). Krinski et al. (2014) relataram 35 trabalhos que utilizaram partes de fruta-do-conde como fitoinseticida contra diferentes espécies de insetos. Destes, 15 relatos são de fitoinseticida utilizando sementes da fruta-do-conde, demonstrando o grande potencial da fruta-do-conde como fitoinseticida.

Outros trabalhos também relatam a ação inseticida de diferentes extratos para o controle da falsa-medideira. Sanini et al. (2017) avaliaram o controle da lagarta falsa-medideira com óleo essencial de pimenta-do-reino (*Piper aduncum* L.). Os resultados mostraram que o óleo essencial de pimenta-do-reino apresentou efeito inseticida em lagartas do terceiro instar nos bioensaios de ingestão. No referido estudo, os tratamentos consistiram da aplicação do óleo essencial de *P. aduncum* diluído em acetona nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0%, e duas testemunhas, sendo elas, água e acetona. Ao final de 120 h de exposição, tanto o tratamento com água, quanto o de acetona, apresentaram 6,7% de mortalidade, o tratamento de óleo essencial diluído em acetona na concentração 0,5% não apresentou mortalidade. Para as concentrações 1,0%, 2,0%, 4,0% e 8,0% registrou-se a mortalidade de 33,3%, 73,3%, 100% e 100%, respectivamente.

Objetivando avaliar a ocorrência de efeito letal e subletal de diferentes extratos vegetais hidroalcoólicos e frações purificadas sobre lagartas falsa-medideira de segundo instar, Warmling (2018) selecionou onze diferentes extratos. Destes, o extrato vegetal que ocasionou maior mortalidade nos insetos, após 120 h, foi o de *Ricinus communis*, apresentando mortalidade de 56,66%. A autora relata que a maior mortalidade aferida neste tratamento pode estar relacionada ao fato de que se utilizou o fruto com a semente para a obtenção do extrato, e não somente folhas como nos outros extratos testados. A fração hexânica do extrato de *Ricinus communis* apresentou 93,30% de mortalidade para a concentração de 10% de hexano.

A avaliação do efeito do extrato bruto de semente de *Annona crassiflora* Mart. em lagartas falsa-medideira apresentou maior mortalidade no bioensaios de aplicação tópica do que no bioensaios de ingestão. Na concentração de 8,0% do extrato de *A. crassiflora*, aferiu-se mortalidade de 60%, 33,3% e 26,6% para lagartas de 1º, 3º e 5º instar respectivamente, na avaliação após 120 h, no bioensaios de ingestão. Enquanto que, para o bioensaios tópico, a mortalidade foi de 86,6% para lagartas e 1º e 3º instar, e de 93,3% para lagartas de 5º instar (MASSAROLLI et al., 2017).

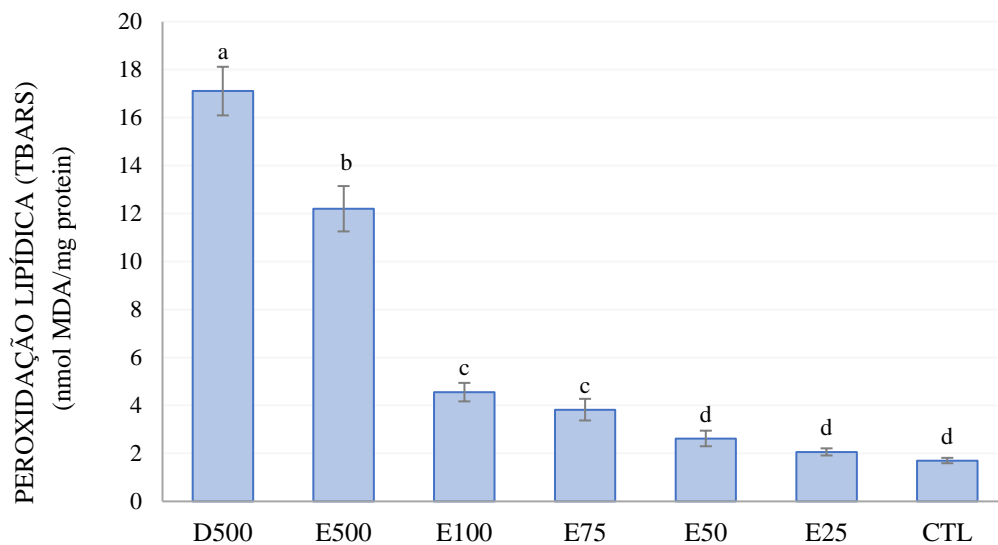
4.2 EFEITOS TOXICOLÓGICOS

A contaminação de peixes por substâncias tóxicas, além de efeitos letais, pode ocasionar efeitos subletais que afetam múltiplos processos morfológicos, fisiológicos e metabólicos quando penetram nos órgãos destes organismos aquáticos. A histologia é um método de avaliação importante no diagnóstico de efeitos tóxicos diretos e indiretos ocasionado em peixes, gerando dados sobre lesões em níveis teciduais (LINS et al., 2010).

Os xenobióticos quando são absorvidos pelos peixes, ocasionam danos metabólicos em seus organismos, produzindo compostos indesejáveis e alterações, que são tóxicos ao organismo, como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Os danos oxidativos ocasionados pelos efeitos das EROs podem ser mensurados através de biomarcadores, como a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteína. A acetilcolinesterase (AChE) e a glutathiona S-transferase (GST) são biomarcadores de exposição à contaminante muito importantes. A enzima GST é utilizada como biomarcador de detoxificação de xenobióticos de um organismo, e a enzima AChE é um biomarcador de efeito sobre o sistema nervoso, avaliando a neurotoxicidade. Portanto quando um organismo é exposto a algum contaminante, pode-se observar alterações na atividade das enzimas AChE e GST (STORCK, 2020).

Para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos do inseticida biológico Dipel® e do extrato de sementes de fruta-do-conde, quatro principais análises bioquímicas dos tecidos biológicos foram realizadas, sendo atividade da acetilcolinesterase (AChE), atividade de glutathiona S-transferase (GST), peroxidação lipídica (PLO) e proteína carbonil (PC). Na Figura 13, é possível visualizar o comportamento dos níveis de peroxidação lipídica registrados após a exposição dos peixes nos diferentes tratamentos de extrato da semente da fruta-do-conde (E25, E50, E75, E100 e E500) e do bioinseticida Dipel® (D500).

Figura 13 – Resultados da análise bioquímica de peroxidação lipídica



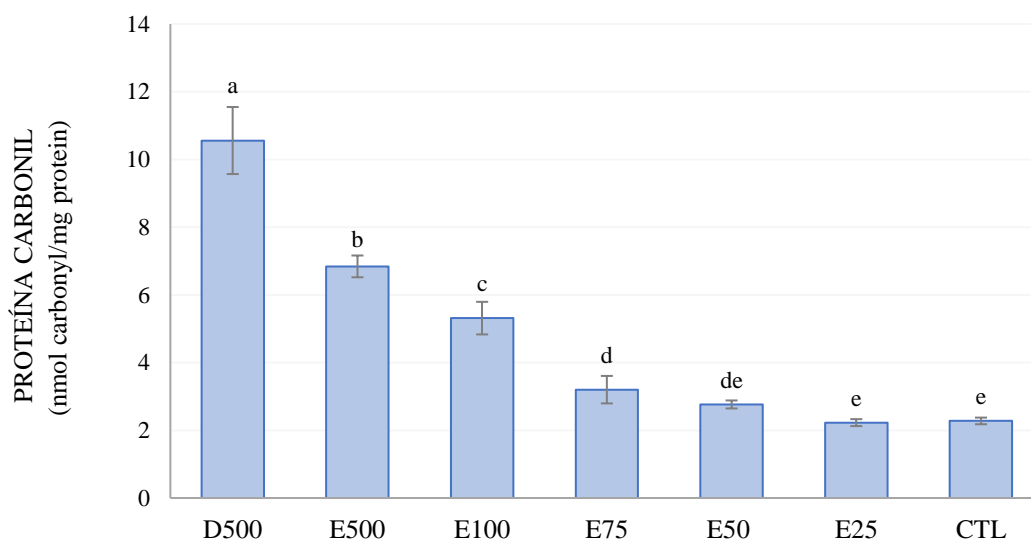
Fonte: Autora, 2022.

Os níveis de peroxidação lipídica foram estimados pela produção de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Conforme Severo et al. (2020), a peroxidação lipídica é uma resposta comum verificada após a exposição a pesticidas. Os níveis de TBARS que indicam a ocorrência de peroxidação lipídica podem ser observados na Figura 13. Conforme os dados os tratamentos E25 e E50 não diferiram significativamente do tratamento controle (CTE), deste modo não apresentaram danos oxidativos durante a exposição. Os tratamentos E75 e E100 não apresentaram diferença significativa entre si, mas apresentaram diferença com os demais tratamentos. O tratamento E500 apresentou média superior de TBARS em relação aos tratamentos CTL, E25, E50, E75 e E100, mas apresentou valores significativamente inferior quando comparado com o tratamento D500. Desta forma, pode-se afirmar que o tratamento D500 foi o que apresentou maiores danos oxidativos aos peixes, seguido do tratamento E500 e, posteriormente, dos tratamentos E100 e E75.

A peroxidação lipídica tem sido descrita como uma das maiores responsáveis pela perda da função celular nas condições de estresse oxidativo, funcionando como um mecanismo de lesão celular, que ocorre pelas reações de radicais livres de oxigênio nas membranas biológicas, e os danos ocasionados nas membranas podem causar uma formação em excesso de proteínas carbonil, que podem ocorrer como resultado do estresse oxidativo (CORDOVA, 2019).

A proteína carbonil mede a oxidação das proteínas, na Figura 14 pode-se visualizar as alterações da proteína carbonil no peixe-zebra após a sua exposição aos tratamentos.

Figura 14 – Resultados da análise bioquímica da proteína carbonil

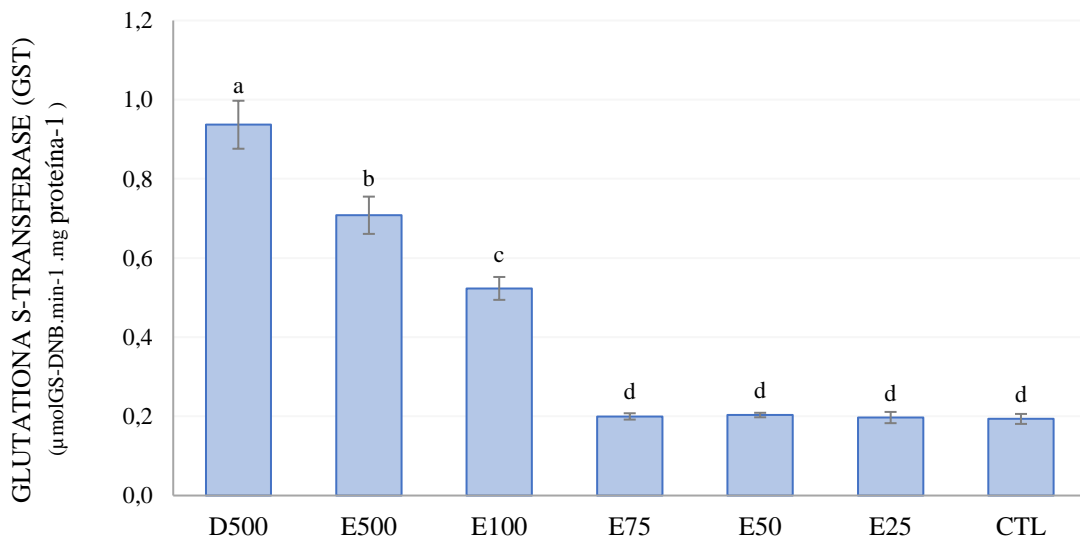


Fonte: Autora, 2022.

Os níveis elevados na produção da proteína carbonil nos tratamentos D500, E500, E100 e E75, coincidem com a alteração nos níveis de TBARS nestes tratamentos, conforme mencionado por Cordova (2019). Níveis elevados de produção de proteína carbonil podem ocorrer como consequência do estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005). A produção da proteína carbonil do tratamento E25 e E50 não diferiram significativamente do tratamento CTL. Os tratamentos E75, E100, E500 e D500 apresentaram diferença significativa com o tratamento CTL e também entre si. A maior média de produção de proteína carbonil foi observada no tratamento D500, seguido do tratamento E500, do tratamento E100 e posteriormente do E75.

Alterações na atividade da enzima glutatona S-transferase ocorrem quando um organismo é exposto a algum contaminante. Esta enzima atua no processo de biotransformação, transformando o composto tóxico em um composto mais facilmente excretável (STORCK, 2020). Desta forma, o aumento dos valores de GST indicam que a enzima passou por transformações para excretar xenobióticos, o que indica a ocorrência de efeito toxicológico dos peixes no referido tratamento. Na Figura 15 pode-se observar as alterações ocorridas na atividade da enzima GST durante a exposição dos peixes nos diferentes tratamentos realizados.

Figura 15 – Resultados da análise bioquímica da enzima glutatona S-transferase



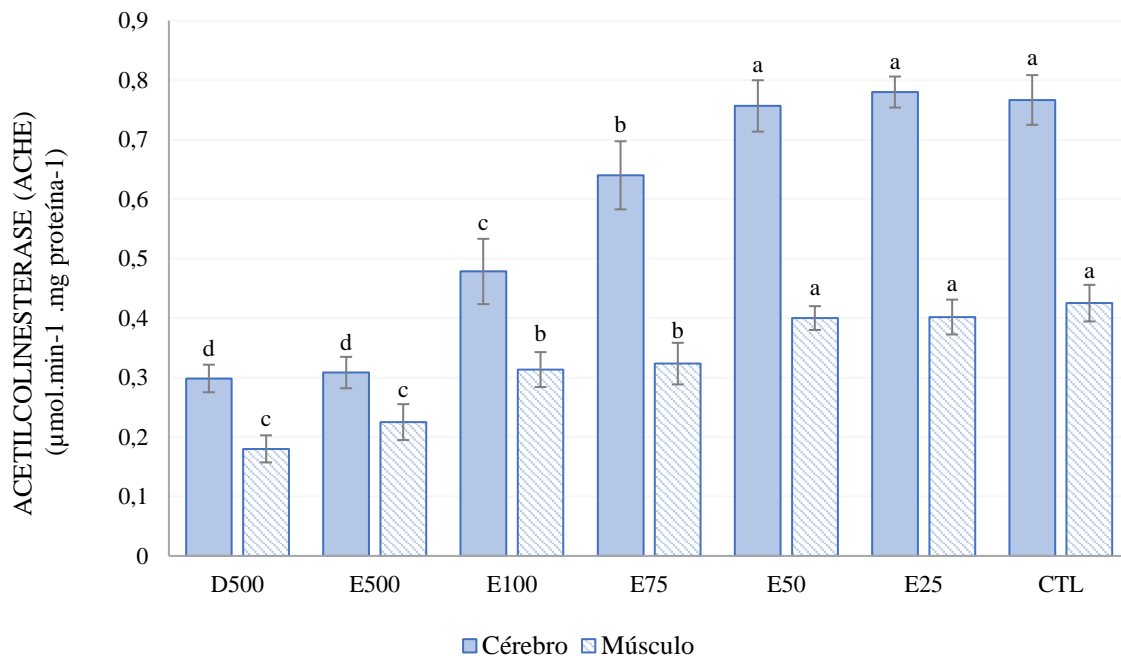
Fonte: Autora, 2022.

A atividade da GST difere dos valores do tratamento controle, e aumenta a partir do tratamento E100, sendo que, o tratamento E100 apresenta diferença significativa com os tratamentos E500 e o D500. Também existe diferença significativa entre os tratamentos E500

e D500, mostrando que, utilizando a mesma dose, os peixes apresentaram maiores danos oxidativos com a exposição do inseticida Dipel® do que com o extrato de sementes da frutadão-conde. Os tratamentos E25, E50 e E75 não diferiram significativamente do tratamento controle (CTL), indicando que nestas condições experimentais a exposição de organismos aquáticos não-alvo como o peixe-zebra, a estas substâncias, seria segura e não ocorreria efeito toxicológico aos peixes.

Diferentemente da enzima glutatona S-transferase, onde a alteração ocorre quando seus níveis aumentam na presença de um determinado contaminante, na enzima acetilcolinesterase a alteração se dá pela diminuição dos valores da enzima, apresentando níveis menores. Muitos pesticidas causam diminuição da atividade da enzima AChE, o que ocasiona alterações musculares e comportamentais em organismos aquáticos como os peixes (DO AMARAL et al., 2017). Os dados obtidos na análise dos tecidos biológicos (cérebro e músculo) do peixe-zebra para a alteração da enzima AChE podem ser visualizados na Figura 16, onde os níveis da atividade da enzima acetilcolinesterase são pontuados conforme a exposição nos diferentes tratamentos e dosagens.

Figura 16 – Resultados da análise bioquímica da enzima acetilcolinesterase



Fonte: Autora, 2022.

Os resultados obtidos através da análise da enzima AChE demonstraram diferença significativa, tanto para cérebro quanto para músculo, nos tratamentos E75, E100, E500 e D500.

Os dados obtidos da AChE (cérebro e músculo) para os tratamentos D500 e E500 não demonstram diferenças significativas entre si. Os menores valores de média observados para a AChE foram a dos tratamentos D500 e E500, representando uma diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Este dado reflete que estes tratamentos ocasionaram maiores danos aos peixes em comparação aos demais tratamentos. Os resultados da análise da AChE para o tecido cerebral indicaram uma diminuição da atividade da enzima para o tratamento E100 e também para o tratamento E75. Todavia, os tratamentos diferiram significativamente entre si, sendo que o tratamento E100 apresentou valor inferior do que o E75, indicando maior ocorrência de danos. Para o tecido músculo, a diminuição da atividade da enzima AChE que ocorreram nos tratamentos E100 e E75 não diferiram significativamente entre si.

Todas as análises demonstram que os tratamentos E25 e E50 não apresentaram diferença significativa com o tratamento controle (CTL), podendo-se concluir que os peixes-zebra não sofreram estresse oxidativo na exposição com o extrato da semente da fruta-do-conde até a dose de 0,5 g/L. Analisando os biomarcadores PLO, PC e GST, pode-se afirmar que na mesma dosagem (5 g/L) o tratamento D500 causou maiores danos oxidativos do que o tratamento E500, evidenciados pelas médias superiores encontradas nos biomarcadores do inseticida Dipel®. Fatores externos como o uso de agrotóxicos geram excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo que isto acaba causando danos aos organismos pelo excesso oxidativo, tendo como resultado a peroxidação lipídica (LEITE et al., 2021).

Os dados obtidos durante a realização do experimento evidenciam a ocorrência de danos nos organismos devido ao estresse oxidativo. Conforme Severo et al. (2020), o contato com agrotóxicos leva a um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são responsáveis pelo estresse oxidativo. Devido a isso, ressalta-se a importância na realização de estudos que avaliem a ocorrência de estresse oxidativo em organismos não-alvo, como é o caso do extrato de Neem, que vem sendo amplamente difundido para uso como biopesticida na agricultura, e alguns trabalhos relatam estes efeitos toxicológicos, como Rael e Rieger (2017). Estes autores avaliaram o efeito genotóxico da azadiractina, o princípio ativo derivado do óleo de neem, sobre o peixe-zebra. O estudo demonstrou que, mesmo em concentrações inferiores às estabelecidas por legislação, a azadiractina apresenta potencial de genotoxicidade no ambiente aquático para o peixe-zebra, além de sugerir a ocorrência de persistência deste composto na água. Mužiniy e Želježiy (2018) estudaram a toxicidade de diferentes inseticidas sobre organismos não-alvo. Dentre estes inseticidas, encontra-se inseticidas a base de óleo de neem. Os autores relatam a ocorrência de diversos efeitos toxicológicos, como alterações de composição, redução de população e danos reprodutivos, comportamentais e genéticos, dentre outros. Estes efeitos

foram reportados em vários tipos de organismos, como zooplâncton, peixes, insetos não-alvo e ratos, destacando-se a importância de realização de estudos complementares de toxicidade destes compostos.

Biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) também são muito utilizados como uma alternativa ao uso de produtos sintéticos no controle de pragas, como é o caso do inseticida biológico Dipel®. Entretanto, ainda existem poucos trabalhos que avaliam a ocorrência e efeitos toxicológicos destes produtos em organismos não-alvo. Simão et al. (2021) avaliaram os efeitos genotóxicos e histopatológicos do inseticida Dipel sobre o peixe tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). O estudo indica que, embora o biopesticida não comprometeu a morfologia dos tecidos em toxicidade aguda, pode ter ocorrido efeito citotóxico e genotóxico nos peixes devido ao aumento da frequência de núcleos segmentados após a exposição ao Dipel. Silva et al. (2020) também avaliaram o efeito do Dipel® sobre a tilápia-do-nilo. O trabalho indica que, após 48 horas de exposição, não houve diferença significativa nos tratamentos controle e Dipel, sugerindo baixa toxicidade do bioinseticida para a tilápia. Este resultado elucida a grande necessidade da realização de estudos complementares, utilizando diferentes concentrações, tempo de exposição variados e biomarcadores diferentes, para tornar possível uma avaliação mais ampla e segura dos dados, que possa informar com confiabilidade os efeitos toxicológicos de diferentes pesticidas utilizados no combate a pragas agrícolas, em organismos não-alvo.

5 CONCLUSÃO

Através dos bioensaios de ingestão realizados foi possível averiguar que o extrato de sementes de fruta-do-conde apresenta atividade inseticida contra a lagarta falsa-medideira, podendo ser considerado um promissor método de controle alternativo para o combate deste inseto-praga. A análise das diferentes doses testadas evidenciou que a dose de 1g/L do extrato das sementes da fruta-do-conde, não difere estatisticamente das dosagens maiores, o que possibilita o controle da lagarta falsa-medideira através de doses menores de produto, acarretando em múltiplas vantagens, principalmente pelo fato de menor disponibilidade de compostos no ambiente.

Os resultados obtidos através dos biomarcadores de exposição à contaminantes (PLO, PC, GST e AChE) mostram a ocorrência de danos oxidativos nos peixes-zebra devido a sua exposição aos compostos a partir do tratamento E75. É importante salientar que as doses estipuladas para a realização dos ensaios de toxicologia deste estudo, são a nível laboratorial, apresentando-se ambientalmente relevantes nas unidades experimentais realizadas, o que não indica necessariamente a ocorrência de danos oxidativos em organismos não-alvos no ambiente em contato com possíveis doses residuais. Pode-se concluir que os tratamentos E25 e E50 se apresentaram seguros considerando os testes realizados em peixe-zebra, pois não diferiram significativamente do tratamento de controle (CTL). Em comparação com o bioinseticida Dipel, o extrato de sementes de fruta-do-conde apresenta efeito inseticida contra a lagarta falsa-medideira e exibe menores efeitos toxicológicos para organismos não-alvo como o peixe-zebra.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O extrato vegetal de sementes de fruta-do-conde obtido por extração assistida por ultrassom se demonstrou eficiente no combate da lagarta falsa-medideira. Estudos complementares sobre a ação inseticida deste extrato podem ser realizados visando a ampliação do conhecimento sobre estes produtos e seu modo de ação frente a diferentes pragas agrícolas. Também se sugere a realização de demais estudos que avaliem a ocorrência de possíveis efeitos toxicológicos de biopesticidas em organismos não-alvo. Desta forma, será possível monitorar melhor os efeitos nocivos das substâncias nos diferentes organismos e garantir maior seguridade no ecossistema como um todo.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, M. *et al.* Biocidal action of silver oak (*Grevillea robusta*) leaf extract on the termite *Heterotermes indicola* Wasmann (Blattodea: Rhinotermitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 1-10, 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Relatório das Amostras Analisadas no período de 2017-2018**. Programa de Análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 10 dez. 2021.
- ALMROTH, B. C. *et al.* Oxidative damage in eelpout *Zoarces viviparus*, measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171-180, 2005.
- ALVES, K. D. O. *et al.* The use of *Annona squamosa* seed, leaf and bark as an alternative in the control of *Cryptotermes brevis*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e204101220307, 2021.
- AMÉRICO, J. H. P. *et al.* O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v.8, n.13. p. 101-115, 2015.
- AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A. M. (coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: RiMa, Intertox, 2003. 322 p.
- BATISTA, M. S. *et al.* Pesticides in insectivorous birds: a quantitative analysis of the contaminatin outlook. **Research, Society and Development**, v.9, n.9, p. e142996483, 2020.
- BOMFIM, M. P. *et al.* Produção, características físico-químicas da pinha (*Annona squamosa* L.) em função do número de frutos por planta. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2014.
- BOTELHO, A. B.R.Z.; SILVA, I. F. da.; ÁVILA, C. J. **Aspectos biológicos da lagarta-falsa-medideira e sua criação em laboratório com dieta artificial**. Circular Técnica, Embrapa. Dourados, MS, 2019.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 3 dez. 2021.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 294, de 29 de julho de 2019**. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá

outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-294-de-29-de-julho-de-2019-207941987>. Acesso em: 3 dez. 2021.

CANERDAY, T. D.; ARANT, F. S. Biology of *Pseudoplusia includens* and Notes on Biology of *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu* and *Autographa biloba*. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, n. 3, p. 870–871, 1967.

CARSON, RACHEL. **Primavera Silenciosa**. 1. Ed. São Paulo: Gaia, 2010. 327 p.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p.1189–1195, 2011.

CEQUINEL, J. C.; RODRIGO, L. C. P. (org.). **Intoxicações agudas por agrotóxicos atendimento inicial do paciente intoxicado**. Paraná, 2018. Disponível em: https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/intoxicacoesagudasagrototoxicos2018.pdf. Acesso em: 4 dez. 2021.

CHAMPY, P. Acetogenins from the Seeds of the Custard Apple (*Annona squamosa* L.) and their Health Outcomes. In: PREEDY, V. WATSON, R. (ed.). **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. Elsevier, 2011, p. 429-437.

COMITÊ DE AÇÃO À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS (IRAC). Bibliografia. **Chrysodeixis includens**. Disponível em: <https://www.ira-br.org/chrysodeixes-includens>. Acesso em 20 jan. 2022.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO (CEAGESP). **Fruta-do-conde**. Catálogo de Identificação. SP: CEAGESP, 2021. Disponível em: <https://ceagesp.gov.br/wp-content/uploads/2020/05/frutadoconde.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2021.

CORDOVA, J. F. L. **Efeito da densidade de estocagem sobre o crescimento e o estresse oxidativo em juvenis de linguado *Paralichthys orbignyanus***. 2019. 48f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2019.

COSTA, C. R. *et al.* A Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Rev. Quím. Nova**, São Paulo, v.31, n.7, 2008.

COUTINHO, K. V. S. **Redução do parasitismo do nematoide das galhas no tomateiro com extratos vegetais de plantas do cerrado baiano**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Universidade do Estado da Bahia, Barreiras, BA, 2021.

DO AMARAL, A. M. B. *et al.* Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, 2017.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** v, 186, p. 421-431, 1990.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 91-94, 1961.

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: Panorama atual e perspectivas na agricultura**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308p.

FERREIRA, B. L. et al. Extração assistida por ultrassom para determinação de Fe, K e Na em amostras de achocolatado em pó. **Braz. J. Food Technol.** v. 17, n. 3, p. 236-242, 2014.

GIORDANI, I. A. et al. Toxicity of pesticides with fungicide and fungicide + insecticide effects to *Eisenia andrei*. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 15, n. 3, 2020.

GOMES, E. M. C.; FIRMINO, A. V.; PENA, R. C. M.; ALMEIDA, S. S. M. S. Efeito inibitório in vitro de extratos de *Cinnamomum zeylanicum* blume no controle de *Cylindrocladium candelabrum*. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 1559-1567, 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/issue/view/1249>. Acesso em: 11 jan. 2022.

GONÇALVES, C. et al. Ecological impacts of pesticides on *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) from the Uruguay river, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, 111314, 2020.

GREENE, G. L; LEPLA, N.C; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GUERRA, L. J. et al. Biochemical and Behavioral Responses in Zebrafish Exposed to Imidacloprid Oxidative Damage and Antioxidant Responses. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 255–264, 2021.

GUIDOTI, D. G. G. et al. Bioatividade de frações de sementes e pericarpo de *Annona squamosa* (Annonaceae) em *Aspergillus nidulans*. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.16, e 021013, 2021.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal Biology Chemistry**. v. 249, p. 7130-7139. 1974.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Exposição no trabalho e no ambiente. **Agrotóxico**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: 22 dez. 2021.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). **A importância do zebrafish para a avaliação toxicológica, um peixe que tem chamado a atenção da comunidade científica, foi tema de palestra de profissional do INCQS**. RJ: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 2019. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1854:a-importancia-do-zebrafish-para-a-avaliacao-toxicologica-um-peixe-que-tem-chamando-a-atencao-da-comunidade-cientifica-e-foi-tema-da-palestra-de-profissional-do-incqs&catid=42&Itemid=132. Acesso em 7 fev. 2022.

ISMAEL, L. L.; ROCHA, E. M. R. Estimate of the contamination of groundwater and surface water due to agrochemicals in the sugar-alcohol area, Santa Rita, state of Paraíba, Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 12, p. 4665–4676, 2019.

JABRAN, K. *et al.* Allelopathy for weed control in agricultural systems. **Journal of Crop Protection**, v. 72, p. 57-65, 2015.

KRINSKI, D; MASSAROLI, A; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Botucatu, v. 36, n. 1 edição especial, p. 225- 242, 2014.

LABORATÓRIOS DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA (LIM). **FMUSP realiza VI Simpósio Zebrafish como Modelo Animal para Pesquisa**. SP: USP, 2019. Disponível em: <https://limhc.fm.usp.br/portal/fmusp-realiza-vi-simposio-zebrafish-como-modelo-animal-para-pesquisa/>. Acesso em: 7 fev. 2022.

LAZZARINI, W.; SANTIAGO, J. P. C. Agronegócio e agricultura sustentável. In: ANDREOLI, C. V.; PHILIPPI JUNIOR, A. **Sustentabilidade no Agronegócio**. Santana de Parnaíba [SP]: Manole, 2021. p. 98-119.

LEITE, D. O. D. *et al.* Chemical Profile and Evaluation of the Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) Extracts. **Foods**, v.10, 2343, 2021.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v.8, n.4, p. 469-484, 2010.

LOPES, C. V. A; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Rev. Saúde Debate**, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.

MACIEL, A. da G. S. *et al.* Lethal and sublethal effects of hexane extract and microencapsulation of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) seeds to *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology**, 2020.

MACIEL, A. da G. S. *et al.* Microencapsulation of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) seed extract and lethal toxicity to *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops & Products**, v. 127, p. 251-259, 2019.

MASSAROLLI, A.; PEREIRA, M. J. B.; FOERSTER, L. A. *Annona classiflora* Mart. (Annonaceae): Effect of crude extract of seeds on larvae of soybean looper *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Plant Protection**, v.76, n.3, p.398 -405, 2017.

MICHETEN, M. V. C.; PESSENTI, I. L. Extractos vegetales en el control de *Brevicoryne brassicae* en *brassicaceans*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e57710313681, 2021.

MITCHELL, E. R. Life History of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Georgia Entomological Society**, v. 2, n. 2, p. 886–890, 1967.

MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L.; DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; CANTRELL, C; QUEIROZ, S. C. N. Pesticidas Naturais Derivados de Plantas: Descoberta e Usos. In:

- HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. de L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (ed.). **Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. Cap. 18. p. 505-541.
- MOSCA, J. L. M.; CAVALCANTE, C. E. B.; DANTAS, T. M. **Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação**. 1. Ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.
- MUŽINIĆ, V.; ŽELJEŽIĆ, D. Non-target toxicity of novel insecticides. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 69, p. 86-102, 2018.
- PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 112–117, 2005.
- PIMENTA NETO, A. A. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 3, p. 267-272, 2020.
- PINHEIRO, E. C.; VASCONCELOS, G. J. N. Efeito letal de extratos de piperáceas ao ácaro vermelho-das-palmeiras, *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae). **Revista Verde, Pombal**, v. 15, n. 3, p. 229-238, 2020.
- PROMIP. **Lagarta-falsa-medideira na cultura da soja**. SP: PROMIP, 2019. Disponível em: <https://promip.agr.br/lagarta-falsa-medideira-cultura-soja/>. Acesso em: 5 fev. 2022.
- RAEL, A. N.; RIEGER, A. Genotoxicidade do composto Azadiractina avaliado através do Ensaio Cometa utilizando *Danio rerio* (Hamilton 1822) como organismo teste. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v.7, n. 2, p. 46-62, 2017.
- RAMANIBAI, R.; PARTHIBAN, E.; BOOTHAPANDI, M. Effect of seed kernel aqueous extract from *Annona squamosa* against three mosquito vectors and its impact on non-target aquatic organisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n.9, p. 741-745, 2016.
- RIBEIRO, L. P. *et al.* Toxicity of an Annonin-Based Commercial Bioinsecticide Against Three Primary Pest Species of Stored Products. **Neotrop Entomol**, v. 47, p. 145-151, 2018.
- RIBEIRO, N. U.F.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. Peixes como bioindicadores de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Revista científica ANAP Btasil**, v. 11, n. 22, 2018.
- RÓDIO, G. R.; ROSSET, I. G.; BRANDALIZE, A. P. C. Pesticides exposure and consequences to human health. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e43010817526, 2021.
- SALEEM, M. S. *et al.* Efficiency of botanical pesticides against some pests infesting hydroponic cucumber, cultivated under greenhouse conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 37, 2019.
- SALOMÃO, G. R.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. Ecotoxicidade de agrotóxicos para macrófitas aquáticas. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 14, n. 2, p. 130-141, 2018.

- SALVADOR, T. de L. **Estudo do desenvolvimento de flores e caracterização físico-química de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.)**. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 2013.
- SÁNCHEZ-BAYO, F. Indirect effect of pesticides on insects and other arthropods. **Toxics**, v.177, n.9, 2021.
- SANINE, C. *et al.* Essential oil of spiked pepper, *Piper aduncum* L. (Piperaceae), for the control of caterpillar soybean looper, *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Braz. J. Bot**, v. 40, n.2, p. 399-404, 2017.
- SBHATU D. B. *et al.*, Larvicidal effectiveness of aqueous extracts of *Solanum incanum* L. (Solanaceae) against *Boophilus decoloratus* (Acari: Ixodidae) cattle tick larvae. **Cogent Food & Agriculture**, v.7, 1949853, 2021.
- SEVERO, E. S. *et al.* Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: A study of biomarkers using zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, 110071, 2020.
- SILVA, C. P. da. *et al.* Extratos Vegetais de Espécies de Plantas do Cerrado Sul-Matogrossense com Potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. **Uniciências**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.
- SILVA, J. S. *et al.* Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Rev. Bioét., Brasília**, v. 23 n. 2, 2015.
- SILVA, L. L. M. da; GARRIDO, R. G. Organofosforados e organoclorados: toxicologia médica e reflexos ambientais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 2021.
- SILVA, S. A. da.; MARIANO, W. dos S.; PAULINO, M. G. Variáveis hematológicas de *Oreochromis niloticus* como biomarcadores de efeitos para a exposição subletal aguda ao biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Desafios**, v. 7, especial, 2020.
- SIMÃO, A. M. T. *et al.* Toxicity assessment of a comercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticide on Nile tilápia, *Oreochromis niloticus*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e2910816775, 2021.
- SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. (org.). **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.
- SOUZA, G. S. *et al.* Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n.10, p. 3269-3280, 2017.
- SOUZA, I. V. B. **Características e qualidade de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.), no estado da Bahia, em função da adubação NK**. 2016. 156f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2016.
- SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, n. 4, p. 343–345, 2015.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, p. 13-34, 2008.

SPLETOZER, A. G. *et al.* Plantas com potencial inseticida: enfoque em espécies amazônicas. **Ciência Forestal**, v. 31, n. 2, p. 974-997, Santa Maria, 2021.

STORCK, T. R. **Avaliação da contaminação de um rio utilizado para abastecimento humano por meio de biomarcadores de toxicidade**. 2020. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2020.

TUDI, M. *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 1112, n.18, 2021.

VINATORU, M.; MASON, T. J.; CALINESCU, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 159–178, 2017.

WANG, Y. *et al.* Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. **Chemosphere**, v. 192, p. 14-23, 2018.

WARMLING, J. V. **Efeitos letais e subletais de extratos vegetais alcoólicos sobre *Chrysodeixis includens* (WALKER, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, 2018.

WEN, C. *et al.* Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 538–549, 2018.

WIKIPEDIA. **Vale Real**. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Vale_Real. Acesso em: 03 dez. 2021.

ZÁRATE, D. J. M. **Desenvolvimento de formulação emulsionável do extrato etanólico de sementes de pinha (*Annona squamosa* L.) e seu efeito residual em condições de semicampo e campo sobre *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2018. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL, 2018.

ZOU, T. -B. *et al.* Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry, Using Response Surface Methodology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3006-3017, 2011.

APÊNDICE A – RESULTADOS DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Tratamento	PLO	PC	GST	AChE Cérebro	AChE Músculo
D500	17,11 ± 1,01 a	10,56 ± 0,99 a	0,94 ± 0,06 a	0,30 ± 0,02 d	0,18 ± 0,02 c
E500	12,20 ± 1,01 b	6,84 ± 0,32 b	0,71 ± 0,05 b	0,31 ± 0,03 d	0,23 ± 0,03 c
E100	4,56 ± 0,39 c	5,31 ± 0,48 c	0,52 ± 0,03 c	0,48 ± 0,05 c	0,31 ± 0,03 b
E75	3,83 ± 0,45 c	3,20 ± 0,41 d	0,20 ± 0,01 d	0,64 ± 0,06 b	0,32 ± 0,04 b
E50	2,62 ± 0,33 d	2,76 ± 0,12 de	0,20 ± 0,01 d	0,76 ± 0,04 a	0,40 ± 0,02 a
E25	2,06 ± 0,15 d	2,23 ± 0,10 e	0,20 ± 0,01 d	0,78 ± 0,03 a	0,40 ± 0,03 a
CTL	1,70 ± 0,11 d	2,28 ± 0,10 e	0,19 ± 0,01 d	0,77 ± 0,04 a	0,43 ± 0,03 a

PLO: peroxidação lipídica; PC: proteína carbonil; GST: glutatona S-transferase; AChE: acetilcolinesterase.