

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

LEONARA EVANGELISTA DE FIGUEIROA

**EFEITO DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE) SOBRE A MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE
Plutella xylostella (Linnaeus, 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E SUA
AÇÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE ABELHAS**

Rio Largo, AL

2019

LEONARA EVANGELISTA DE FIGUEIROA

**EFEITO DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE) SOBRE A MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE
Plutella xylostella (Linnaeus, 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E SUA
AÇÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE ABELHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Roseane Cristina Predes Trindade

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Priscylla Costa Dantas

Coorientador: Prof. Dr. Roger Nicolas Beelen

Rio Largo, AL

2019

LEONARA EVANGELISTA DE FIGUEIROA

EFEITO DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE) SOBRE A MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE
Plutella xylostella (Linnaeus, 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E SUA
AÇÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE ABELHAS

Dissertação submetida à banca
avaliadora como requisito para
conclusão do curso de Mestrado em
Proteção de Plantas.

Roseane Cristina Predes Trindade

Profª Drª Roseane Cristina Predes Trindade, Universidade Federal de Alagoas
Orientadora

Banca examinadora:

Luciano Aparecido Meireles Grillo

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo – Universidade Federal de Alagoas

Mariana Oliveira Breda

Profª Drª. Mariana Oliveira Breda – Universidade Federal de Alagoas

Rio Largo, AL

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por ter me dado o dom da vida e me ajudado em todos os momentos dessa caminhada.

Ao meu filho José Otávio Figueiroa Jorge, que é minha inspiração para continuar a luta diária em busca dos meus objetivos.

A Prof^a Dr^a Priscylla Costa Dantas, por todo o auxílio, solicitude e disponibilidade para que esse trabalho fosse desenvolvido.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Roseane Cristina Predes Trindade, pela orientação e pelo apoio dado no trabalho e por todo conhecimento que me foi passado.

Ao professor do CECA/UFAL, Dr. Roger Nicolas de Beelen, pois sem ele, não seria possível o desenvolvimento do trabalho com as abelhas.

A todos os Docentes do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas.

A Prof^a. Dr^a Alice Maria Nascimento de Araújo pelo apoio com a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauricio Lima pelo o incentivo e amizade.

Aos amigos de Laboratório de Controle Alternativo de Pragas-LECAP - grata pela amizade e companheirismos de todos.

Aos amigos Karen Menezes, Erasmo Ribeiro, Elmadã Pereira e Pedro Silva.

À Universidade Federal de Alagoas – UFAL e ao Centro de Ciências Agrárias – CECA pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

E a todos que de alguma maneira contribuíram, com a minha formação acadêmica.

Leonara Evangelista de Figueiroa.

RESUMO

A família Annonaceae é de grande importância e potencialidade para o desenvolvimento de bioinseticidas, sendo a espécie *Annona muricata* L. (graviola) a de maior destaque com ação inseticida e acaricida comprovada em diversos estudos. A utilização de extratos vegetais como inseticidas botânicos ainda apresentam barreiras a serem vencidas, tais como o desenvolvimento de produtos estáveis e padronizados em relação ao princípio ativo, estudos de modos de atuação, tempo de ação em campo com baixa toxicidade ao homem e aos organismos não alvo, e controle de qualidade dos produtos para serem disponibilizados no comércio assegurando a sua eficiência. O processo de microencapsulamento, que consiste em se obter pequenas partículas que são revestidas formando pequenas cápsulas, pode oferecer um sistema de liberação lenta e controlada do princípio ativo de extratos vegetais, como já comprovado para a graviola e pinha com ação inseticida/acaricida. O modo de atuação é de grande importância para determinar em qual via ocorre a destruição da homeostase do funcionamento do organismo levando a morte, tendo o canal alimentar do inseto o foco da maioria dos estudos. Outro aspecto importante dos inseticidas botânicos é o conhecimento da sua seletividade a inimigos naturais e insetos benéficos, como as abelhas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata* sobre a morfologia do canal alimentar de lagartas de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), uma praga de importância mundial, e sua ação ecotoxicológica sobre abelhas. A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Controle Alternativo de Pragas-LECAP, no Laboratório de Microscopia CECA/UFAL, em Rio Largo/AL e no Laboratório de Tecnologia de Controle de Medicamentos-UFAL, Campus Maceió/AL. A microscopia de varredura foi realizada no Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas-LDN- UFPE. Para o desenvolvimento da formulação microencapsulada utilizou-se o aparelho de modelo BUCHI Mini Spray Dryer B-290 com os polímeros amido, maltodextrina, gelatina e aerosil. As CLs estimadas para a formulação microencapsulada foram de: CL₅₀ e CL₉₉ de 0,157 e 2,49g/L. A formulação microencapsulada causou danos irreversíveis ao canal alimentar da *P. xylostella*, com desorganização e estratificação celular e modificações na morfologia das células consideradas essenciais para a sobrevivência do inseto. A membrana peritrófica se manteve intacta durante todos os ensaios, igualmente como a camada muscular demonstrada através da microscopia de varredura. Ficou evidenciado que com o passar das horas de exposição os efeitos foram mais severos. A formulação microencapsulada de *A. muricata* não demonstrou toxicidade aguda sobre abelhas, demonstrando toxicidade crônica apenas a partir do sétimo dia na CL₉₉ (2,49g) demonstrando potencial acumulativo. As abelhas que entraram em contato com o produto apenas uma vez demonstraram recuperação de sua homeostase.

Palavra-chave: Graviola. Alterações morfológicas. Histologia. Ecotoxicologia

ABSTRACT

The Annonaceae family has a great importance and potential for the development of bioinsecticides, with the species *Annona muricata* L. (soursop), the most prominent with insecticidal and acaricidal action demonstrated in several studies. The use of plant extracts as botanical insecticides still present barriers to be overcome, such as the development of stable and standardized products in relation to the active principle, studies of modes of action and prolongation of field action with low toxicity to man and non-target organisms, and product quality control to be commercially available to ensure their efficiency. The microencapsulation process, which consists of obtaining small particles that are coated forming small capsules, may offer a slow and controlled release system of the active principles of plant extracts, as already has been shown for soursop and pineapple with insecticidal/acaricidal action. The mode of action is of great importance to determine in which route the destruction of the homeostasis of the organism's functioning occurs, leading to death, with the alimentary canal of the insect being the focus of most studies. Another important aspect of botanical insecticides is the knowledge of their selectivity to natural enemies and beneficial insects, such as bees. The objective of this work was to evaluate the effect of the microencapsulated formulation of *A. muricata* extract on the morphology of the food canal of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), a pest of global importance, and its ecotoxicological action about bees. The research was developed in the Laboratory of Alternative Control of Pest-LECAP, in the Microscopy Laboratory CECA/UFAL, in Rio Largo/AL and in the Laboratory of Technology of Control of Medications-UFAL, Campus Maceió/AL. Scanning microscopy was performed at the Devices and Nanostructures Laboratory-LDN-UFPE. For the development of the microencapsulated formulation, the BUCHI Mini Spray Dryer B-290 model was used with the polymers starch, maltodextrin, gelatin and aerosil. The LCs estimated for the microencapsulated formulation were: LC₅₀ and CL₉₉ of 0.157 and 2.49g/L. The microencapsulated formulation caused irreversible damage to the alimentary canal of *P. xylostella*, with disorganization and cellular stratification, and modifications in the morphology of the cells considered essential for the survival of the insect. The peritrophic membrane and the muscle layer remained intact throughout all assays as demonstrated by scanning microscopy. It was evidenced that with the passing hours of exposure the effects over the *P. xylostella* were more severe. The microencapsulated formulation of *A. muricata* showed no acute toxicity to bees, but showed chronic toxicity from the seventh day on CL₉₉ (2.49g) demonstrating cumulative toxic potential. The bees that came in contact with the product only once demonstrated recovery of their homeostasis.

Keyword: Soursop. Morphological changes. Histology. Ecotoxicology

LISTA DE FIGURAS

EFEITO DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) SOBRE A MORFOLOGIA DO CANAL ALIMENTAR DE *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) E SUA AÇÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE ABELHAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura do canal alimentar de *Plutella xylostella* submetida à alimentação com extrato microencapsulado de *Annona muricata* nas concentrações CL₅₀ e CL₉₉.....32

Figura 2 - Secções histológicas do canal alimentar de larvas de *Plutella xylostella* no tratamento controle.....34

Figura 3 - Micrografias de luz do canal alimentar de *Plutella xylostella* submetida à alimentação com extrato microencapsulado de *Annona muricata* na concentração CL₅₀.....37

Figura 4 - Micrografias de luz do canal alimentar de *Plutella xylostella* submetida à alimentação com extrato microencapsulado de *Annona muricata* na concentração CL₉₉.....39

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE ABELHAS EXPOSTAS A FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE)

Figura 1 - Curvas de sobrevivência de abelhas operárias (*Apis mellifera*) alimentadas diariamente com as concentrações subletal e letal da formulação microencapsulada de *Annona muricata*.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

CECA - Centro de Ciências Agrárias

CL - Concentração Letal

CL₅₀ - Concentração Letal capaz de ocasionar 50 % de mortalidade da população

CL₉₉ - Concentração Letal capaz de ocasionar 99 % de mortalidade da população

MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura

UFAL -Universidade Federal de Alagoas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa das concentrações letal e subletal para a formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata*.....32

Tabela 2. Classificação da formulação microencapsulada de *Annona muricata* através da toxicidade crônica e aguda pela mortalidade ao longo do tempo de abelhas operárias (*Apis mellifera*)49

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	09
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
<i>Plutella xylostella</i> (Lepidoptera: Plutellidae).....	12
Controle de pragas com plantas da família Annonaceae.....	12
Microencapsulação.....	13
Estudo do sistema digestivo dos insetos por microscopia óptica e de varredura.....	14
Ecotoxicologia com abelhas.....	16
REFERENCIAS.....	18

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CANAL ALIMENTAR DE *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) SUBMETIDA A FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE)

Resumo.....	24
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	26
Cultivo da Couve.....	27
Criação de <i>Plutella xylostella</i>	27
Obtenção das Sementes e Preparo dos Extratos de <i>Annona muricata</i>	27
Microencapsulado do Extrato de <i>Annona muricata</i>	28
Bioensaio de Toxicidade de <i>Plutella xylostella</i>	29
Dissecação do canal alimentar.....	30
Resultados de Discussão.....	31
Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
Microscopia de luz.....	33
Conclusões.....	39
Referências.....	40

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Annona muricata* L. (ANNONACEAE) SOBRE ABELHAS.....

Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Local de Execução.....	45
Coleta de Enxames.....	45
Testes de Toxicidade.....	46
Resultados e Discussão.....	46
Conclusões.....	50
Referências.....	50

INTRODUÇÃO GERAL

A família Annonaceae engloba um grupo de frutíferas de grande importância mundial, principalmente no Chile, México, Venezuela, Austrália e no Brasil, com cerca de 120 gêneros e em torno de 2.300 espécies. No Brasil, estão registrados 29 gêneros com cerca de 260 espécies, sendo a sua exploração desde o Norte do país até o Estado de São Paulo, com os Estados do Nordeste apresentando a maior produção comercial principalmente de graviola, *Annona muricata* L. e pinha *Annona squamosa* L. (BRAGA SOBRINHO, 2014).

As espécies dessa família de planta são bastante estudadas por químicos e biólogos por suas propriedades farmacológica e biológica, além de serem conhecidas por seus frutos comestíveis. Na área farmacológica, a família Annonaceae apresenta resultados na redução dos níveis de colesterol, diabetes, hipertensão e câncer (ALVES; POVH, 2013; RIBEIRO et al., 2014; TOLKE, 2014), com relatos de propriedades etnobotânicos e etnofarmacológicos, principalmente para graviola (SALESSE et al., 2018).

Na área biológica, Isman; Sefrin (2014) afirmam que essa família de planta é a mais promissora ou com maior potencialidade para se tornar um bioinseticida, principalmente pela presença das acetogeninas, uma classe única de C-35 ou metabólitos secundários C37 derivados de cadeia longa (C-32 ou C34) ácidos graxos na via do policetídeo. Eles são geralmente caracterizados por uma combinação de ácidos graxos com uma unidade de 2-propanol em C-2 que forma um α , β - γ -lactona insaturada (ALALI, LIU; McLAUGHLIN, 1999). Com relação às propriedades inseticidas, são inibidoras do transporte de elétrons mitocondrial, afetando a ação do NADH-ubiquinona oxireductase (ÁLVARES COLOM et al., 2007).

Dentre as espécies dessa família com potencial inseticida e acaricida, têm-se a graviola, *A. muricata* (ALMEIDA et al., 2016; BERNARDO et al., 2016; GOMES et al., 2016; MACIEL et al., 2017; MICHELETTI et al., 2017; PAZ et al., 2018; SANTOS et al., 2018; TRINDADE et al., 2018) e a pinha, *A. squamosa* (SANTOS et al., 2018; MACIEL et al., 2019), principalmente das sementes que são descartadas no processo de industrialização (HERNÁNDEZ; ANGEL, 1997).

A utilização de extratos vegetais sendo utilizados como inseticidas botânicos ainda apresentam barreiras a ser vencidas, como o desenvolvimento de produtos estáveis e padronizados em relação ao princípio ativo, estudos de modos de atuação, tempo de ação em campo mais prolongado e com baixa toxicidade ao homem e aos

organismos não alvo e controle de qualidade dos produtos para serem disponibilizados no comércio assegurando a sua eficiência (MARCOMINI, 2009).

O processo de microencapsulação consiste em se obter pequenas partículas, denominadas de núcleo ou princípio ativo, que são revestidas ou encapsuladas, formando pequenas cápsulas, cuja estrutura é relativamente simples, consistindo de uma pequena esfera com uma parede uniforme em torno dela (JYOTI et al., 2012), podendo oferecer um sistema de liberação lenta e controlada como forma de diminuir a quantidade de ingrediente ativo aplicado no controle de pragas, tornando o produto mais estável. Formulações microencapsuladas de extratos de espécies de Annonaceae já foram desenvolvidas com grande potencial de efeito inseticida (GOMES et al., 2016) e acaricida (MACIEL et al., 2019) para *A. muricata* e *A. squamosa*, respectivamente.

Em relação ao modo de atuação, se faz necessário estudo para determinar quais vias ocorre a destruição da homeostase do funcionamento do organismo o levando a morte, tendo o canal alimentar do inseto o foco da maioria dos estudos, pois é a principal região de contato do inseto com o meio externo e é considerado uma barreira física e química efetiva contra agentes potencialmente invasivos que são ingeridos com alimentos (LEVY et al., 2004).

Mesmo sendo de origem botânica os produtos desenvolvidos no sentido da busca por uma agricultura mais sustentável e que cause menos danos ao meio ambiente, devem ser investigados, uma vez que esses produtos naturais devem ser seletivos e específicos e não generalistas e nocivos principalmente as populações de insetos benéficos, como inimigos naturais e polinizadores como as abelhas (EFROM et al., 2012).

Quando se formula um produto com ação inseticida é de extrema importância avaliar se possui efeitos tóxicos sobre polinizadores nesse caso, sobre as abelhas. A toxicidade de inseticidas sobre abelhas é uma tema que vem sendo bem discutido tanto no Brasil quanto no mundo, afim de proteger a espécie. Já existem diversos relatos na literatura sobre o desaparecimentos de abelhas devido o uso indiscriminado de agrotóxicos (PAREJA et al., 2011).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata* sobre a morfologia do canal alimentar de lagartas de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), uma praga de importância mundial, e sua ação ecotoxicológica sobre abelhas.

REVISÃO DE LITERATURA

1. *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

A traça-das-crucíferas, *P. xylostella*, é reconhecida como uma praga de importância econômica com capacidade de gerar perdas severas na economia agrícola. Originária da região do mediterrâneo, centro de origem das Brássicas, se encontra disseminada em todos os continentes acompanhando a disseminação das culturas (FILGUEIRA, 2008).

É o principal fator limitante do cultivo de crucíferas em áreas tropicais no mundo, dado ao seu elevado número anual de gerações e suas injúrias que são severas, causando danos que diminuem o potencial econômico da cultura. As injúrias contra a planta ocorrem durante todo o ciclo larval de desenvolvimento do inseto (CASTELO BRANCO; GUIMARÃES, 2001).

As injúrias são ocasionadas desde o período larval, isso devido ao fato de se alimentarem inicialmente do parênquima foliar e posteriormente da epiderme da parte inferior das folhas, resultando em perfurações que inutilizam o produto para comercialização (IMENES et al., 2002). Seu grande potencial de danos e importância econômica se deve principalmente, ao curto ciclo biológico e alto potencial reprodutivo, o que determina grande número de indivíduos e de gerações anuais (FRANÇA et al., 1985).

De acordo com Imenes et al. (2002), a oviposição se dá na face inferior das folhas. Após a eclosão, as lagartas de primeiro ínstar “minam” as folhas, alimentando-se por dois ou três dias.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012) o controle pode ser realizado através de controle mecânico: catação das lagartas e esmagamento dos ovos, por controle biológico: *Bacillus thuringiensis*, (Berliner 1915) *Oomyzus gallerucae* (Fonscolombe, 1832) e o controle químico através dos piretroides, oxadiazina, metilcarbamato de oxima, entre outros.

Porém, o método mais utilizado no controle da *P. xylostella* é o químico. No entanto, além dos transtornos ambientais que o uso indiscriminado desses químicos causa, as populações desta praga vêm desenvolvendo resistências cada vez mais severas aos ativos dos compostos agrotóxicos como resultado de pressão seletiva. Sendo necessário o uso de doses cada vez maiores para um controle eficiente (GONG et al., 2014).

Pesquisas demonstram que agrotóxicos a base de piretroides não controlam mais de maneira eficiente a *P. xylostella*. O inseto segue desenvolvendo resistência, na região do agreste pernambucano onde foi detectado populações com alta frequência de indivíduos resistentes a clorantraniliprole (RIBEIRO et al., 2013).

2. Controle de pragas com plantas da família Annonaceae

Cerca de 42 espécies de anonáceas estão registradas como potencial inseticida, distribuídas em 14 gêneros. Apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo que a mais importante economicamente é a graviola (EMBRAPA, 2006), principalmente pela sua importância na fabricação de suco, sorvetes, compotas, geleias e doces, de grande importância econômica para o Nordeste do Brasil (SACRAMENTO; CRUZ, 2003).

Segundo Mclaughlin et al. (1997), durante o processo de extração da polpa na indústria, as sementes que são consideradas resíduos tem grande potencialidade para ser utilizada na confecção de inseticidas naturais.

Aproximadamente 75 acetogeninas foram isoladas de folhas, sementes, casca e raízes de *A. muricata* (BERMEJO et al., 2005), que quando entram em contato com os insetos atuam nas mitocôndrias, inibindo a NADH, o levando a morte (ZAFRA-POLO et al., 1996).

Devido as suas estruturas biológicas e químicas peculiares, as acetogeninas encontradas nas espécies de Annonaceae vêm sendo estudadas por diversos segmentos da ciência. Sabe-se que elas atuam através da desregulação dos níveis de ATP ao inibir o complexo I na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e inibindo a NADH oxidase do plasma das membranas plasmáticas. Sabe-se que as células precisam de alta demanda de ATP, caso ocorra algo que dificulte a produção pode ocorrer à morte celular mais conhecida como apoptose, se ocorrer uma morte celular em grande escala o organismo dificilmente conseguirá se recuperar o levando a morte ou interrupção no seu ciclo biológico (ZAFRA-POLO et al., 1996; ALALI et al., 1999).

Vários trabalhos já evidenciaram a potencialidade de espécies de Annonaceae com atividade biológica potencial, principalmente contra insetos. Bobadilha et al. (2002) demonstraram o efeito dos extratos etanólicos de sementes de *A. muricata* e *A. cherimolia* sobre larvas de *Anopheles sp.* (Diptera: Culicidae) causando 100% de mortalidade de larvas nas concentrações de 0,8 e 1,20 mL / 100 mL, respectivamente.

Asmanizar; Idris (2012) analisou o extrato de *A. muricata* e *Jatropha curcas* (L., 1753) (Euphorbiaceae) nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0% contra o inseto praga de grãos armazenados *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1885) (Coleoptera: Curculionidae), as concentrações (5,0; 10,0 e 20,0 %) do extrato alcançaram mortalidade elevada.

O efeito do extrato orgânico da semente de *A. muricata* mostrou eficiência sobre formas imaturas e adultos de *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard, 1960) (Acari: Tetranychidae) (LIMA et al., 2014). A concentração de 100 ppm do extrato de *Annona coriacea* (Martius, 1868) (Annonaceae) teve 100% de mortalidade para larvas de *A. aegypti* (DILL; PEREIRA; COSTA, 2012). E Trindade et al. (2011) demonstraram uma excelente atividade do extrato etanólico de *A. muricata* (5mg.mL) sobre lagartas de *P. xylostella* obtendo uma mortalidade de 99%. O extrato se mostrou eficiente em diversas concentrações, inclusive nas mais baixas.

3. Microencapsulação

Acredita-se que os primeiros processos de microencapsulação surgiram na década de 1930. Diversas são as áreas que utilizam os microencapsulados, entre elas as ciências agrícolas (FANG; BHANDARI, 2010). Entende-se por microencapsulado quando a microcápsula imita um modelo celular, cujo extrato faz papel do núcleo e é envolvido por uma capa ou membrana semipermeável com a função de proteger a substância do extrato do meio externo e ao mesmo tempo em que se mantenha sob condições adequadas para comercialização do produto sem que haja perda de substâncias (RÉ, 2006).

O processo de encapsulação pode ocorrer a partir de diversas metodologias, a escolha será orientada de acordo com os compostos físico-químicos do extrato, e a intenção do pesquisador. O *Spray drying* foi um dos primeiros processos a serem realizados e vem sendo utilizado até os dias atuais. A secagem por atomização é normalmente conseguida por dissolução, emulsificação ou dispersão do agente ativo numa solução aquosa de material de suporte, seguida pela atomização e pulverização da mistura em uma câmara quente. Durante este processo um filme é formado na superfície das gotas, retardando a perda de moléculas do agente ativo para o meio (GHARSALLAOUI et al., 2007).

A técnica utilizada para realização da microencapsulação vai depender do princípio ativo ao qual se deseja encapsular se dividem em: químicas, físico-químicas e

físico-mecânicas (JYOTHI et al., 2010). Entre os compostos com propriedades para o controle alternativo de pragas agrícolas, estão os extratos vegetais, porém, uma dificuldade encontrada no processo de comercialização, armazenamento e aplicação desses produtos está na sua composição líquida e da sua facilidade de volatilização. Desta forma, surge como solução para essa problemática a microencapsulação desses extratos. É necessário aprofundar nas pesquisas visando avaliar: aplicabilidade do produto no campo e seus efeitos residuais, sua influência sobre os aspectos físico-químicos da produção final, seletividade e efeitos fisiológicos.

Um dos agentes microencapsulantes bastante utilizado é o Aerosil. Muitos pesquisadores vêm investigando alguns produtos formulados a partir de extratos etanólicos vegetais como o de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). As cápsulas de extratos vegetais podem ser classificadas em três tipos dependendo do tamanho: macro (>5000 µm), micro (0,2-5000 µm) e nanocápsulas (<0,2 µm) (FLEMMING, 2012).

Corke (2000) encapsulou betacianina de amaranço pelo método de *spray drying* utilizando como materiais de parede misturas de maltodextrinas dextroses equivalentes (DE) 15 e 20 e de amidos natural. Obtendo excelentes resultados na manutenção dos pigmentos.

O processo de microencapsulação de extratos vegetais deve ser compreendido como uma possibilidade de conservar substâncias menos nocivas ao homem e ao meio ambiente, otimizando a produção de produtos com base natural em maior escala e consequentemente reduzindo o uso exclusivo de agrotóxicos.

4. Estudo do sistema digestivo dos insetos por microscopia óptica e de varredura

O sistema digestivo dos insetos é um tubo contínuo entre a boca e o ânus e compreende três regiões principais: o intestino anterior ou estomodeo, em que o alimento pode ser armazenado, parcialmente digerido. No intestino médio ou mesêntero, realiza-se a digestão química e absorção dos produtos da digestão. No intestino posterior ou proctodeu, o alimento não digerido é secretado para o exterior, sendo nessa região que ocorre o equilíbrio osmótico do organismo (CHAPMAN, 1998).

O sistema digestivo é considerado como o principal local de absorção de substâncias. O ápice das células epiteliais do intestino médio em geral apresenta microvilosidades, sendo estas envolvidas na digestão, absorção de nutrientes, água e

secreção de líquidos, nesse caso para estudos sobre alterações morfológicas e citológicas do órgão o uso da microscopia é imprescindível (TERRA et al., 1996).

O canal alimentar representa a principal área de contato entre insetos e o meio ambiente (CHAPMAN, 1998). A parte mais interessante para ser estudada é justamente a região do mesêntero, onde as células epiteliais estão envolvidas nos processos de absorção e secreção de enzimas (células colunares), homeostase iônica (células caliciformes), função endócrina (células endócrinas) e na renovação do epitélio (células regenerativas) (CHIANG et al., 1986).

Quando os insetos entram em contato com alguma substância nociva a homeostase do organismo, o mesmo desenvolve respostas imunológicas de reações celulares de fagocitose, apoptose, nodulações ou respostas enzimáticas e humorais (LAVINE; STRAND, 2002; SILVA, 2002). Sabe-se que alterações no canal alimentar dos insetos especificamente na região do mesêntero afeta diretamente seu desenvolvimento e sobrevivência, uma vez que a absorção e transformação das substâncias ocorrem nesse local e toda a manutenção do seu processo fisiológico está inteiramente ligada a uma alimentação adequada (NISBET; ROSS; BROOK, 2000).

O uso da biologia celular e molecular (BCM) vem sendo utilizada nas pesquisas de mortalidade e efeitos residuais em organismos vivos, principalmente para justificar o processo de letalidade das espécies sobre as ações dos compostos químicos. Para o desenvolvimento desse tipo de pesquisa se faz necessário o uso da tecnologia microscópica, principalmente em estudos de toxicidade, visto que entre os sintomas da intoxicação estão a paralisia muscular e alterações celulares (CORDOVA et al., 2006).

Os pesquisadores têm utilizado diversas abordagens, de acordo com o problema a ser resolvido, dependendo do objetivo da pesquisa as imagens podem ser da morfologia externa, interna ou citológica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Os microscópios ópticos são de extrema relevância para os estudos morfológicos e histológicos, possuindo aumento de 2000 vezes, sendo assim, muitos detalhes ainda passam imperceptíveis a sua capacidade focal. Nesse caso, tem-se uma excelente alternativa que é o microscópio de varredura (MEV). O MEV consegue demonstrar informações morfológicas com muita precisão, e pode ser utilizado em pesquisas nas mais diversas áreas do conhecimento, sendo imprevisível para estudos que busquem imagens satisfatórias da morfologia externa de organismos vivos estudados. O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais (GALESKI et al., 1996).

A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al., 1987).

5. Ecotoxicologia com abelhas

Os pesquisadores trabalham com a hipótese das abelhas terem surgido a cerca de 300 milhões de anos (PIRANI; CORTOPASSI-LAURINO, 1993; TAUTZ, 2010). São considerados insetos sociais e polinizadores universais de comprovada importância ecológica e econômica, uma vez que polinizam vários hospedeiros de espécies silvestres e de culturas comerciais (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

Com grande capacidade de organização das atividades voltadas para a sobrevivência da espécie, a divisão das castas ocorre entre as milhares de operárias, as centenas de zangões e uma única rainha por enxame (WEISE, 2005).

A relação do homem com as abelhas é muito antiga, porém vem mudando muito ao longo do tempo, juntamente com o processo de industrialização do campo e a chegada dos agrotóxicos veio à degradação da manutenção dessa espécie que é de extrema relevância para a manutenção da agricultura e da vida de maneira em geral.

Durante muito tempo as abelhas foram vistas com uma única finalidade, que é a de produção de produtos comerciais como mel, cera e própolis. Porém, devido à degradação ambiental que vivemos na atualidade, as abelhas passaram a ser enxergadas como um inseto essencial para a manutenção da vida no planeta, com um valor dos serviços ecológicos e econômicos fornecidos pelas abelhas correspondente a 577 bilhões de dólares (FAO, 2018).

Considerando o atual cenário de preocupação com o meio ambiente buscam-se cada vez mais por produtos agrícolas que não causem nenhum dano as abelhas nem a outros polinizadores.

Segundo Tomita; Beiruth (2002), testes de toxicidade são experimentos que proporcionam respostas em estudos sobre efeitos tóxicos letais. Os testes de toxicidade geram dados que servem de base para a elaboração de outros estudos subsequentes as avaliações de risco ecotoxicológicos (LOMBARDI, 2004).

Segundo Matias (1996), ecotoxicologia é a ciência que estuda os impactos deletérios de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes com o meio ambiente. Os

procedimentos dos testes funcionam como uma metodologia capaz de identificar os efeitos de produtos químicos independente de sua origem, sobre a biologia dos organismos. Na sua abordagem verifica-se como o produto reflete diretamente sobre a homeostase do organismo teste (PIVATO; GASPARI, 2006).

O CONAMA nº 357 (CONAMA, 2005) define como um dos parâmetros para classificação, avaliação e monitoramento do meio ambiente. Sobre a escolha dos organismos para o desenvolvimento dos testes, geralmente leva em consideração, a disponibilidade, cadeia alimentar e interesses ecológicos sobre a espécie.

Antes da comercialização de qualquer produto é preciso calcular os benefícios e possíveis danos que esses produtos podem causar ao meio ambiente. Apesar de úteis na agricultura, o amplo emprego dos agrotóxicos tem perturbado o meio ambiente e organismos importantes ao ecossistema (UGURLU, 2015).

No Brasil, existe uma legislação vigente que regulamenta o uso e o registro dos agrotóxicos, entre as diversas exigências para que o produto seja comercializado estão às avaliações toxicológicas ou bioensaios que geralmente são feitos utilizando organismos testes como abelhas, peixes ou crustáceos (IBAMA, 2009).

Dentre as espécies que devem ser protegidas estão as abelhas, ou seja, antes do produto ser comercializado deve passar por bioensaios que verifiquem se o mesmo diminui o seu tempo de vida (MALASPINA et al., 2008). Se um produto causa danos as abelhas, peixes ou crustáceos não deveria ser colocado no mercado, devido ao dano ambiental que o mesmo irá causar.

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliem a ação de extratos botânicos sobre as abelhas, em sua maioria as pesquisas concentram-se em avaliar a toxicidade dos agrotóxicos sintéticos já existentes no mercado. O uso de nim, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), que vem sendo utilizado no controle de diversos insetos se mostrou tóxico quando testado em larvas de terceiro instar de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Apidae) causando grande mortalidade (REMBOL et al., 1982).

Sabemos que os processos fisiológicos que permitem as abelhas tolerar os metabólitos secundários tóxicos encontrados em extratos botânicos, permanece desconhecido. O que se tem conhecimento é que as abelhas possuem um mecanismo metabólico que permite a ela um mecanismo de resistência e tolerância as toxinas sintéticas e que as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo ou desintoxicação das toxinas são a carboxilesterases (COEs), glutathione S-transferase (GSTs) e citocromo P450 (RAND et al., 2015).

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA, C. A. C. et al. Controle de traça-das-crucíferas com emulsão do extrato hexânico de *Annona muricata* L. (Annonaceae) In: **Produção Orgânica no Semiárido.1** Ed.Mossoró: EDUFERSA, v.3, p. 390-398, 2016.
- ÁLVARES COLOM, O. et al. Toxic effects of annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 80, p. 63-67, 2007.
- ALVES, G. S. P.; POVH, J. A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.
- ASMANIZAR, A. D.; IDRIS, A. B. Evaluation of *Jatropha curcas* and *Annona muricata* seed crude extracts against *Sitophilus zeamais* infesting stored rice. **Journal of Entomology**, v. 9, n.1, p.13-22, 2012.
- BRASIL**. Ibama. Portaria Normativa n.84. Estabelece os procedimentos e exigências para o efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental de agrotóxicos, seus componentes e afins, 2009.
- BERNARDO, R. S. S. et al. Controle da traça-das-crucíferas com emulsão de *Annona muricata* L. (Annonaceae) em condições de semi-campo In: **Produção Orgânica no Semiárido.1** Ed.Mossoró: EDUFERSA, v.3, p. 365-374, 2016.
- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, p.269-303, 2005.
- BOBADILHA, A. et al. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller (chirimoya) y *A. muricata* Linnaeus (guanábana) sobre larvas del Vestadío de *Anopheles* sp. **Revista Peruana de Biología**, v.22, n.2, p.64-73, 2002.
- BRAGA SOBRINHO, R. Produção Integrada de Anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, Ed. Especial, p. 102-107, 2014.
- CASTELO BRANCO, M. et al. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 549-552, 2001.
- CHAPMAN, R. F. **The insect: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770 p.

- CHIANG, A. S. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.333-339, 1986.
- CONAMA. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de março de 2005.
- CORDOVA, D. et al. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.84, p. 196-214, 2006.
- CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.
- DILL, E. M.; PEREIRA, M. J. B.; COSTA, M. S. Efeito residual do extrato de *Annona coriacea* sobre *Aedes aegypti*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p.595-601, 2012.
- EFROM, C.F.S.et al. Side-Effects of Pesticides Used in the Organic System of Production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 47-53, 2012.
- EMBRAPA. **Características botânicas das principais anonáceas e aspectos fisiológicos de maturação** – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.
- FANG, Z., BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.510-523, 2010.
- FAO (Food and Agriculture Organization). Conservation and management of pollinators sustainable agriculture-the internacional response. Pp. 19-25. In: B.M Freitas & J.O.B. Portela (eds). **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 285p. 2018
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa. MG: Universidade Federal de Viçosa, 421p. 2008.
- FLEMMING, J. S. **Microencapsulação de nutrientes**. 2012. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/microencapsulacao-nutrientest945/141-p0.htm>>.
- FRANÇA, F. H. et al. Controle da traça das crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, v.3, p.47-53,1985.

- GALESKI, A.; ARGON, A. S.; COHEN, R.E; BARTCZAK, Z. On the plastic deformation of amorphous component in semicrystalline polymers. **Polymer**, v. 37, n.11, p- 2113, 1996.
- GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.
- GOMES, I. B. et al. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 771-775, 2016.
- GONG, W. et al. Chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107 p. 806-814, 2014.
- HERNANDÉZ, C. R.; ANGEL, D. N. Anonáceas con propiedades insecticidas. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M. & REBOUÇAS, T. N. H. **Anonáceas produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia)**. Ceinfo, p. 229-239, 1997.
- IMENES, S. D. L. et al. Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 1, p. 81-84, 2002.
- ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the *Annonaceae*: a unique example for developing biopesticides. In: SINGH, D. (Ed.). **Advances in plant biopesticides**, v. 15, Chap. 2, p. 21-33, 2014.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.231. 2012.
- JYOTHI, N. V. N. et al. Microencapsulation techniques, factors in fluencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187-197, 2010.
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemical Molecular Biology**, 2002;32(10):1295–309.
- LEVY, S. M. et al. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 633-638, 2004.
- LIMA, H. M. A. et al. Toxicidade do extrato orgânico de sementes de *Annona muricata* L. (Annonaceae) sobre *Tetranychus evansi* (Baker & Pritchard, 1960) (Acari: Tetranychidae) em tomateiro **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, p. 201-205, out./dez. 2014.

- LOMBARDI, J. V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.263-272.
- MACIEL, A. G. S. et al. Seletividade do extrato etanólico de *Annona muricata* (L. 1753) (Annonaceae) e de abamectin ao ácaro predador *Amblyseius aerialis* (Muma, 1955) (Acari: Phytoseiidae). **Ciência Agrícola**, v.15, p. 53-58, 2017.
- MACIEL, A. G. S. et al. Effect of *Annona muricata* L. (1753) (Annonaceae) seeds extracts on *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 48, p. 4370- 4375, 2015.
- MACIEL, A. G. S. et al. Microencapsulation of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) seed extract and lethal toxicity to *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 251-259, 2019.
- MALASPINA, O. et al. **Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil**. 41-48. In: Anais do VIII Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 763. 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **MAPA**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.2012.
- MARCOMINI, A. M. **Bioatividade e efeito residual de nanoformulações de nim sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2009.
- MATIAS, W. G. **Etude des mecanismes moleculaire d’action de l’acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, in vivo et in vitro**. 1996. 183p. Tese (Doutorado em Toxicologia Ambiental). Universite de Bordeaux, França.
- MCLAUGHLIN, J. L. et al. **Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: recent progress**. In: HEDIN, P. A.; HOLLINGWORTH, R. M.; MASLER, E. P.; MIYAMOTO, J.; THOMPSON, D. G. Phytochemicals for pest control. American Chemical Society, Washington, p. 117-133, 1997.
- MICHELETTI, L. B. et al. Registro de *Xanthopastis timais* em amarílis e efeito do extrato de sementes de graviola em seu desenvolvimento. **Revista Caatinga**, v. 30, p. 420- 426, 2017.
- NAGATANI, T. et al. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**, v.11, 901-909, 1987.

- NISBET, R.M., ROSS, A.H.; BROOK, A.J. Empirically-based dynamic energy budget models: theory and an application to ecotoxicology. *Nonlinear World*, 3, 85– 106, 2000.
- PAREJA, L. et al. Detection of Pesticides in Active and Depopulated Beehives in Uruguay. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.
- PHAM-DELÈQUE, M. et al. Behavioral methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, v. 33, p. 425-432, 2002.
- PAZ, L. C. et al. Toxicity of the organic extract from *Annona muricata* L. (Annonaceae) seeds on *Brevicoryne brassicae* L. (Hemiptera: Aphididae) in cabbage cultivation (*Brassica oleraceae* L.). **Ciência Agrícola**, v.16, p. 55-60, 2018.
- PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. 1.ed. São Paulo: Edusp/Fapesp, 1993. 49p.
- PIVATO, A.; GASPARI, L. Acute toxicity test of leachates from traditional and sustainable landfills using luminescent bacteria. **Waste Manage**, v. 26, n. 10, p. 1148-55, 2006.
- RAND, E. E. et al. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. **Scientific Reports** 5, n. 11779, p. 1-11, 2015.
- RÉ, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 433-446, 2006.
- REMBOL, H. et al. Azadirachtin: a patent insect growth regulation of plant origin. **Zeitschrift-fur-Angewandte-entomologie**, v, 93, p.12-17, 1982.
- RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.
- RIBEIRO, L. M. S. et al. Fitness costs associated with field-evolved resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Bulletim of Entomological Research**, v. 104, n. 1, p. 88-96, 2013.
- SACRAMENTO, C. K. et al. Physical chemical characterization of fruit of three types of soursop trees (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 329-331, 2003.
- SALESSE, D. et al. Etnobotânica e etnofarmacologia das espécies de Amaryllidaceae, Anacardiaceae, Annonaceae e Apiaceae. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 3, p. 2-5-216, 2018.
- SANTOS, L. et al. Effect of anonaceous extracts on *Aphis gossypii* (Glover, 1887)

(Hemiptera: Aphididae) and selectivity to *Eriopsis connexa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Coccinellidae). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 40, p.e36267, 2018.

SILVA, C.C.A. Aspectos do Sistema Imunológico dos Insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 68-72, 2002.

TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: a evolutionary perspective **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p.675- 734, 1988.

TÖLKE, E. E. A. D. **Estudo Etnobotânico de plantas medicinais na comunidade Caiana dos Mares, Alagoa Grande, PB**. 2014. 60 f. Monografia (Grau de Farmacêutico Generalista) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TRINDADE, R. C. P. et al. Toxicity of soursop extracts to diamondback moth. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 1, p. 104-111, 2018.

TRINDADE; R. C. P. et al. Larvicidal activity and seasonal variation of *Annona muricata* (Annonaceae) extract on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 223-227, 2011.

UĞURLU, P.; ÜNLÜ, E.; SATAR, E.I. The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda). **Environmental of Toxicology and Pharmacological**, v.39, p.720-726, 2015.

WIESE, H. **Apicultura: Novos Tempos**. 2ª.ed. Guaíba: Agrolivros, 2005, 378p.

ZAFRA-POLO, M. C. et al. Acetogenins from Annonaceae, inhibitor of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, p. 253-271, 1996.

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CANAL ALIMENTAR DE *Plutella xylostella*
(Linnaeus, 1758) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE) SUBMETIDA A
FORMULAÇÃO MICROENCAPSULADA DE *Annona muricata* L.
(ANNONACEAE)**

RESUMO

Essa pesquisa objetivou obter informações sobre a morfologia externa e interna do canal alimentar da principal praga das brássicas, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), expostas a extratos de sementes de *Annona muricata* L. (Annonaceae) em formulação microencapsulada. Foram realizados bioensaios de toxicidade das lagartas alimentadas com a formulação microencapsulada por 12, 24 e 48 horas e controle no intuito de verificar e avaliar alterações morfológicas externas e internas provocadas pelo extrato que podem ter causado a morte das lagartas. Após os ensaios as lagartas tiveram o canal alimentar dissecado, fixado, desidratado, emblocado, cortado e corado, sendo então produzidas lâminas histológicas que foram estudadas através da microscopia de luz e de varredura. Os resultados demonstraram que a formulação microencapsulada do extrato de sementes *A. muricata* causou danos irreversíveis ao canal alimentar da *P. xylostella*, com desorganização, estratificação celular e modificações na morfologia das células consideradas essenciais para a sobrevivência do inseto. A membrana peritrófica e a camada muscular se mantiveram intactas durante todos os ensaios, demonstrada através da microscopia de varredura. Ficou evidenciado que com o passar das horas de exposição os efeitos foram mais severos. Esses resultados demonstraram que após o contato por ingestão ocorre a morte do inseto devido a intoxicação e desorganização celular, inibindo a capacidade do inseto continuar se alimentando.

Palavras-chave: Semente de graviola; Traça-das-crucíferas; microscopia de luz; microscopia eletrônica de varredura (MEV)

ABSTRACT

This research aimed to obtain information about the external and internal morphology of the food channel of the main pest of brassica vegetables, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), exposed to the extracts of *Annona muricata* L. (Annonaceae) seeds in a microencapsulated formulation. Toxicity bioassays of the caterpillars fed with the microencapsulated formulation were carried out for 12, 24 and 48 hours and control in order to verify and evaluate external and internal morphological changes caused by the extract that may have caused the death of the caterpillars. After the tests, the caterpillars had the alimentary canal dissected, fixed, dehydrated, chopped, cut and stained, and histological slides were produced which were studied by light and scanning microscopy. The results demonstrated that the microencapsulated formulation of the *A. muricata* seed extract caused irreversible damage to the *P. xylostella* alimentary canal, with disorganization, cellular stratification and modifications in the morphology of the cells considered essential for the survival of the insect. The peritrophic membrane and muscle layer remained intact throughout all assays, demonstrated by scanning electron microscopy. It was evidenced that with the passage of hours of exposure the effects on the insects were more severe. These results demonstrated that after ingestion contact, insect death occurs due to intoxication and cellular disorganization, inhibiting the insect's ability to continue feeding.

Key words: Soursop seed; diamondback moth; optical and scanning electron microscopy.

INTRODUÇÃO

Inseticidas botânicos são cada vez mais estudados, devido à possibilidade da sua utilização na proteção de plantas como um método alternativo ao uso convencional dos inseticidas sintéticos (MEDHINI; DIVAKAR; MANJULAKUMARI, 2012), sendo a família Annonaceae uma das mais promissoras e com grande potencialidade para o desenvolvimento de bioinseticidas (ISMAN; SEFFRIN, 2014), principalmente pela presença das acetogeninas, que são os constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos de anonáceas, uma classe de compostos com ampla atividade biológica, tais como citotóxicas, imunossupressora, inseticida, antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana e antioxidante (LIMA; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010; MATSUMOTO et al., 2010; MIAO et al., 2016).

Com ação inseticida de espécies dessa família, têm-se estudos com uma formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata* L. (Annonaceae) que já foi evidenciada como uma excelente e promissora alternativa pela busca desse controle mais gradativo, eficaz e seletivo tanto para *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (GOMES et al., 2016; SILVA, 2018) quanto para a

formulação microencapsulada do extrato hexânico de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) contra o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) (MACIEL et al., 2019).

Vários inseticidas à base de plantas são citados por influenciar vários componentes bioquímicos, como proteínas, carboidratos e lipídios dentro do corpo de insetos, assim alterando o seu metabolismo interno, causando atividade reduzida ou mortalidade (MEDHINI; DIVAKAR; MANJULAKUMARI, 2012).

O modo de atuação dos constituintes ativos de inseticidas vegetais ainda é pouco explorado, principalmente em relação à ingestão, para elucidar o que acontece com o sistema digestivo dos insetos com o contato dos extratos. O canal alimentar dos insetos, que é formado por três regiões caracterizadas de anterior (estomodeu), região mediana (mesêntero) e posterior (proctodeu), apresenta um alvo de estudos bastante promissor, visto que é a principal região de contato do inseto com o meio externo (ALBUQUERQUE, 2009).

Em Lepidoptera, o tecido epitelial do intestino médio é feito de células colunares, caliciformes, endócrinas e regenerativas que estão envolvidas nos processos de absorção e secreção da enzima, homeostase iônica e renovação do epitélio (SOUSA et al., 2009).

Alterações no canal alimentar do inseto podem causar diversos efeitos no funcionamento do seu organismo entre eles: comprometimento no seu crescimento e alterações no ciclo biológico (TERRA, 1988).

As acetogeninas, que são compostos exclusivos da família Annonaceae, quando entram em contato com os insetos atuam nas mitocôndrias, inibindo a NADH, o levando a morte (ZAFRA-POLO et al., 1996), desta forma, o objetivo desse trabalho foi descrever a morfologia do canal alimentar de *P. xylostella* submetido a tratamento com a formulação microencapsulada do extrato etanólico de *A. muricata* nas concentrações letal e sub letal por 12, 24 e 48 horas após a ingestão, para avaliar qual comprometimento a nível celular ocorria no sistema digestivo.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Entomologia: Controle Alternativo de Pragas (LECAP) no Centro de Ciências Agrárias (CECA) na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em Rio Largo/AL e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Cultivo de couve

Mudas de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* (Brassicaceae) cultivar Georgia, com 25 dias foram adquiridas da estufa SEMEAR[®], no povoado Bálamo no município de Arapiraca/AL e transplantadas para local definitivo em canteiros pertencentes ao Laboratório de Entomologia: Controle Alternativo de Pragas (LECAP), preenchidos com mistura de terra preta, esterco e torta de filtro na proporção 1:1:1. Foram adotados tratamentos culturais segundo Filgueira (2008).

Criação de *Plutella xylostella*

A criação de *P. xylostella* foram realizadas no Laboratório de Entomologia: Controle Alternativo de Pragas (LECAP) sob condições de temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 67 ± 2 % e fotofase de 12 h. Os adultos foram liberados em gaiolas plásticas transparentes circulares (12 cm de diâmetro x 15 cm de altura) com abertura lateral fechada com tela antiáfídeo, nas quais eram colocados um pote plástico coberto com espuma umedecida, sobre a qual, colocava-se um disco de folha de couve medindo 8 cm de diâmetro para servir de substrato à postura e uma esponja embebida com solução açucarada a 10%, na parte superior da gaiola, para alimentação dos adultos. Os discos de folhas de couve eram substituídos diariamente, e os discos retirados mantidos em placas de Petri de 8 cm de diâmetro até a eclosão das lagartas.

Lagartas recém eclodidas foram transferidas para caixas plásticas (20 cm de comprimento x 10 cm de largura x 5 cm de altura) contendo folhas de couve. As folhas eram trocadas diariamente, até as lagartas atingirem a fase de pupa, as quais eram transferidas para tubos de vidro (8,5 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro), fechados com filme plástico. Após a emergência, os adultos foram transferidos para as gaiolas, reiniciando o ciclo de criação.

Obtenção das sementes e preparo dos extratos de *Annona muricata*

As sementes de graviola foram obtidas no município de Anadia/AL, em fábrica de processamento de polpa de frutas. As sementes foram lavadas para retirada de restos de polpa, acondicionadas em uma lona ao sol para retirada do excesso de água e depois colocadas em sacos de papel tipo Kraft para secagem em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60 °C por 72 horas. Após esse período, foram moídas em moinho tipo Wiley e o pó acondicionado em recipiente hermeticamente fechado, pesado e devidamente identificado até o momento do preparo dos extratos. O extrato da semente de graviola foi preparado e processado no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas/UFAL.

Para o preparo do extrato orgânico, primeiramente o pó da semente de graviola foi submetida à extração a frio com hexano em percolador de aço inoxidável. Foram utilizados 16 L de hexano em 12,2 kg de pó. Essa extração foi rápida com uma duração de 2 horas e em seguida, a solução foi filtrada e o solvente separado em rotaevaporador a 50 °C sob pressão reduzida. Após esse procedimento, o extrato hexânico foi colocado em frasco de vidro previamente pesado e etiquetado e acondicionados em capela aberto para a evaporação máxima do solvente.

Sobre a torta resultante da extração com o solvente hexano, foi realizada a extração com etanol (C₂H₆O) a 96 °GL, seguindo a mesma metodologia anterior, porém modificando o solvente, que foram 15 L de etanol no primeiro ciclo, 12 L no segundo ciclo, 10,5 L no terceiro ciclo e 9 L no quarto ciclo, permanecendo no pó por 72 horas, para cada ciclo (total de quatro vezes). O extrato etanólico resultante foi utilizado no processo de microencapsulação para posterior uso nos bioensaios.

Microencapsulação do extrato etanólico de *Annona muricata*

A formulação microencapsulada do extrato etanólico de *A. muricata* foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Controle de Medicamentos da UFAL, através da secagem por pulverização utilizando o aparelho de modelo Buchi® Mini Spray Dryer B-290 (Switzerland), com bico atomizador de 1,0 mm, a uma temperatura de entrada de 200 °C e temperatura de 100 °C, taxa de alimentação de 10ml/min.

A escolha do percentual de cada polímero foi baseada no teor de matéria-seca obtido pelo método gravimétrico, por meio de balança eletrônica de umidade Shimadzu MOC-120H®, com precisão de 1mg e ajustada com secador de infravermelho. Aproximadamente 1 mL do extrato foi seco sob temperatura de 145 °C, até obter perda de umidade inferior a 0,01 %. O teor de matéria-seca utilizada foi de 84%. Os percentuais dos agentes encapsulantes utilizados foram: aerosil (5,55%), amido (8,33%); gelatina em pó sem sabor (8,33%), maltodextrina sem sabor (22,22%). A emulsão foi preparada utilizando água destilada a uma temperatura de 40 °C, seguido da adição dos agentes encapsulantes e incorporação do extrato. Após a uniformização, adicionou-se o dióxido de silício coloidal. Todo processo ocorreu em agitação magnética constante a 1700 rpm. A proporção utilizada de extrato/água destilada/álcool etílico absoluto P.A foi de 50/200/200 mL de acordo com metodologia de Silva (2018) sob depósito de patente BR 10 2018 008313 9.

Toxicidade da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata* para *Plutella xylostella*

Foram estimadas as concentrações letais da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *A. muricata* através da determinação dos valores do limite inferior, com mortalidade quase nula, e valores próximos do limite superior, com aproximadamente 100% de mortalidade. Em seguida, as concentrações foram encontradas através da fórmula de Bliss (1934): $q = (a_n \div a_1)^{1/n+1}$ onde: q = razão da progressão geométrica (pg); n = número de concentrações a extrapolar; a_n e a_1 = limites superior e inferior, respectivamente, da pg. As concentrações testadas para a formulação microencapsulada do extrato etanólico foram: 0,82; 0,5; 0,113; 0,0461; 0,016 mL/L, as quais foram solubilizadas em água destilada acrescentando-se o emulsificante Tween 80 (0,05%), solução com os polímeros e água destilada.

Foram confeccionados discos foliares de 8 cm de diâmetro com folhas de couve cultivar Geórgia, pulverizados com as soluções nas concentrações estimadas, utilizando-se torre de Potter (POTTER, 1952). A aplicação foi realizada a uma pressão de 5 psi/pol² utilizando-se um volume de calda de 2,3 mL, o que corresponde a um depósito de $1,9 \pm 0,37$ mg/cm². Esta quantidade aplicada está de acordo com o recomendado pela IOBC/WPRS (International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/ West Palearctic Regional Section) e representa o que ocorre no campo (REIS et al., 1998).

Os discos tratados com os extratos foram distribuídos sobre uma superfície coberta com papel toalha, onde permaneceram ao ar livre para evaporação do excesso de água. Lagartas de primeiro instar foram colocadas em placas de Petri de 8cm de diâmetro, contendo um disco tratado sobre papel de filtro umedecido com água destilada, para manutenção da umidade, mantidos em laboratório (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h). O tratamento testemunha foi constituído apenas por folhas de couve tratadas com água destilada mais o Tween 80 (0,05%). Um total de 10 lagartas foram transferidas para cada placa (repetição), totalizando 5 repetições por concentração. A partir do terceiro dia da montagem do experimento, iniciou-se a avaliação da mortalidade larval. As concentrações letais (CL) foram estimadas por Probit pelo programa estatístico SAS (SAS Institute, 2003).

Foi realizado um teste a parte com a formulação contendo apenas os polímeros, sem a presença do extrato de *A. muricata*, para comprovar que não ocorre ação biológica dos componentes da formulação.

Dissecação do canal alimentar de *Plutella xylostella* tratadas com a formulação microencapsulada do extrato de *Annona muricata*

Para o estudo da dissecação do canal alimentar foi realizado o mesmo procedimento da metodologia utilizada para estimar as CLs, porém no procedimento de dissecação foram utilizadas 10 lagartas de quarto instar, mas que se alimentaram das folhas de couve tratadas com a CL₅₀ e CL₉₉ da formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata* estimadas para lagartas de primeiro instar, por um período de 12, 24 e 48 horas. Para o tratamento testemunha, as lagartas se alimentaram apenas de folhas de couve tratadas com água destilada mais o Tween 80 (0,05%). Foi padronizado um total de 6 amostras do canal alimentar para os estudos de MEV e microscopia de luz.

Após cada período de ensaio determinado as lagartas foram, inicialmente, resfriadas a 14 e -17°C para imobilização e fixadas com alfinetes entomológicos. Com auxílio de tesoura oftalmológica, foi realizada a dissecação pela região dorsal, sob microscópio estereoscópico, sendo o canal alimentar removido e armazenado em tubos de 1,5 mL, imersos em solução fixadora Zamboni utilizado para microscopia de luz e glutaraldeído 7% em tampão fosfato para os estudos com microscopia eletrônica de varredura (MEV) (STEFANINI; DE MARTINO; ZAMBONI, 1967).

Microscopia de Varredura

A preparação das amostras foi realizada no Laboratório de Dispositivos e Nanoestruturas na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Após dissecação, as amostras do canal alimentar dos insetos foram coletadas e imersas em solução fixativa (glutaraldeído 7%, pH 7,2), e submetidas ao seguinte protocolo: lavagem em água destilada (três vezes de 5 min); pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em água destilada (30 min); desidratação em séries crescentes de álcool etílico; secagem em aparelho ponto crítico CPD 020 (Balzer Union). As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio, *stubs*, com uma fita de carbono dupla face, colocada sobre uma película de papel alumínio, coberto com carbono e observadas em MEV LEO EVO 40XVP para as análises das estruturas do canal alimentar.

Produção das lâminas histológicas e microscopia de luz

Após a fixação utilizando (glutaraldeído 7%, pH 7,2), as amostras foram lavadas por duas horas no mesmo tampão, desidratados em série alcoólica crescente a 30, 50, 70 e 90% (15 minutos cada) e depois em dois banhos de 10 minutos cada em álcool etílico a 99%.

As amostras foram infiltradas, à temperatura ambiente, em dois banhos de quatro horas cada, sendo o primeiro com uma mistura de historesina e álcool (1:1) e o segundo com historesina pura. O material que foi incluído em historesina foi transferido, para cubas de inox e mantidos em temperatura ambiente. Cortes semifinos com 5 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo Leica RM 2155 com navalhas de aço inox.

Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas, as quais foram colocadas em placa aquecida a 50 °C por 15 minutos para que os cortes fossem distendidos e aderidos à lâmina. Posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, por 15 minutos, lavados em água corrente por 10 minutos, corados com eosina por 30 segundos e lavados em água corrente. Para proteção do material, lamínulas foram aderidas às lâminas usando Entellan® (Merck Millipore) como meio de montagem. Em seguida, o material foi fotografado e analisado em microscópio de luz com câmera digital seguindo o protocolo vigente do laboratório de microscopia do CECA, para analisar as estruturas histológicas do canal alimentar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas das concentrações letais da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *A. muricata* foi de 0,15 e 2,49 mL/L, para a CL₅₀ e CL₉₉, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações letais (g/L) da formulação microencapsulada do extrato etanólico de *Annona muricata* sobre *Plutella xylostella*

Tratamentos	n ^a	GL ^b	Inclinação \pm EP ^c	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₉ (IC 95%)	χ^2 ^d	P
Formulação Microencap.	250	3	1,93 \pm 0,18	0,15 (0,12-0,20)	2,49 (1,50-5,12)	6,24	0,100

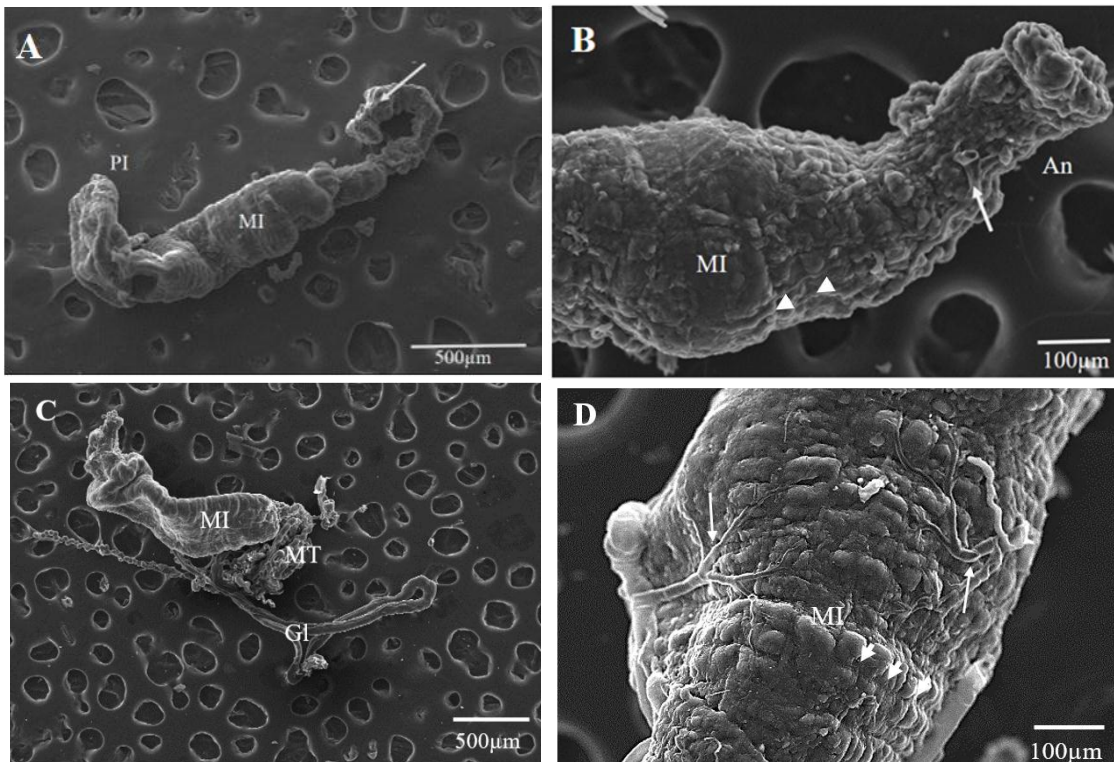
^aNúmero de insetos utilizados em cada experimento; ^b Grau de liberdade do qui-quadrado; ^c Erro Padrão; ^d Qui-quadrado

Fonte: Autora, 2019.

Microscopia Eletrônica de Varredura

O canal alimentar das larvas de *P. xylostella* se apresentou como um tubo alongado pouco diferenciado morfológicamente da boca ao ânus. Externamente, a região anterior mostra-se mais estreita, seguindo para a região média que se apresenta dilatada por possuir maior capacidade de distensão durante a alimentação (Figura 1A e 1B).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da descrição da morfológica do canal alimentar canal de *Plutella xylostella* **A)** Dividido em intestino anterior (seta), intestino médio (MI), intestino posterior (PI). **B)** Intestino anterior (An), intestino médio (MI), tubo traqueal (seta longa), músculos longitudinais (ponta de seta). **C)** Canal alimentar apresentando túbulos de Malpighi (MT) inseridos entre na porção mediana e posterior do intestino (MI), presença da glândula acessória (GI). **D)** Canal alimentar mostrando detalhe das ramificações dos troncos traqueais (setas) envolvendo o tecido do intestino médio (MI), camada muscular circular (pontas de seta).



O intestino posterior possui forma delgada e na extremidade final apresenta uma leve dilatação onde estão inseridos os túbulos de Malpighi (Figura 1C). A disposição da musculatura por todo o canal segue padrão uniforme, como descrito na literatura para *Lepidoptera* (CHAPMAN, 1998). A camada epitelial possui superfície heterogênea apresentando protuberâncias celulares em toda extensão intestinal, e é revestida por duas camadas musculares bem desenvolvidas, sendo a mais interna, apoiando o epitélio, circular e delgada (Figura 1D), e a mais externa longitudinal (Figura 1B). Ocorrem ramificações traqueais ao longo do comprimento do intestino (Figura 1B e 1D).

As larvas tratadas com a formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata* não apresentaram alterações morfológicas nas regiões do intestino anterior,

médio ou posterior. A estrutura epitelial externa manteve-se com seu arranjo original, não sendo observada rupturas ou desorganização do tecido muscular.

Essa foi a primeira descrição das estruturas do canal alimentar de *P. xylostella* por MEV, diferentemente do estudo histológico realizado por Ribeiro et al. (2013).

Microscopia de luz

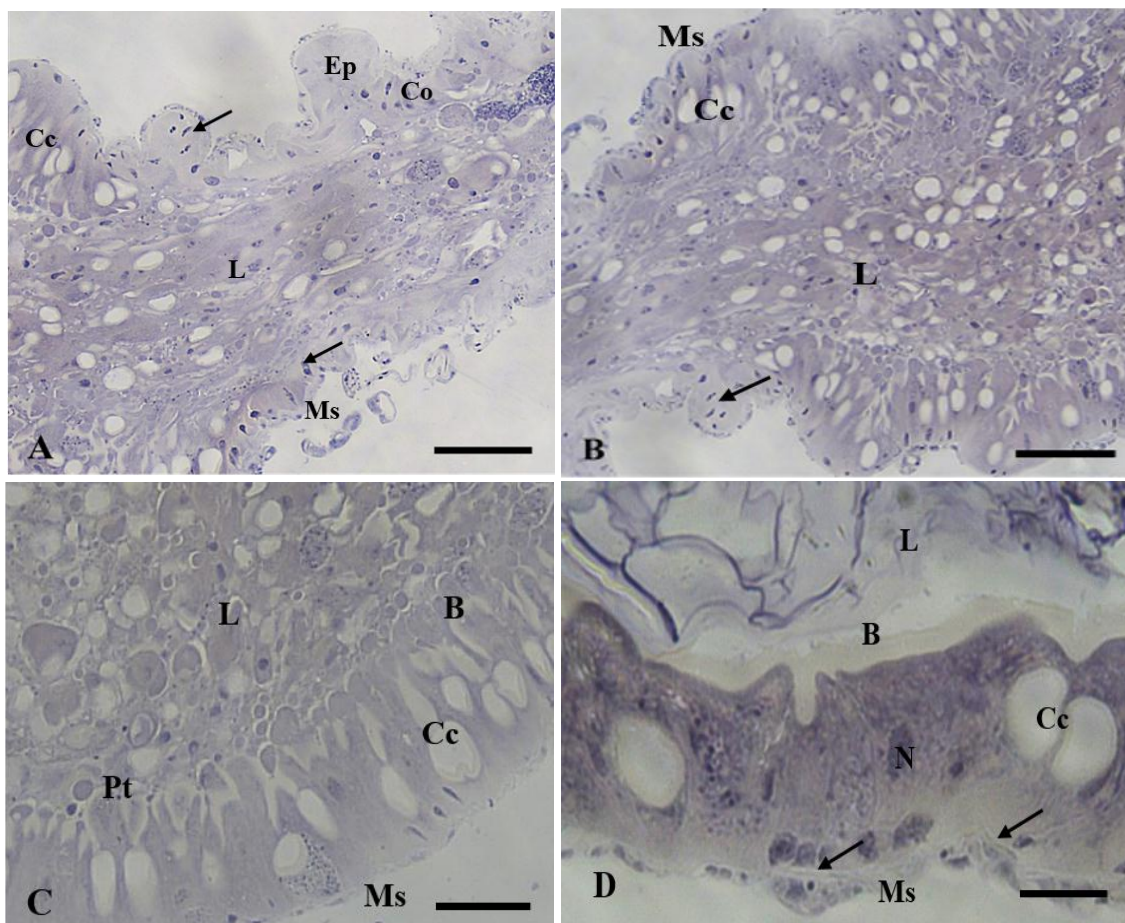
Na análise histológica, do canal alimentar das lagartas de *P. xylostella* antes do tratamento com a formulação microencapsulada, as características foram semelhantes tanto na região anterior quanto na posterior (Figuras 2A e 2D). A organização morfológica apresenta epitélio do tipo simples, composta por camadas de células digestivas dos tipos colunares e caliciformes (Figuras 2A e 2B). Essas células caliciformes foram localizadas por todo o epitélio intestinal, intercaladas pelas células colunares e são caracterizadas pela presença de uma cavidade extracelular que se conecta parcialmente ao lúmen, da mesma forma descrita por Cavalcante; Cruz-Landim (1999) e Pinheiro et al. (2003), sendo que nessa cavidade se encontram vesículas de secreção acumuladas no citoplasma supranuclear, com seu núcleo comprimido na base celular.

Ainda ocorre a presença da borda estriada (Figuras 2C e 2D) e a membrana peritrófica envolvendo o lúmen.

A membrana peritrófica exerce importante função para os insetos, além de compartimentalização da digestão (MARTINS, 1999), serve como barreira física contra danos mecânicos e micro-organismos patógenos (LEHANE; BILLINGSLEY, 1997). Essas características são semelhantes às descritas por Ribeiro et al. (2013) em larvas de *P. xylostella* e Correia et al. (2009) em larvas de *Spodoptera frugiperda*. (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Segundo Sousa et al. (2009), essas características são comumente encontradas em estágios larvais da ordem Lepidoptera.

O epitélio repousa sobre a lâmina basal (Figura 2D) onde é sustentado por duas camadas musculares, uma circular e uma longitudinal I (Figuras 2A-2D). As células digestivas apresentaram núcleo esférico ou alongado com cromatina descondensada e citoplasma com alguns grânulos (Figuras 2A e 2B). As células digestivas possuem borda estriada, em sua superfície apical, no citoplasma das células digestivas, são encontrados pequenos vacúolos (Figuras 2C e 2D).

Figura 2. Secções histológicas do canal alimentar de larvas de *Plutella xylostella* no tratamento controle. **A-B)** Porção anterior do intestino médio com epitélio (Ep) composto de células digestivas colunares (Co) e caliciformes (Cc), núcleos esféricos ou alongados (setas), camada muscular (Ms), envolvendo o lúmen intestinal (L); **C-D)** Região posterior do epitélio intestinal com presença de borda estriada (B), células caliciformes com grandes vesículas de secreção, núcleos (N) com cromatina homogênea, presença de protusões citoplasmáticas (Pt) sendo liberadas no lúmen intestinal (L), camada muscular (Ms) e lâmina basal (setas). Barra 20µm



Por toda extensão epitelial ocorrem protusões citoplasmáticas de tamanhos e formas diferentes (Figura 2C) sendo eliminadas pelas células e liberadas na região do lúmen. Para Pinheiro et al. (2008), as protusões são resultantes do processo de secreção apócrina de enzimas digestivas para o lúmen. As protusões citoplasmáticas estão principalmente relacionadas com processos de degeneração, servindo para eliminação de componentes celulares (DE PRIESTER, 1971).

A morfologia do canal alimentar de *P. xylostella* submetida a concentração subletal da formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata* demonstrou alterações no epitélio intestinal a partir da avaliação de toxicidade de 12 horas, onde já

foi identificado desorganização e estratificação celular (Figuras 3A e 3B) porém, as alterações foram intensificadas a partir da avaliação de 24 horas (Figuras 3C e 3D). Foram constatadas desorganização e estratificação do epitélio com modificações das estruturas da borda estriada. Alterações no epitélio também foi verificada num estudo do canal alimentar de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) com um extrato metanólico de anonácea, *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae) (BASTOS et al., 2018).

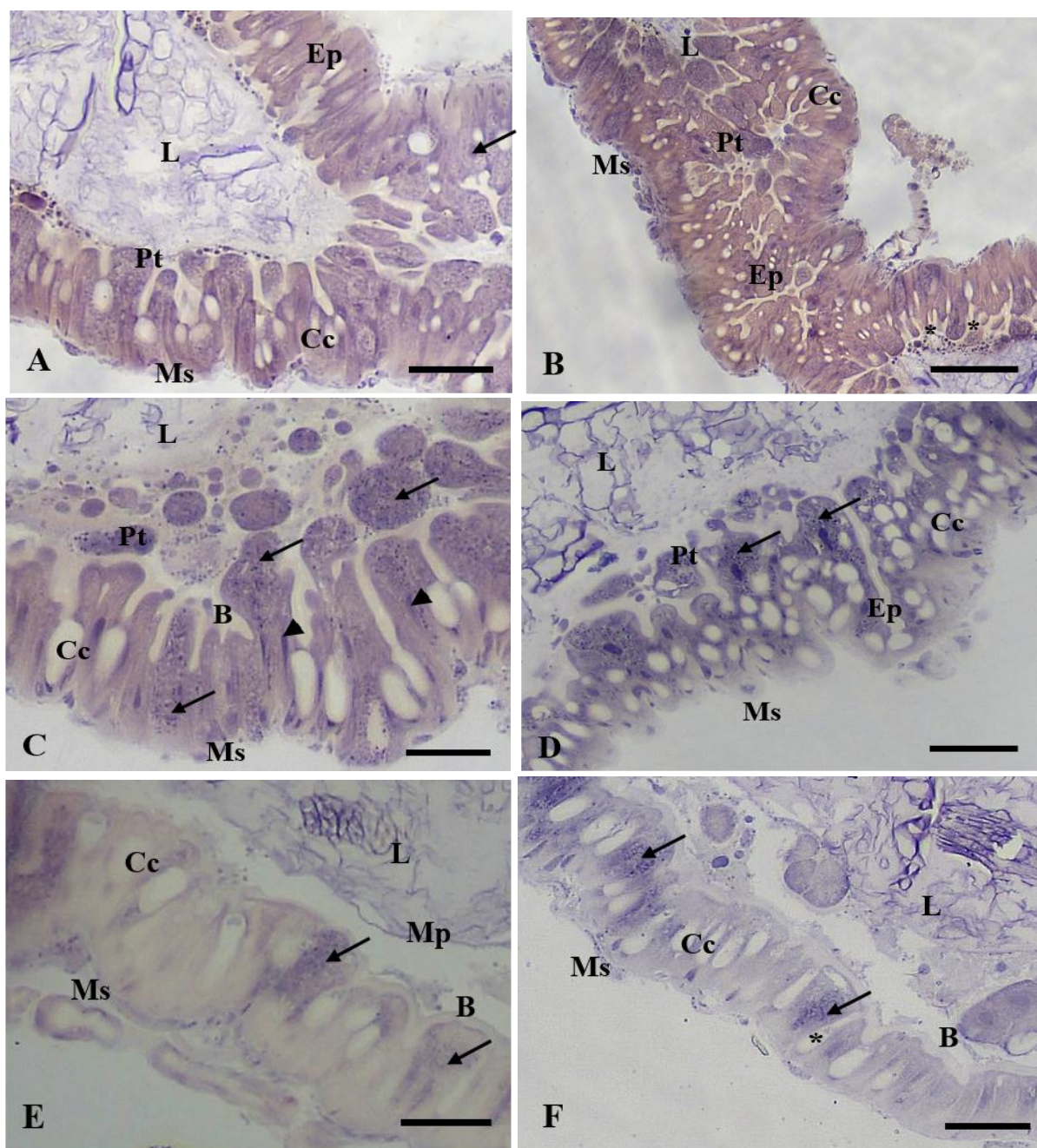
Identificaram-se modificações na borda estriada com células caliciformes com morfologia alterada (Figuras 3C e 3D), localizadas por todo epitélio do mesêntero e intercaladas por células colunares. As células caliciformes têm como função principal realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, mantendo a homeostase iônica e cooperando com as células colunares na absorção de metabólitos (BILLINGS; LEHANE, 1996; CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

Alterações e desorganização celulares no epitélio, células caliciformes e colunares também foram verificadas em larvas de *Dione junio junio* Cramer, 1779 (Lepidoptera: Nymphalidae) tratadas com extrato de nim *Azadirachta indica* L. (Meliaceae) (CARDOSO, CONTE, NANYA, 2011). Mordue (Luntz); Nisbet (2000), em seus estudos afirmam que a azadiractina, princípio ativo do nim, é absorvida pelas células digestivas causando inibição da divisão celular. Esses efeitos também corroboram com os estudos dessa pesquisa com a formulação microencapsulada de *A. muricata*, pois sabe-se que as acetogeninas, principal princípio ativo de espécies de *Annona*, apresentam ação nas mitocôndrias com alterações celulares (ISMAN; SEFFRIN, 2014), contribuindo para esse comportamento no canal alimentar.

As protusões citoplasmáticas foram observadas em lagartas antes do tratamento com a formulação microencapsulada, mas ocorreu um aumento nas lagartas após o tratamento com a formulação microencapsulada (Figura 2C). Resultados semelhantes foram identificados em lagartas de *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidade) após ingestão de delta toxina do *Bacillus thuringiensis* (PANDEY; JOSHI; TIXARI, 2009).

Foi constatada a presença de grânulos densos no citoplasma e células caliciformes alteradas, mas a membrana peritrófica continuou intacta envolvendo o bolo alimentar presente no lúmen e grânulos densos (Figuras 3E e 3F).

Figura 3. Micrografias de luz do canal alimentar de *Plutella xylostella* submetida à alimentação com extrato microencapsulado de *Annona muricata* na concentração CL₅₀. **A – B)** Epitélio intestinal após 12h de exposição ao extrato, presença de células caliciformes (Cc), protusões citoplasmáticas (Pt), camada muscular (Ms), desorganização e estratificação proeminente do epitélio (Ep), núcleo (seta), modificação da estrutura da borda estriada (asteriscos), lúmen (L); **C – D)** Epitélio intestinal após 24h de exposição ao extrato, mostrando desorganização celular, com secreções aprócrinas (Ep) e vesículas secretoras (Pt) expelidas do epitélio sendo visíveis no lúmen (L), presença de grânulos densos no citoplasma (setas longas), células caliciformes (Cc) com morfologia alterada, camada muscular (Ms), núcleo irregulares (ponta de seta); **E –F)** Epitélio intestinal após 48h de exposição ao extrato, com presença de membrana peritrófica intacta (Mp) envolvendo o bolo alimentar presente no lúmen (L), camada muscular (Ms), células caliciforme (Cc) apresentando secreção (asterisco) (F), borda estriada (B), grânulos densos no citoplasma (seta longa). A, C, F, barra de 20 µm; B, D, E, barra de 40 µm.

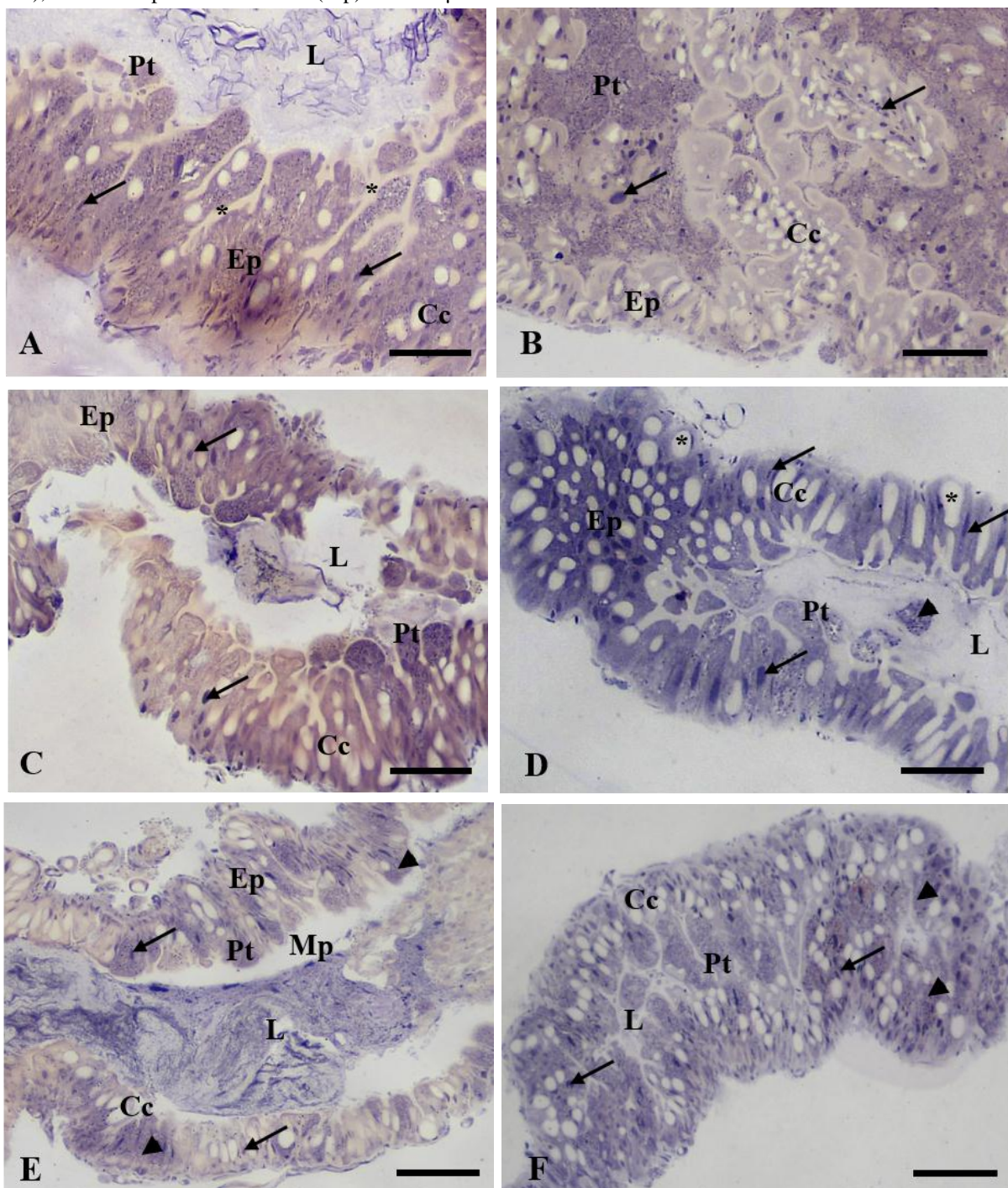


Jarial (2005) observou em *Cenocorixa bifida* (Hungerford, 1926) (Hemiptera: Corixidae) a ocorrência de exocitose de grânulos de secreção, assim como a presença de protrusões citoplasmáticas no processo de secreção enzimática e de degeneração celular. As protrusões citoplasmáticas estão principalmente relacionadas com processos de degeneração, servindo para eliminação de componentes celulares (DE PRIESTER, 1971). A avaliação do tratamento letal (CL₉₉) demonstrou evidente desorganização celular (Figuras 4A e 4B). Nasiruddin; Mordue (Luntz) (1993) constataram no intestino médio de *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae) após aplicação de azadiractina a ocorrência de dilatação dos feixes musculares a nível ultraestrutural, diferentemente do presente estudo, causando também desorganização celular.

Após 48 horas da alimentação com a formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata*, a membrana peritrófica permaneceu intacta. Essa integridade da membrana peritrófica também foi verificada no estudo do canal alimentar de *S. frugiperda* alimentadas com a formulação de nim (neemseto®) (CORREIA et al., 2009).

Foi observada intensa secreção apócrina e células apresentando núcleos desarranjados com tamanhos irregulares e células caliciformes em processo de estratificação (Figuras 4E e 4F). De acordo com Fiaz et al. (2018) alterações nas células do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) induzidas por squamocin, uma acetogenina, causaram danos a microvilosidades e vacuolização intensa do citoplasma com autofagia em células do intestino médio, causando desorganização celular. Estando de acordo com os resultados encontrados nessa pesquisa. O mesmo padrão de toxicidade dependente da concentração ocorre em larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) expostas a squamocin (COSTA et al., 2017).

Figura 4. Micrografias de luz do canal alimentar de *Plutella xylostella* submetida à alimentação com extrato microencapsulado de *Annona muricata* na concentração CL99. **A – B**) Epitélio intestinal após 12h de exposição ao extrato, com presença de células caliciformes (Cc), desorganização celular evidente (Ep), intensa secreção apócrina (Pt), núcleos (setas) de tamanhos irregulares, desarranjo da borda estriada (*); **C – D**) Secções do intestino médio após 24h de exposição ao extrato, apresentando irregularidade no tecido epitelial (Ep), presença de protusões citoplasmáticas (Pt) com grânulos densos (ponta de seta) liberadas para o lúmen (L), núcleo (setas), células caliciformes (Cc) com morfologia alterada (asterisco); **E – F**) Epitélio intestinal após 48h de exposição ao extrato, mostrando desorganização celular (Ep) células caliciforme em processo de estratificação (Cc), protusões citoplasmáticas (Pt) expelidas para o lúmen intestinal (L), presença de grânulos no citoplasma (ponta de seta), membrana peritrófica intacta (Mp). Barra 20µm.



CONCLUSÕES

Não houve alteração do canal alimentar de *P. xylostella* avaliados por MEV, em nenhuma concentração testada;

A formulação microencapsulada de *A. muricata* causa desorganização no epitélio do canal alimentar, ocasionando alterações no formato e integridade das células de lagartas de *P. xylostella*;

O aumento da dose e do tempo de exposição potencializa as alterações celulares do canal alimentar das lagartas de *P. xylostella* alimentadas com folhas de couve tratadas com a formulação microencapsulada de *A. muricata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, G. S. 2009. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae). In: PANIZZII, A.R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 23: 969-1022.
- BASTOS, J.S.Q. et al. Effect Toxic and Behavioral of *Annona mucosa* (Annonaceae) on the Tomato Leaf Miner. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 8, p. 362-371, 2018.
- BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M.J. (Ed, Billingsley, P.F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut**. Londres. p. 3-30, 1996.
- BLISS, C.I. The method of probits. **Science**, v. 79, p. 38-39, 1934.
- CARDOSO, A.; CONTE, H.; NANYA, S. **Estudo morfológico do mesêntero em larvas de *Dione juno juno* Cramer, 1779 (Lepidoptera: Nymphalidae) submetidas à tratamentos com nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae) em condições de laboratório**. Anais Eletrônico, VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica CESUMAR, 2011, 5p.
- CAVALCANTE, V. M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, v. 24, p. 19-39, 1999.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. 4.ed. Cambridge: Harvard University Press, p.770 1998.
- CORREIA, A. A. et al. Morfologia do Canal Alimentar de Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Alimentadas com Folhas Tratadas com Nim. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 83-91, 2009.
- COSTA, M. S. et al. Toxicity of squamocin on *Aedes aegypti* larvae, its predators and human cells. **Pest Management Science**, v.73, n.3, p. 636–640, 2017.

- DE PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Calliphora erythrocephala*. **Journal Ultrastructure Research**, v.36, p. 783-805, 1971.
- FIAZ, M. et al. Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 1-8, 2018.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa. MG: Universidade Federal de Viçosa, 421p. 2008.
- GOMES, I. B. et al. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. **Ciência Rural**, v. 46, p. 771-775, 2016.
- ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the *Annonaceae*: a unique example for developing biopesticides. In: SINGH, D. (Ed.). **Advances in plant biopesticides**, v. 15, Chap. 2, p. 21-33, 2014.
- JARIAL, M. S. Electron microscopic study of the anterior midgut in *Cenocorixa bifida* Hung. (Hemiptera: Corixidae) with reference to its secretory function. **Zoological Science**, v.22, p.783-790, 2005.
- LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the Insect Midgut**. Chapman and Hall, London, p. 486. 1997.
- LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.
- MACIEL, A. G. S. et al. Microencapsulation of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) seed extract and lethal toxicity to *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 251-259, 2019.
- MATSUMOTO, R. S. et al. Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.
- MEDHINI, N.; DIVAKAR, Y. G.; MANJULAKUMARI, D. Effect of *Calendula officinalis* extracts on the nutrient components of different tissues of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. **Journal of Biopesticides**, v. 5, p. 139-144, 2012.
- MIAO, Y. et al. Metabolomics study on the toxicity of *Annona squamosa* by ultraperformance liquid-chromatography high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and metabolic pathways analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 87-195, 2016.

- MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the nem tru *Azadirachta indica*: its action agoinst insect. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p. 615-632, 2000.
- PANDEY, S.; JOSHI, B. D.; TIXARI, L. D. Histopathological changes in the midgut of *Spodoptera litura* larvae on ingestion of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.42, p. 376-383, 2009.
- PINHEIRO, D. O. et al. Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p.453-459, 2008.
- PINHEIRO, D. O. et al. Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 453-459, 2003.
- POTTER, C. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized spray films. **Annals of Applied Biology**, v. 39, p. 1-29, 1952.
- REIS, N. R. et al. Updated list of the chiropterans of the city of Londrina, Paraná, Brazil. **Chiroptera Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 96-98, 1998.
- SAS® Satatical Analysis System, **SAS Institute Inc.**, 2003.
- SILVA, J. P. **microencapsulamento de extrato etanólico de *Annona muricata* L. (Annonaceae): desenvolvimento, caracterização e aplicação no controle de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2018. 127p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- SOUSA, M. E. C. et al. Ultrastructure of the *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Micron**, v. 40, p. 743-749, 2009.
- STEFANINI M., DE MARTINO C.; ZAMBONI L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** v. 216, n. 14, p. 173-174, 1967.
- TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 675-734, 1988.
- ZAFRA-POLO, M. C. et al. Acetogenins from Annonaceae, inhibitor of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, p. 253-271, 1996.

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA FORMULAÇÃO
MICROENCAPSULADA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Annona
muricata* L. (ANNONACEAE)
SOBRE ABELHAS**

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade crônica e aguda da formulação microencapsulada de extrato sementes de *Annona muricata* L. (Annonaceae) sobre polinizadores usando como organismo teste abelhas da espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Apidae) *in vitro*. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Alternativo de Pragas (LECAP) no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL). Todas as abelhas utilizadas nos experimentos foram oriundas de uma mesma colônia do apiário do Laboratório de Apicultura do CECA-UFAL. Em cada ensaio foi utilizado um total de 900 abelhas recém-emergidas. Foram realizados bioensaios para avaliação do potencial tóxico crônico e agudo com as dosagens 0,157g e 2,49g, baseada nas concentrações subletal e letal estimadas para a *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), incorporados na dieta alimentar das abelhas. No bioensaio crônico as abelhas receberam as doses do produto diariamente durante sete dias, sendo, a mortalidade avaliada a cada 24 horas e na verificação do potencial tóxico agudo as abelhas foram expostas às doses apenas no primeiro dia de alimentação, sendo a mortalidade diária acompanhada por sete dias. No bioensaio controle, as abelhas receberam apenas a dieta à base de mel diluído em água destilada (1:1, V/V), sendo avaliadas diariamente durante sete dias. A mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbott e a sobrevivência das abelhas foi analisada usando o método de Kaplan-Meier com aplicação do teste não paramétrico Log-Rank Test na comparação das curvas. Quando as abelhas foram expostas diariamente ao produto ocorreu uma mortalidade crescente ao longo do tempo, em que foi observada diferença significativa ($P < 0,001$) entre as curvas de sobrevivência, porém, não atingindo altos valores de mortalidade na dose recomendada para uso no campo. Na avaliação do potencial de toxicidade aguda ocorreu baixa mortalidade nos primeiros dias após a exposição, e não foi constatado diferença entre as curvas de sobrevivência. Assim, o produto apresenta baixo potencial tóxico crônico e agudo principalmente na dose letal recomendada para ser utilizada em campo para controle da *P. xylostella*.

Palavras-chave: Traça-das-crucíferas; preservação; polinizadores.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the chronic and acute toxicity of the microencapsulated formulation of seed extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) on pollinators using honey bee *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Apidae) in vitro. The work was developed at the Laboratory of Alternative Pest Control (LECAP) at the Agricultural Sciences Center of the Federal University of Alagoas (CECA-UFAL). All the bees used in the experiments came from the same colony of the Beekeeping Laboratory of the CECA-UFAL apiary. In each trial a total of 900 freshly emerged bees were used. Bioassays were used to evaluate the acute and chronic toxic potential at the dosages of 0.157 g and 2.49 g, based on the estimated sublethal and lethal concentrations for *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), incorporated in the diet of bees. In the chronic bioassay, the bees received the doses of the product daily for seven days, being the mortality evaluated every 24 hours and in the bioassay of the acute toxic potential, the bees were exposed only on the first day of feeding and the daily mortality was monitored by seven days. In the control bioassay, the bees receive only the diet based on honey diluted in distilled water (1:1, V/V) evaluated daily for seven days. Mortality was corrected by Abbott's formula and bees' survival was analyzed using the Kaplan-Meier method using the non-parametric Log-Rank Test in the comparison of curves. When the bees were exposed daily to the product, an increasing mortality occurred ($P < 0.001$) between the survival curves, but did not reach high mortality values at the recommended dose for use in the field. In the evaluation of the acute toxicity potential, there was a low mortality in the first days after exposure, and no difference was found between the survival curves. Thus, the product has low chronic and acute toxic potential, mainly in the lethal dose recommended to be used in the field to control *P. xylostella*.

Keywords: Diamondback moth; preservation; pollinators.

INTRODUÇÃO

Os estudos ecotoxicológicos são ferramentas de crucial importância para avaliar e fornecer dados dos possíveis efeitos toxicológicos associados ao agente químico em relação aos insetos polinizadores. Nos Estados Unidos da América, um terço das culturas agrícolas comerciais, além de espécies silvestres dependentes da polinização para a sua perpetuação, tem sido prejudicada pela redução de insetos polinizadores, fazendo com que muitos agricultores, conscientes dos benefícios gerados pela polinização, adotem o uso de abelhas *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae) nas floradas de suas plantações (PAOLETTI, 1999).

A polinização trata-se de um processo fundamental para a perpetuação das mais variadas espécies vegetais. Nesse sentido, a presença de polinizadores é imprescindível

para o sucesso da reprodução das plantas em qualquer ecossistema, incluindo os agrícolas (CHAMBÓ et al., 2010). As abelhas são polinizadoras universais e de comprovada importância ecológica e econômica, uma vez que polinizam vários hospedeiros de espécies silvestres e de culturas comerciais (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

Mundialmente existe um aumento no número de colmeias de abelhas *A. mellifera*, mas em contrapartida, têm-se constatado em algumas regiões a diminuição no número de polinizadores, tendo como razão diversos fatores, mas principalmente de agrotóxicos (FREITAS et al., 2009).

A mortalidade de abelhas devido ao uso inadequado e excessivo de agrotóxicos é uma realidade no Brasil e no mundo. Na literatura existem dados e relatos de desaparecimento de abelhas ao longo dos anos de 1880, 1920 e 1960 (PAREJA et al., 2011). Mortalidades sucessivas de colônias de *A. mellifera* têm sido registradas nos Estados Unidos – em média 30% de perdas de colônias, em avaliações consecutivas efetuadas entre 2006 e 2010 e em alguns países da Europa (LAURENT et al., 2015).

No Brasil, desde 2017 que as abelhas devem ser incluídas em avaliações de risco de agrotóxicos, conforme estabelecido na Instrução Normativa (IN) nº 02/2017, publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) publicada no Diário Oficial da União no último dia 10/02, na qual condiciona registros de agrotóxicos à apresentação de informações que permitam o uso adequado desses produtos, sem efeitos que comprometam a sobrevivência, a reprodução e o desenvolvimento das abelhas (IBAMA, 2019).

Nos estudos de seletividade, as abelhas são organismos de teste interessantes pelo conhecimento que se tem sobre sua biologia e, por apresentar um ciclo de vida relativamente curto. Além disso, é o mais utilizado por causa de sua extensa distribuição mundial e de sua grande importância como inseto polinizador. Todos os inseticidas usados na agricultura devem ser testados em abelhas para estimar a ecotoxicologia, utilizando diferentes metodologias, dependendo da finalidade do estudo (DEVILLERS, 2002).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade crônica e aguda da formulação microencapsulada de *Annona muricata* L. (Annonaceae) sobre polinizadores usando como organismo teste abelhas da espécie *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae) *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia: Controle Alternativo de Pragas (LECAP) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), em Rio Largo, AL.

Coleta dos enxames

As colônias de abelhas operárias de *A. mellifera* recém emergidas de foram capturadas de favo de crias, selecionados de colmeias provenientes do apiário do Laboratório de Apicultura localizado no Centro de Ciências Agrárias. As abelhas foram obtidas da mesma colônia no intuito de manter o mesmo padrão genético dos indivíduos utilizados nos experimentos.

Testes de toxicidade

Os bioensaios foram realizados com duas concentrações da formulação microencapsulada de *A. muricata*, 0,157g e 2,49g, baseada nas concentrações subletal e letal estimadas para a *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), respectivamente, mais a testemunha. Foram utilizadas abelhas operárias recém-emergidas de até 48 horas. Em laboratório, as abelhas foram coletadas com uma mangueira e mantidas em gaiolas de madeira (35 cm × 35 cm × 35 cm) sob condições ambientalmente controladas de BOD a 35 ± 2 ° C de temperatura e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa.

No ensaio de toxicidade crônica foi avaliada a toxicidade do produto sendo ofertado durante todos os dias do experimento, cujas abelhas ficavam duas horas sem alimentação antes de serem expostas a dieta a base de mel diluído em água destilada (1:1, V/V) mais a formulação microencapsulada nas duas concentrações, e para a testemunha era fornecido apenas a dieta a base de mel. Essa dieta era fornecida em alimentadores convencionais adaptados de alimentação de pássaros que eram disponibilizados diariamente com as dosagens da formulação microencapsulada por um período de duas horas que depois eram substituídos pela alimentação convencional a base de mel. A mortalidade foi avaliada a cada 24 horas com a retirada das abelhas que estavam mortas da caixa e a avaliação foi por um período de sete dias.

O ensaio de toxicidade aguda seguiu a mesma metodologia do bioensaio de toxicidade crônica, porém as abelhas receberam uma única dosagem da formulação microencapsulada de *A. muricata* no primeiro dia por um período de duas horas e nos dias posteriores receberam alimentação convencional a base de mel. Como também, nesse experimento as avaliações só foram realizadas por cinco dias.

O período de duas horas de exposição se justifica pelo comportamento do tempo que as abelhas permanecem em campo forrageando, como também, ofertar a alimentação convencional posterior ao tratamento pelo restante do dia se justifica pela sua biologia, visto que, se não fosse ofertado os indivíduos poderiam morrer por falta de alimentação.

Além da avaliação da mortalidade também se observou o comportamento anômalo das abelhas. Todos os efeitos causados foram observados e registrados sendo considerados com a finalidade de informações sobre possível efeito subletal (BETIOLI; CHAUD-NETTO, 2001).

A metodologia escolhida está de acordo com as indicações do Regulamento CE n 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de outubro de 2009, que padroniza as pesquisas com *A. mellifera*.

A pesquisa foi conduzida em delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos (duas concentrações) mais o tratamento controle (sem adição do produto). Foram seis repetições cada uma com 50 abelhas recém-emergidas totalizando 300 abelhas por cada tratamento (BETIOLI; CHAUD-NETTO, 2001).

A análise de sobrevivência das abelhas foi realizada usando o método de Kaplan-Meier com a obtenção de Curvas de Sobrevivência através do software GraphPad Prism[®] 7 com aplicação do teste não paramétrico Log-Rank Test na comparação das curvas (MOTULSKY, 1995).

A porcentagem de mortalidade foi calculada para as duas concentrações nos dois métodos de exposição e corrigida por meio da equação de Abbott (ABBOTT, 1925). Em que possibilita a classificação do produto na seguinte escala, de acordo com o efeito (% de mortalidade): S (seletivo = 0 a 20 %), B (baixa toxicidade = 21 a 40 %), M (média toxicidade = 41 a 60 %) e A (alta toxicidade = 61 a 100%).

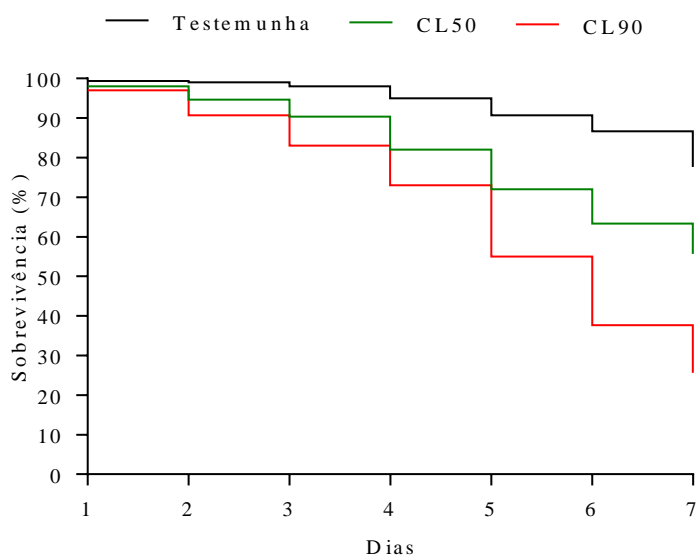
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de sobrevivência para abelhas *A. mellifera* submetidas à toxicidade crônica da formulação microencapsulada de *A. muricata* mostrou diferença para a concentração subletal ($\chi^2 = 37,59$; GL = 1; $p < 0,001$) e concentração letal ($\chi^2 = 180,5$; GL = 1; $p < 0,001$).

No comportamento das curvas de sobrevivência verifica-se que ocorreu ao longo do tempo, redução no número de abelhas vivas em todos os tratamentos, porém com a

exposição e consumo diário do alimento adicionado à CL₉₀ da formulação microencapsulada de *A. muricata*, a redução foi mais rápida, tendo em vista que aos sete dias sobreviveram apenas 25,66% dos indivíduos (Figura 1), com uma queda bastante acentuada no quinto dia mostrando uma taxa de sobrevivência de 55,00%.

Figura 1. Curvas de sobrevivência de abelhas operárias (*Apis mellifera*) alimentadas diariamente com as concentrações subletal e letal da formulação microencapsulada de *Annona muricata*



Na concentração subletal da formulação microencapsulada de *A. muricata* as abelhas conseguiram uma taxa de sobrevivência 75,00 e 60,00%, no quinto e sétimo dia, respectivamente, consumindo diariamente o alimento contendo o extrato, mostrando que houve uma mortalidade de indivíduos, mas de forma não tão acentuada como na concentração letal.

Essa exposição até o 7º dia foi escolhida para avaliar por mais tempo a capacidade que a formulação microencapsulada de *A. muricata* teria, pois a tendência é que o princípio ativo seja liberado aos poucos e gradativamente, uma característica do processo de encapsulamento. Normalmente os experimentos de efeito crônico são realizados até o 3º dia. Métodos oficiais de condução desses testes são descritos por protocolos da OECD (1998), cujo experimento se avaliado nesse período teria uma taxa de sobrevivência de 85 e 95% para as CL₉₀ e CL₅₀, respectivamente.

Em relação à avaliação da mortalidade corrigida e classificação do produto pelo modelo de exposição (crônico) (Tabela 1) observou-se que com o aumento da mortalidade, possivelmente relacionada a grande exposição das abelhas diariamente ao

produto, o produto foi classificado como seletivo até o 5º dia na CL₅₀ (0,157g) e até o 3º dia na CL₉₀ (2,49g).

Os sintomas de toxicidade foram observados através de ocorrência de diarreia observada no primeiro dia após a ingestão, característica de toxicidade, e perda de postura locomotora ("knockdown"= choque), principalmente nos últimos dias após a exposição acumulada da formulação microencapsulada de *A. muricata*.

Tabela 1. Classificação da formulação microencapsulada de *Annona muricata* através da toxicidade crônica e aguda pela mortalidade ao longo do tempo de abelhas operárias (*Apis mellifera*) Corrigida por Abbott (Porcentagem de Mortalidade ± Desvio Padrão)

Dias	Mortalidade (%)		Mortalidade (%)	
	CL ₅₀	Toxicidade crônica*	CL ₉₀	Toxicidade crônica*
1	1,33 ± 1,4	Seletivo	2,34 ± 0,7	Seletivo
2	4,34 ± 3,5	Seletivo	8,07 ± 2,3	Seletivo
3	7,74 ± 5,1	Seletivo	14,94 ± 4,5	Seletivo
4	13,69 ± 3,7	Seletivo	22,69 ± 8,4	Baixa toxicidade
5	19,89 ± 3,5	Seletivo	38,84 ± 6,9	Baixa toxicidade
6	26,18 ± 3,0	Baixa toxicidade	55,98 ± 14,1	Média toxicidade
7	24,94 ± 8,6	Baixa toxicidade	66,31 ± 17,5	Alta toxicidade
Dias	CL ₅₀	Toxicidade aguda	CL ₉₀	Toxicidade aguda
1	4,03 ± 2,61	Seletivo	5,69±2,11	Seletivo
2	6,04 ± 3,06	Seletivo	9,07±2,74	Seletivo
3	7,45 ± 3,15	Seletivo	10,18±3,24	Seletivo
4	5,25 ± 1,97	Seletivo	8,76±4,05	Seletivo
5	1,05 ± 2,08	Seletivo	4,68±5,13	Seletivo

*Classificação do produto na seguinte escala, de acordo com o efeito (% de mortalidade): S (seletivo = 0 a 20 %), B (baixa toxicidade = 21 a 40 %), M (média toxicidade = 41 a 60 %) e A (alta toxicidade = 61 a 100%) (ABBOT, 1925).

A análise de sobrevivência para abelhas *A. mellifera* submetidas a toxicidade aguda da formulação microencapsulada de *A. muricata* não mostrou diferença para a concentração subletal ($\chi^2 = 0,3174$; GL = 1; p = 0,5732) e concentração letal ($\chi^2 = 3,401$; GL = 1; p = 0,0651).

Em relação à avaliação da mortalidade corrigida e classificação do produto pelo modelo de exposição (agudo) (Tabela 1), apresentou percentuais que classifica a formulação microencapsulada de *A. muricata* como seletiva, tendo em vista a baixa mortalidade registrada das abelhas (Tabela 1).

Nesse experimento de toxicidade aguda foi possível observar que as abelhas apresentaram comportamentos de desintoxicação mostrando sintomas de recuperação como armazenamento de mel, insetos ativos e ávidos por comida. Já se sabe que as abelhas ao sofrerem ingestão ou contato de agentes químicos pode sofrer alterações nos processos celulares, ativando os mecanismos de detoxificação celular e, em última instância, levar à morte da célula, e que esse processo de desintoxicação é realizado por processos enzimáticos principalmente por glutathione S-transferase, uma enzima de detoxificação que apresenta maior expressão em abelhas forrageiras, justamente os indivíduos que realizam tarefas fora da colônia e, portanto, têm maior contato com substâncias químicas presentes no meio (NOCELLI et al., 2012).

A preocupação com o impacto dos agrotóxicos sobre os polinizadores já é bastante discutido na literatura nos últimos anos (OSBORNE, 2012). Essa temática tem gerado consideráveis dados sobre os efeitos tóxicos dos agrotóxicos nas abelhas a partir de estudos de laboratório e semi campo (BAPTISTA et al., 2009; ROCHA; ALENCAR, 2012; SANCHEZ-BAIO; GOKA, 2014; LEITE et al., 2018).

Existem relatos também de que abelhas sem ferrão (*Meliponini*) são mais suscetíveis a agrotóxicos (TOMÉ et al., 2012; DEL SARTO et al., 2014; MORAIS et al., 2018) e para produtos à base de azadiractina (BERNARDES et al., 2017), ponto bastante preocupante também, pois as abelhas são substitutas questionáveis para as abelhas sem ferrão nas análises de impactos de agrotóxicos (ARENA; SGOLASTRA, 2014; BARBOSA; SMAGGHE; GUEDES, 2015).

Para inseticidas botânicos ou formulações naturais os estudos da toxicidade sobre polinizadores ainda são escassos (GONTIJO et al., 2015), principalmente porque atribuem de que não são maléficis a fauna benéfica. Porém, já existem relatos de extratos vegetais com ação tóxica sobre abelhas, como o de Alves (2010), o qual verificou que colônias criadas em áreas com nim, *A. indica*, apresentaram 100% de mortalidade de larvas quando alimentadas apenas com seu pólen. Extratos aquosos de gengibre e mastruz a 60% p/v foram tóxicos para *A. mellifera* em experimentos de ação por contato e ingestão, quando comparados com extratos de folhas a 10% e sementes de nim a 7,9% e com as formulações de nim Azamax® a 0,5% e Organic Neem® a 0,75% (SILVA et al., 2012). Xavier et al. (2015) avaliaram a toxicidade aguda e os efeitos comportamentais subletais de inseticidas botânicos como o óleo de andiroba, óleo de citronela, óleo de eucalipto, extrato de alho, óleo de nim e rotenona em abelhas, *A. mellifera* e constataram que apenas o óleo de andiroba não demonstrou letalidade para

adultos, no entanto, o óleo de andiroba, o extrato de alho e o óleo de nim demonstraram uma toxicidade aguda para as larvas de abelhas.

Estudos também mostram que os inseticidas botânicos ou formulações naturais à base de plantas podem ser seletivos para abelhas, como na pesquisa com inseticidas utilizados em cultivos orgânicos (Rotenat CE®, Pironat®, Biopirol 7M®, Organic neem®, Natuneem® e enxofre de cal) avaliando-se por contato e ingestão a ação tóxica contra *A. mellifera*, mostrando resultados levemente tóxicos para enxofre de cal por ingestão e Rotenat CE® por ação tópica e seletivos para as demais formulações testadas (EFROM et al., 2012).

Os resultados de trabalhos citados acima demonstram o potencial de toxicidade e efeitos subletais de inseticidas botânicos em abelhas e, assim, fornece evidências da importância de avaliar os riscos dos efeitos colaterais dos biopesticidas. No presente trabalho com a formulação microencapsulada de *A. muricata* ainda é necessário realizar mais estudos dos efeitos subletais e em fases diferentes da abelha *A. mellifera*, pois se testou apenas com insetos adultos.

CONCLUSÃO

A formulação microencapsulada do extrato de *A. muricata* não apresenta potencial tóxico agudo e tem baixo potencial tóxico crônico para *Apis mellifera* até o quinto dia de avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p. 265-266, 1925.

ALVES, F. E. **Toxicidade do nim (*Azadirachta indica* A. Juss: Meliaceae) para *Apis mellifera* e sua importância apícola na caatinga e mata litorânea cearense**. Tese de doutorado. Fortaleza, Programa de Pós-graduação em zootecnia, doutorado integrado UFC-UFPB-UFRPE. Universidade Federal do Ceará, 2010. 129p.

ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 324–334, 2014.

BAPTISTA, A.P.M. et al. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 955-961, 2009.

- BARBOSA, W.F., SMAGGHE, G., GUEDES, R.N.C. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. **Pest Management Science**, v. 71, p.1049–1053, 2015.
- BERNARDES, R.C. et al. Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. **Apidologie**, v. 48, n. 3, p. 275-285, 2017.
- BETIOLI, J. V.; CHAUD-NETTO, J. Group effect on longevity of Africanized honeybee workers (*Apis mellifera* L.) maintained without queen in laboratory conditions. **Naturalia**, v.26, p.265-275, 2001.
- CHAMBÓ, E.D.; et al. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.5, n. 1, p.37-42, 2010.
- DEL SARTO, M. C. L. et al. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 45, n. 1, p. 626-636, 2014.
- DEVILLERS J. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M.H. **Honey Bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, p. 1-10, 2002.
- EFROM, C.F.S. et al. Side-Effects of Pesticides Used in the Organic System of Production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 47-53, 2012.
- FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, p. 332-346, 2009.
- GONTIJO, L. M., D. et al. Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Florida Entomologist**, v. 98, p. 59-64, 2015.
- IBAMA. Instrução Normativa (IN) n° 02/2017. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1012. Acesso em: 10 maio de 2019.
- LAURENT, M. et al. Pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014. 2015. **Available** at:. Accessed on: 28 Aug. 2015.
- LEITE, D.T. et al. Toxicity of Fenpyroximate, Difenoconazole and Mineral Oil on *Apis mellifera* L. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 737-743, 2018.

- MORAIS, C.R. et al. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). **Chemosphere**, v. 206, p. 632-642, 2018.
- MOTULSKY, M. D. H. **Intuitive Biostatistics**, New York: Oxford University Press, 1995. 386p.
- Nasiruddin, M. & A.J. Mordue (Luntz). 1993. The effect azadirachtin on the midgut histology of the locusts, *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Tissue Cell** 25: 875-884.
- NOCELLI, R.C.F. et al. **Riscos de pesticidas sobre as abelhas**. In: Semana dos polinizadores, 3., 2012, Petrolina. Palestras e resumos... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012. (Embrapa Semiárido. Documentos, 249).
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, Acute Oral and Contact Toxicity test, n.214, 1998.
- OSBORNE, J. L. Ecology: Bumblebees and pesticides. **Nature**, v. 491, p. 43–45, 2012.
- PAOLETTI, M. G. **Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes: practical use of invertebrates to assess sustainable land use**. New York: Elsevier, p. 460 1999.
- PAREJA, L. et al. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.
- PHAM-DELÈQUE, M. et al. Behavioral methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, v. 33, p. 425-432, 2002.
- Ribeiro O, et al. (2013) Random and direct mutagenesis to enhance protein secretion in *Ashbya gossypii*. **Bioengineered** 4(5):322-31.
- ROCHA, M.C.L.; ALENCAR, S. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: Ibama, 2012. 88 p.
- SANCHEZ-BAIO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees – A risk assessments. **Ploss One**, v. 9, n. 4, e94482, 2014.
- SILVA, M.P.L. et al. Efeito de extratos de plantas medicinais sobre *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae). **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, S1576-S1581, 2012.
- TOMÉ H. V. V., G. F. et al. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Plos One**, v. 7, e38406, 2012.

XAVIER, V.M. et al. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Botanical Insecticides to Honey Bees. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2015.