

## EXTRATO DE SEMENTES DE FRUTA-DO-CONDE: EFEITOS INSETICIDA E TOXICOLÓGICOS ASSOCIADOS

**FABIELE SCHAEFER RODRIGUES<sup>1</sup>, JÉSSICA SANTI BOFF<sup>2</sup>, ALEXANDRE CASTRO REIS<sup>3</sup>, VANIA LUCIA LORO<sup>4</sup>, MARCUS VINÍCIUS TRES<sup>5</sup>, GIOVANI LEONE ZABOT<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Eng. Agrícola, Doutoranda em Engenharia Agrícola, UFSM, fabielesrodrigues@hotmail.com

<sup>2</sup> Eng. Agrônoma, Me. em Agronomia, UFSM, jessica\_santiboff@hotmail.com

<sup>3</sup> Eng. Agrônomo, Mestrando em Agronomia, UFSM, alexandreocr98@gmail.com

<sup>4</sup> Bióloga, Profª. Doutora, UFSM, vania.loro@ufsm.br

<sup>5</sup> Eng. de Alimentos, Prof. Doutor, UFSM-CS, marcus.tres@ufsm.br

<sup>6</sup> Eng. de Alimentos, Prof. Doutor, UFSM-CS, giovani.zabot@ufsm.br

Apresentado no  
LI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2022  
27 a 29 de outubro de 2022 - Pelotas - RS, Brasil

**RESUMO:** A fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) é uma planta promissora para uso inseticida. Portanto, neste trabalho, o objetivo foi a obtenção de um extrato vegetal de semente de fruta-do-conde obtido por meio de extração assistida por ultrassom e a avaliação do seu efeito inseticida sobre a lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), analisando efeitos toxicológicos em organismo aquático não-alvo. Bioensaios de ingestão foram realizados para verificar a ação inseticida do extrato sobre a lagarta falsa-medideira. A avaliação de efeitos toxicológicos em organismo não-alvo foi realizada utilizando-se o peixe-zebra (*Danio rerio*). Os resultados indicam a ação inseticida do extrato de sementes de fruta-do-conde contra a lagarta falsa-medideira. Através de biomarcadores de exposição a contaminantes evidenciou-se a baixa ocorrência de efeitos toxicológicos e danos oxidativos aos peixes.

**PALAVRAS-CHAVE:** extrato vegetal, *Annona squamosa*, lagarta falsa-medideira.

## CUSTARD APPLE SEEDS EXTRACT: ASSOCIATED INSECTICIDAL AND TOXICOLOGICAL EFFECTS

**ABSTRACT:** The custard apple (*Annona squamosa* L.) is a promising plant which contains bioactive compounds for acting as an insecticide. Therefore, in this work, the objective was to obtain a plant extract from custard apple seeds by ultrasound-assisted extraction and to evaluate its insecticidal effect on the false-medideira caterpillar (*Chrysodeixis includens*), analyzing toxicological effects in non-target aquatic organism. Ingestion bioassays were carried out to verify the insecticidal action of the extract on this caterpillar. The evaluation of toxicological effects in a non-target organism was carried out using the zebrafish (*Danio rerio*). The results indicate the insecticidal action of the seed extract against the false-medideira caterpillar. Based on the biomarkers of exposure to contaminants, low toxicological effects and oxidative damage to fish was evidenced.

**KEYWORDS:** plant extract, *Annona squamosa* L., false-medideira caterpillar.

**INTRODUÇÃO:** O grande avanço da agricultura pelo mundo trouxe muitas mudanças consigo. Algumas destas mudanças foram benéficas, como o melhoramento de plantas e a obtenção de uma elevada produtividade agrícola. Porém, a utilização de agrotóxicos na produção de alimentos vem gerando uma grande preocupação ambiental devido ao seu alto poder contaminante. O uso excessivo de agrotóxicos vem interferindo negativamente na saúde humana, no meio ambiente e em todo ciclo natural dos ecossistemas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). O prejuízo ambiental decorrente de tal situação se estende por todos os segmentos, através da poluição do ar, da contaminação dos recursos hídricos e dos mananciais, da degradação das florestas, da destruição da fauna e da flora, da enorme perda da biodiversidade e do desalinhamento do ciclo natural do ecossistema (TUDI et al., 2021). Assim, a necessidade de métodos de controle alternativos ao combate de pragas agrícolas se torna uma questão imprescindível para a conciliação da eficiência agrícola com o desenvolvimento sustentável, sendo uma ação essencial para garantir a qualidade da vida humana, a segurança alimentar e o direito a um meio ambiente ecologicamente equilibrado. Neste segmento, relatos promissores sobre a utilização de extratos botânicos vem sendo cada vez mais difundidos na busca de métodos de controle com menor agressividade ambiental e eficientes na substituição de produtos químicos (JABRAN et al., 2015). Os defensivos naturais, como os extratos botânicos, apresentam também uma enorme vantagem em comparação aos produtos sintéticos, devido ao fato de suas moléculas apresentarem uma estrutura química bastante complexa, dificultando os insetos-alvo a demonstrar resistência sobre estas moléculas (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016). Buscando promissoras plantas com atividade fitoinseticida, a *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde) se apresenta como uma alternativa propícia no controle de pragas, devido aos seus frutos e, principalmente, as sementes apresentarem grandes quantidades de acetogeninas anonáceas, o que pode conceder aos extratos propriedades antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, moluscidas, inseticidas e acaricida (CHAMPY, 2011). Devido a isto, formulações que utilizam o extrato da fruta-do-conde podem se tornar um método alternativo de controle de pragas, principalmente as que atacam culturas de grande interesse comercial, como é o caso da lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) na cultura da soja. Neste contexto o principal objetivo deste trabalho é avaliar o efeito inseticida do extrato de sementes de fruta-do-conde sobre a lagarta falsa-medideira e averiguar os possíveis efeitos toxicológicos em organismos não-alvo como o peixe-zebra (*Danio rerio*).

**MATERIAL E MÉTODOS:** Utilizou-se como matéria-prima sementes da fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.). As frutas foram coletadas na cidade de Vale Real/RS (29° 23' 52" S, 51° 15' 14" O), oriundas da safra de 2020. Para a obtenção do extrato de sementes da fruta-do-conde utilizou-se a tecnologia de extração assistida por ultrassom. O procedimento foi realizado no Laboratório de Bioprocessos, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), na cidade de Santa Maria/RS. Primeiramente as sementes da fruta-do-conde foram moídas em um aparelho liquidificador e, então, adicionou-se água destilada como solvente da extração. A proporção utilizada de sementes e água destilada foi de 1:4, tendo sido adicionadas 20 g de sementes ao frasco de extração. A extração ocorreu sob refrigeração constante de 5°C durante 1 h com densidade de potência acústica de 85 W/cm<sup>2</sup>, amplitude de potência de 100% (400 W), frequência de trabalho de 24 kHz e ciclo de pulso de 0,5. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 10°C. As frações foram separadas e o sobrenadante foi filtrado em um funil Buchner. O extrato obtido foi liofilizado e macerado para a obtenção do extrato seco em pó. Para verificar a ação inseticida do extrato das sementes da fruta-do-conde sobre a lagarta-falsa-medideira, foram realizados bioensaios de ingestão. As lagartas utilizadas para os bioensaios foram oriundas de uma população suscetível criada no Laboratório de Entomologia, no Departamento de Defesa

Fitossanitária da UFSM. Utilizaram-se, para a realização dos experimentos, lagartas no terceiro instar de crescimento, sendo mantidas em dieta artificial proposta por Greene et al. (1976) até a realização dos bioensaios. Para a quantificação das doses foi considerado um volume de calda de aplicação de 100 L/ha. Os insetos foram expostos ao extrato sob diferentes doses (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 5,0 g/L), equivalendo-se aos tratamentos de BE25; BE50; BE100; BE150; BE200; BE250 e BE500. Como controle positivo utilizou-se o inseticida comercial Dipel® WG na dose de 5 g/L (BD500), classificado como inseticida microbiológico de ingestão. Para o controle negativo (testemunha), os insetos não receberam nenhum tratamento ao longo da avaliação, apenas foram mantidos na dieta artificial. Para a realização dos bioensaios de ingestão, 290 µL de cada tratamento foram aplicados sobre a superfície da dieta e deixado secar. Os insetos foram colocados em dieta específica em potes transparentes com tampa e mantidos em uma sala a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  de umidade relativa e um fotoperíodo de 14:10 h (claro:escuro). Todos os tratamentos foram realizados com dez repetições, sendo que cada repetição continha dez lagartas, e a mortalidade foi avaliada a cada 24 h durante 5 dias (120 h) após a exposição aos tratamentos. As lagartas que não apresentaram nenhum movimento ao toque foram consideradas mortas. Além disso, visando avaliar os efeitos toxicológicos dos tratamentos em organismos não-alvo foi realizado um experimento de toxicologia aquática com peixes-zebra (*Danio rerio*). O experimento foi realizado no Laboratório de Toxicologia Aquática (LABTAQ), no Departamento de Química da UFSM. Para isso, seis peixes-zebra foram colocados em aquários sob aeração constante por 5 dias, cada um contendo 4 L de solução, sob diferentes concentrações do extrato de sementes da fruta-do-conde (0,84; 1,68; 2,52; 3,36; 16,8 µg/L), equivalendo-se aos tratamentos E25, E50, E75, E100 e E500, do bioinseticida Dipel® (16,8 µg/L) tratamento D500, e do tratamento de controle negativo (CTL), o qual não recebeu nenhum produto. Cada concentração adotada na realização do experimento foi realizada em triplicata. A averiguação do experimento foi realizada a cada 12 h durante 5 dias para avaliar a possível ocorrência de efeito letal nos peixes. Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados utilizando banho de gelo e depois eutanasiados por secção da medula espinhal. O tecido cerebral e muscular foi removido, homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5. Os homogenizados foram centrifugados a  $3000 \times g$  durante 10 minutos e congelados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise. Foram realizadas as seguintes análises bioquímicas em triplicata: acetilcolinesterase (AChE) (ELLMAN et al., 1961), glutathione-S-transferase (GST) (HABIG et al, 1974), peroxidação lipídica (PLO) (DRAPER e HADLEY, 1990) e a proteína carbonil (PC) (PARVEZ e RAISSUDIN, 2005). Os dados obtidos (após 120 h) foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, expressa em média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados de ambos experimentos foram analisados através do Teste Tukey, sendo que os resultados significativos foram considerados com  $p \leq 0,05$ .

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O efeito inseticida dos tratamentos foi demonstrado através dos resultados dos bioensaios de ingestão, onde a ocorrência do efeito letal dos produtos nas lagartas foi aumentando gradativamente ao longo do período de exposição. Na Figura 1, observa-se a mortalidade dos insetos nos diferentes tratamentos após 120 h. Das sete doses de extrato testadas, cinco destas (BE100, BE150, BE200, BE250 e BE500) não apresentaram diferença quando comparado ao tratamento BD500 (Dipel®). Assim, pode-se constatar que, para o controle da lagarta falsa-medideira, doses de extrato de sementes de fruta-do-conde a 1 g/L são tão eficientes quanto às doses superiores testadas para o tratamento extrato e também do tratamento BD500. Desta forma, o extrato de sementes de fruta-do-conde, realizado nas condições deste estudo, se mostrou eficiente no controle da lagarta falsa-medideira.

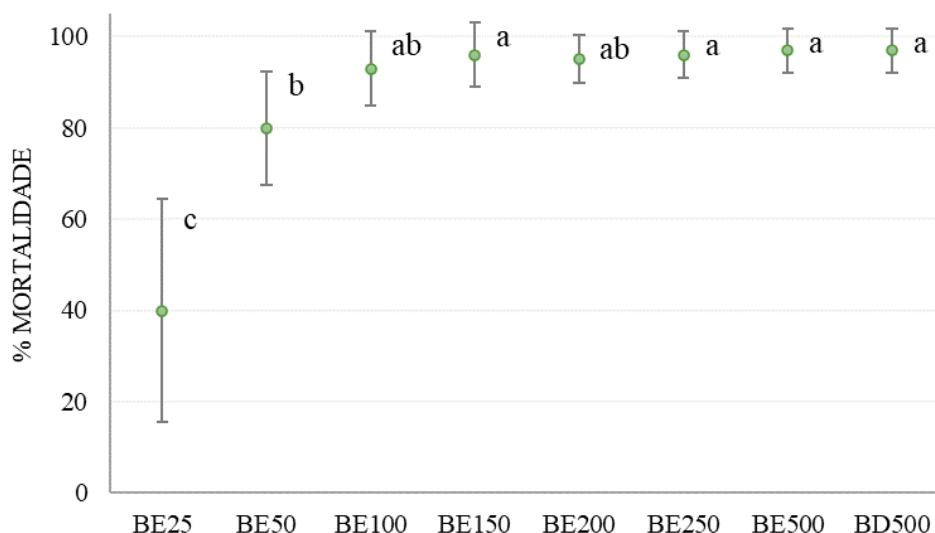


FIGURA 1. Mortalidade das lagartas frente aos tratamentos do extrato de sementes da fruta-do-conde (BE25, BE50, BE100, BE150, BE200, BE250, BE500) e do inseticida Dipel® (BD500), após 120h de exposição.

Para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos do extrato de sementes de fruta-do-conde e do inseticida biológico Dipel®, foram realizados quatro tipos de análises bioquímicas dos tecidos biológicos dos peixes, sendo elas: atividade da acetilcolinesterase (AChE), atividade de glutatona S-transferase (GST), peroxidação lipídica (PLO) e proteína carbonil (PC). Na Figura 2, é possível observar os resultados das análises de peroxidação lipídica e proteína carbonil.

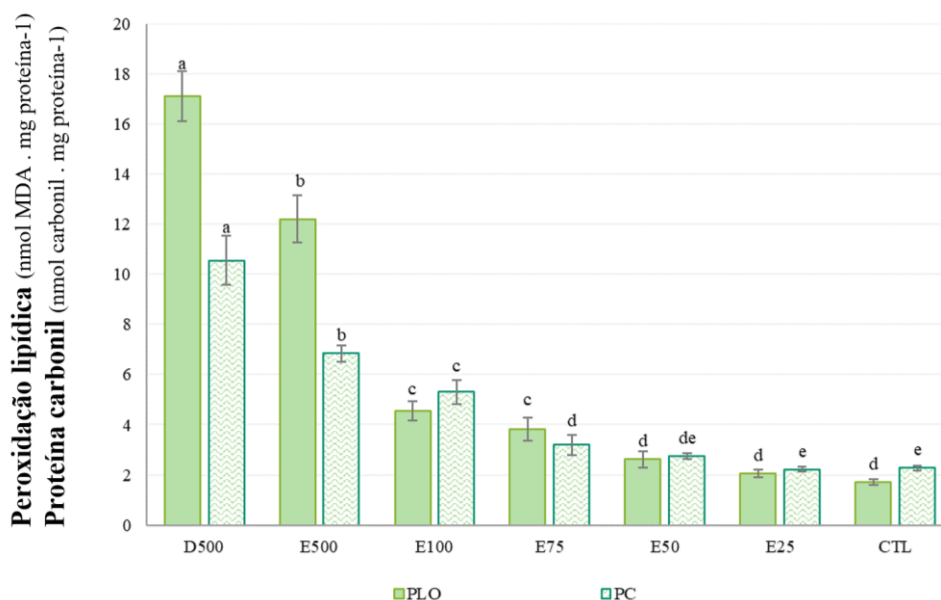


FIGURA 2. Resultado das análises bioquímicas de peroxidação lipídica (PLO) e proteína carbonil (PC), nos tratamentos D500, E500, E100, E75, E50, E25 e CTL.

Os níveis de peroxidação lipídica foram estimados pela produção de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Conforme os dados de PLO, os tratamentos E25 e E50 não diferiram significativamente do tratamento CTL. Deste modo, não apresentaram danos oxidativos durante a exposição. O tratamento E500 apresentou média superior de TBARS em relação aos outros

tratamentos de extrato, mas com média significativamente inferior ao tratamento D500. Os níveis elevados na produção da PC nos tratamentos D500, E500, E100 e E75 coincidem com a alteração nos níveis de TBARS nestes tratamentos. Níveis elevados de produção de proteína carbonil podem ocorrer como consequência do estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005). A produção da PC do tratamento E25 e E50 não diferiram significativamente do tratamento CTL. Os tratamentos E75, E100, E500 e D500 apresentaram diferença significativa com o tratamento CTL e também entre si. Na Figura 3, os resultados da atividade das enzimas acetilcolinesterase e glutatona S-transferase são apresentados.

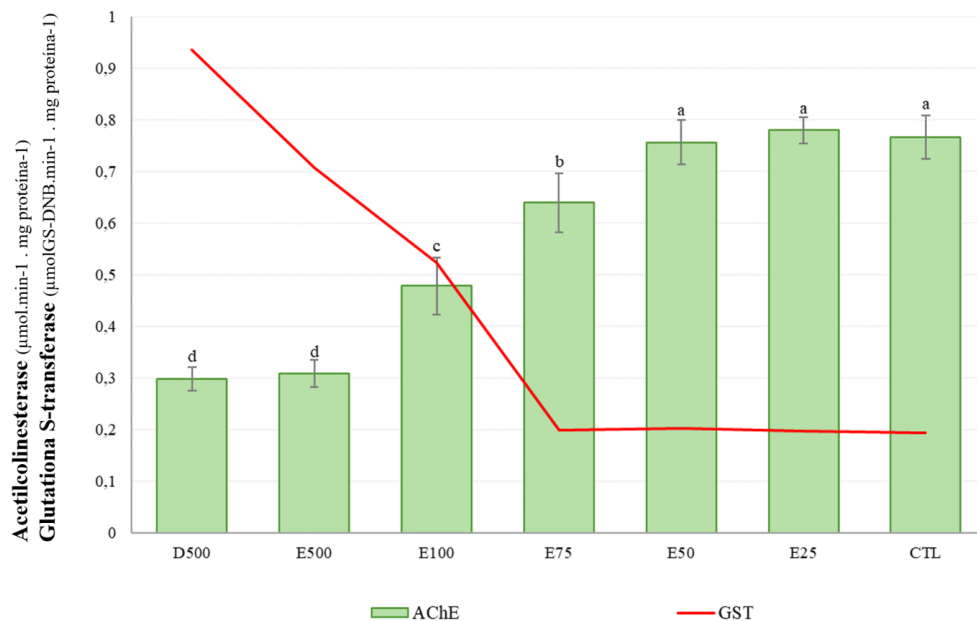


FIGURA 3. Resultados das análises bioquímicas da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e da enzima glutatona S-transferase (GST), nos tratamentos D500, E500, E100, E75, E50, E25 e CTL.

Alterações na atividade da enzima glutatona S-transferase ocorrem quando um organismo é exposto a algum contaminante. O aumento dos valores de GST indicam que a enzima passou por transformações para excretar xenobióticos, o que aponta a ocorrência de efeito toxicológico dos peixes no referido tratamento. A atividade da GST difere dos valores do tratamento controle, e aumenta a partir do tratamento E100. Os tratamentos E25, E50 e E75 não diferiram significativamente do tratamento CTL. Diferentemente da enzima GST, onde a alteração ocorre quando seus níveis aumentam na presença de um determinado contaminante, na enzima AChE a alteração se dá pela diminuição dos valores da enzima, apresentando níveis menores. Os resultados obtidos através da análise da enzima AChE demonstraram diferença significativa nos tratamentos E75, E100, E500 e D500. Os menores valores de média observados para a AChE foram a dos tratamentos D500 e E500, representando uma diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Este dado reflete que estes tratamentos ocasionaram maiores danos aos peixes em comparação aos demais tratamentos. Os resultados obtidos através dos biomarcadores de exposição à contaminantes (PLO, PC, GST e AChE) mostram a baixa ocorrência de danos oxidativos nos peixes-zebra devido a sua exposição aos compostos, com leve aumento a partir do tratamento E75. Pode-se concluir que os tratamentos E25 e E50 se apresentaram seguros considerando os testes realizados em peixe-zebra, pois não diferiram significativamente do tratamento CTL.

**CONCLUSÕES:** O extrato de sementes de fruta-do-conde apresenta atividade inseticida contra a lagarta falsa-medideira, podendo ser considerado um promissor método de controle alternativo para o combate deste inseto-praga. Em comparação com o bioinseticida Dipel®, o extrato de sementes de fruta-do-conde, além de apresentar efeito inseticida na lagarta falsa-medideira, também exibe menores efeitos toxicológicos para organismos não-alvo como o peixe-zebra.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS (21/2551-0000683-8) pelas bolsas e auxílios financeiros para a execução da pesquisa.

## **REFERÊNCIAS:**

ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout *Zoarces viviparus*, measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171-180, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

MORAIS, L. A. S. de; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com Atividade Inseticida. In: HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. de L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (ed.). **Defensivos Agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. ISBN 978-85-7035-642-0.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 112–117, 2005.

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