



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Annona glabra* L. (MAGNOLIALES:
ANNONACEAE) SOBRE A FASE LARVAL DE *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

LUIZ EDUARDO D'ELIA OLIVEIRA

Macapá/AP

2021

LUIZ EDUARDO D'ELIA OLIVEIRA

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Annona glabra* L. (MAGNOLIALES:
ANNONACEAE) SOBRE A FASE LARVAL DE *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Manuel Dutok-Sánchez

Macapá/AP

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

O48b Oliveira, Luiz Eduardo D'Elia.
Bioatividade dos extratos de *Annona glabra* L. (Magnoliales: Annonaceae) sobre a fase larval de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Luiz Eduardo D'Elia Oliveira. - 2021.

1 recurso eletrônico. 70 folhas : ilustradas.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2021.

Orientador: Professor Doutor Fernando Antônio de Medeiros
Coorientador: Professor Doutor Carlos Manuel Dutok-Sánchez

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document (PDF)

Inclui referências e anexos.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Annona glabra* – Atividade larvicida. 3. Inseticida. 4. Controle biológico. I. Medeiros, Fernando Antônio de, orientador. II. Dutok-Sánchez, Carlos Manuel, coorientador. III. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed. 615.32

OLIVEIRA, Luiz Eduardo D'Elia. **Bioatividade dos extratos de *Annona glabra* L. (Magnoliales: Annonaceae) sobre a fase larval de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Orientador: Fernando Antônio de Medeiros. Coorientador: Carlos Manuel Dutok-Sánchez. 2021. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2021.

LUIZ EDUARDO D'ELIA OLIVEIRA

**BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Annona glabra* L. (MAGNOLIALES:
ANNONACEAE) SOBRE A FASE LARVAL DE *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos.

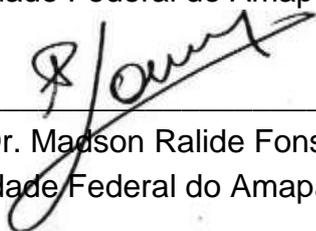
Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Manuel Dutok-Sánchez

DATA DE APROVAÇÃO: 15/12/2021



Examinador: Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins
Universidade Federal do Amapá



Examinador: Prof. Dr. Madison Ralide Fonseca Gomes
Universidade Federal do Amapá



Examinador: Prof^a. Dr^a. Paloma Martins Mendonça
Universidade de Vassouras

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros
Universidade Federal do Amapá

Macapá/AP

2021

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só foi possível devido a colaboração e incentivo de algumas pessoas muito especiais e à elas devo toda minha gratidão:

À Deus, meus pais Gloria Regina, José Luiz e avó Lydia Alves por todo amor, carinho e apoio incondicional, quando necessário para superar as dificuldades que surgiram ao longo desta caminhada.

Ao meu orientador Dr. Fernando Antônio de Medeiros, agradeço por ter aceitado me orientar durante o curso, pela confiança depositada e ensinamentos ao longo desta jornada. Deixo aqui registrado o meu muito e sincero obrigado, professor!

Ao meu coorientador Dr. Carlos Manuel Dutok Sánchez, agradeço a disposição, empenho durante a realização da pesquisa e ensinamentos que vieram a somar ao projeto e em minha formação.

Agradecimento em especial aos profissionais que se envolveram direta ou indiretamente com o desenvolvimento do trabalho, Dr. Salustiano Vilar pela identificação das amostras vegetais e contribuições sempre pertinentes, aos membros do laboratório Arthrolab (UNIFAP) Dr. Ricardo Ferreira, Karen Carmo, e em especial ao Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto por abrir as portas do laboratório e a disposição em prol do andamento das minhas atividades como discente. Às doutoras e amigas, das quais cultivo imensa admiração e gratidão, Idelsy Chil Núñez e Lisset Ortiz Zamora, pelo carinho, noites intensas de estudo, conselhos, revisões de textos e artigos, traduções, aulas de espanhol e lições das mais diversas sobre a vida. Por último e não menos importante, agradeço a todos os discentes e profissionais do curso PPGCS/UNIFAP.

Algumas pessoas ao longo de nossas vidas nos marcam, por diferentes motivos, em alguns casos o amor floresce ou a amizade passa a ser cultivada, e quando menos esperamos ambos os sentimentos acabam por ser tornar tão grandes que esta pessoa, Yasmin Cuevo, passou a integrar minha família, meu porto seguro, parceira e confidente. Outras pessoas que devo, em parte, por terem proporcionado alguns dos momentos mais felizes e que serei eternamente grato, é a amorosa família Cuevo (Dona Ivaneida, Thayna e Maick, Jô, Tatiana e Guilherme) e família das Dores

(Dona Maria, Sr. Chumbada e filhos, Nelcira e José Alberto). E tantas outras amizades (Maurício, Vitor e Renata) que fui encontrar tão ao norte deste belo e gigante Brasil.

Aos meus queridíssimos amigos cubanos (Carlito, Ever, Eriel, Mariela, Alexey e Olider) que me ensinaram tanto sobre a vida e como diria “el cantante” Marc Anthony – “Voy a reír, voy a bailar, vivir mi vida... Voy a reír, voy a gozar... Vivir mi vida, la la la”. ¡Muchas gracias!

Agradecimento especial aos meus companheiros da UNIFAP, cujas amizades transpassaram os muros da universidade. Agradeço pelo companheirismo, solidariedade, engajamento durante os estudos e momentos de descontração e alegria (Gabriela Amanajás, Romário Balieiro, Luiza Frota, Ildilane Carvalho, Iuri Sena, Emanuelle Rodrigues, Leilson Lima e Maira Uchoa).

Ao Dr. Arlindo Serpa Filho a quem serei eternamente grato por ter me despertado o interesse pela entomologia e as oportunidades que tão generosamente me ofertou. Muito obrigado mestre!

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos hexânicos [CH₃(CH₂)₄CH₃] dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae)..... 32
- Tabela 2 – Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos diclorometânicos (CH₂Cl₂) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae)..... 33
- Tabela 3 – Concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ calculadas mediante análise Probit da espécie *Aedes aegypti* após o tratamento com os extratos hexânicos [CH₃(CH₂)₄CH₃] e diclorometânicos (CH₂Cl₂) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae)..... 36
- Tabela 4 – Atividade larvicida em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com o extrato diclorometânico (CH₂Cl₂) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae). 38
- Tabela 5 – Atividade larvicida em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com o extrato etanólico (CH₃CH₂OH) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae). 39
- Tabela 6 – Concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ calculadas mediante análise Probit da espécie *Aedes aegypti* após o tratamento com os extratos diclorometânicos (CH₂Cl₂) e etanólicos (CH₃CH₂OH) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae). 43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – *Annona glabra* L. (Magnoliales: Annonaceae) (A); Frutos (B). 21
- Figura 2 – Fluxograma do estudo da atividade larvicida e ação residual dos extratos de *Annona glabra* frente a espécie *Aedes aegypti*. 24
- Figura 3 – Modelo do ensaio preliminar com extrato Hexânico [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] e Diclorometânico (CH_2Cl_2) a partir dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) sobre as larvas (L3) de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 27
- Figura 4 – Modelo do ensaio experimental com extrato Diclorometânico (CH_2Cl_2) e Etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a partir dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) sobre as larvas (L3) de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)..... 29
- Figura 5 – Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos diclorometânico (CH_2Cl_2) e etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae). 35
- Figura 6 – Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos diclorometânico (CH_2Cl_2) e etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae). 41
- Figura 7 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato diclorometânico dos frutos verdes de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas. 44
- Figura 8 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato diclorometânico dos frutos maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas. 46
- Figura 9 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato etanólico dos frutos verdes de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas. 47
- Figura 10 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato etanólico dos frutos maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas. 48

RESUMO

A espécie *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é responsável pela veiculação de diversas arboviroses (dengue, chikungunya, febre amarela e zika), em virtude da sua competência na transmissão desses patógenos e danos à saúde humana o controle faz-se necessário. A planta *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) é apresentada na literatura científica possuindo uma ampla gama de propriedades e entre elas, a ação inseticida. Os objetivos desse estudo foram avaliar a atividade larvicida, ação residual e as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) dos extratos provindos da planta sobre a fase larval (L3) de *A. aegypti*. O processo de extração ocorreu a partir dos frutos verdes e maduros de forma fracionada utilizando como solventes hexano [CH₃(CH₂)₄CH₃], diclorometano (CH₂Cl₂) e etanol (CH₃CH₂OH). As porcentagens de mortalidade com os maiores valores registrados foram para ambos os extratos dos frutos (verdes e maduros) extraídos com CH₂Cl₂, porém o destaque ficou por conta do fruto verde que registrou um padrão linear crescente conforme as concentrações analisadas aumentavam, demonstrando uma relação concentração/efeito (larvicida) sobre *A. aegypti*. As duas maiores concentrações 160 e 320 ppm no período de 24 h mataram 60 e 72%, respectivamente, das larvas testadas e quando realizadas as observações destes mesmos grupos no período de 48 h foi registrado para 160 ppm uma mortalidade total de 86% e para 320 ppm registrou-se 96%. A ação residual com extrato dos frutos verdes (CH₂Cl₂) nas maiores concentrações apresentaram taxas de mortalidade expressivas e com o passar do tempo esse ritmo foi reduzindo. Isto ocorreu em todas as concentrações do início ao final do experimento, porém a única exceção foi com 320 ppm, onde houve certa constância no ritmo de mortalidade que veio a reduzir com o passar dos dias. O efeito dos extratos etanólicos (CH₃CH₂OH) dos frutos verdes e maduros nos modelos experimentais demonstraram reduzida capacidade no controle de larvas, sendo plausível afirmar que a polaridade das substâncias com maior efeito larvicida foram mais bem extraídas com diclorometano e não com etanol. O extrato diclorometânico de frutos verdes apresentou os menores valores de concentração letal, sendo as CL₅₀ igual a 160,61 ppm e 10,13 ppm nas 24 e 48 h respectivamente e as CL₉₀ igual a 445,39 ppm e 216,52 ppm para 24 e 48 h respectivamente, portanto a maior eficácia foi alcançada após as 48 h da aplicação do extrato. Os resultados encontrados neste estudo para os extratos dos frutos da espécie *A. glabra* indicam que a planta possui atividade larvicida e promissora aplicabilidade.

Palavras-chave: *Annona glabra*; Culicidae; *Aedes aegypti*; controle.

ABSTRACT

The species *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) is responsible for the transmission of several arboviruses (dengue, chikungunya, yellow fever and zika), due to its competence in the transmission of these pathogens and damage to human health, control is necessary. The plant *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) is presented in the scientific literature having a wide range of properties and among them, the insecticidal action. The objectives of this study were to evaluate the larvicidal activity, residual action and lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) of extracts from the plant on the larval stage (L3) of *A. aegypti*. The extraction process took place from green and ripe fruits in a fractional way using hexane [CH₃(CH₂)₄CH₃], dichloromethane (CH₂Cl₂) and ethanol (CH₃CH₂OH) as solvents. The percentages of mortality with the highest values recorded were for both extracts of the fruits (green and ripe) extracted with CH₂Cl₂, but the highlight was on account of the green fruit that recorded an increasing linear pattern as the analyzed concentrations increased, demonstrating a concentration relationship/(larvicidal) effect on *A. aegypti*. The two highest concentrations 160 and 320 ppm in the period of 24 h killed 60 and 72%, respectively, of the tested larvae and when the observations of these same groups were carried out in the period of 48 h, a total mortality of 86% was recorded for 160 ppm and for 320 ppm registered 96%. The residual action with extract of unripe fruits (CH₂Cl₂) at the highest concentrations showed significant mortality rates and over time this rate was reduced. This occurred at all concentrations from the beginning to the end of the experiment, but the only exception was at 320 ppm, where there was a certain constancy in the mortality rate that came to reduce over the days. The effect of ethanol extracts (CH₃CH₂OH) from unripe and ripe fruits in the experimental models showed a reduced ability to control larvae, and it is plausible to say that the polarity of substances with greater larvicidal effect were better extracted with dichloromethane and not with ethanol. The dichloromethane extract of unripe fruits showed the lowest values of lethal concentration, being the LC₅₀ equal to 160.61 ppm and 10.13 ppm at 24 and 48 h respectively and the LC₉₀ equal to 445.39 ppm and 216.52 ppm for 24 h and 48 h respectively, so the greatest effectiveness was achieved after 48 h of extract application. The results found in this study for the extracts of the fruits of the species *A. glabra* indicate that the plant has larvicidal activity and promising applicability.

Keywords: *Annona glabra*; Culicidae; *Aedes aegypti*; control.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 VETORES DE ARBOVIROSES (CULICÍDEOS) E CONTROLE	14
2.2 USO DE PLANTAS COM ATIVIDADE INSETICIDA	19
2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Annona glabra</i> L. (Annonaceae)	20
2.4 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA ESPÉCIE <i>Annona glabra</i>	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 GERAL	22
3.2 ESPECÍFICOS	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	23
4.2 PROCESSAMENTO E SECAGEM DA PLANTA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	24
4.2.1 PROCESSAMENTO E SECAGEM DA PLANTA	24
4.2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE <i>Annona glabra</i>	25
4.3 ENSAIO PRELIMINAR	26
4.3.1 ATIVIDADE LARVICIDA COM EXTRATO HEXÂNICO [CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃], e DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) A PARTIR DE <i>Annona glabra</i> (FRUTOS VERDES E MADUROS)	26
4.4 ENSAIO EXPERIMENTAL	27
4.4.1 ATIVIDADE LARVICIDA COM EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) e ETANÓLICO (CH ₃ CH ₂ OH) A PARTIR DE <i>Annona glabra</i> (FRUTOS VERDES E MADUROS)	28
4.4.2 AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) E ETANÓLICO (CH ₃ CH ₂ OH) DE <i>Annona glabra</i> (FRUTOS VERDES E MADUROS) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE <i>Aedes aegypti</i>	29

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 ELABORAÇÃO DO ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A PLANTA <i>Annona glabra</i>	31
5.2 ENSAIO PRELIMINAR – ATIVIDADE DOS EXTRATOS HEXÂNICO [CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃], DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) DE <i>Annona glabra</i> (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE <i>Aedes aegypti</i>	31
5.3 ENSAIO EXPERIMENTAL – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) E ETANÓLICO (CH ₃ CH ₂ OH) DE <i>Annona glabra</i> (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE <i>Aedes aegypti</i>	37
5.4 ENSAIO EXPERIMENTAL – AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) E ETANÓLICO (CH ₃ CH ₂ OH) DE <i>Annona glabra</i> (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE <i>Aedes aegypti</i>	44
6 DISCUSSÃO.....	49
6.1 EFEITO DOS EXTRATOS HEXÂNICO [CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃], DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) E ETANÓLICO (CH ₃ CH ₂ OH) DE <i>Annona glabra</i> (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE <i>Aedes aegypti</i>	49
6.2 EFEITO DA AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH ₂ Cl ₂) E ETANÓLICO (CH ₃ CH ₂ OH) DE <i>Annona glabra</i> (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE <i>Aedes aegypti</i>	50
7 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A ordem Diptera compreende moscas, mosquitos e afins, sendo um dos grupos mais diversos de insetos, tanto ecologicamente quanto em termos de riqueza de espécies (YEATES *et al.* 2007). Estima-se que este número gire em torno de 153 mil, divididos em 160 famílias descritas (RAFAEL *et al.* 2012). Algumas espécies possuem atividade ectoparasita, enquanto outras durante o período larval parasitam os tecidos do hospedeiro, ressaltando o fato de que todas as espécies inseridas nesta ordem são holometabólicas (RAFAEL *et al.* 2012). Dentro da família Culicidae, encontram-se alguns representantes vetores de diversas arboviroses, destaque para a dengue, febre amarela, zika e chikungunya.

O controle de mosquitos e moscas tem sido tradicionalmente feito com uso de inseticidas organossintéticos que causam danos ao ambiente, provocam o desenvolvimento de resistência e intoxicação nas pessoas que porventura entram em contato com o composto (PNU, 2002). Em resposta a esses problemas é necessário encontrar soluções alternativas visando reduzir riscos, custos e danos ambientais, tais como: uso de óleos naturais extraídos de diferentes partes vegetais de diversas espécies de plantas, sendo este um dos mais antigos métodos de controle de pragas.

As doenças relacionadas ao mosquito *Aedes aegypti* Linn, anualmente têm aumentado significativamente devido ao crescimento da população desse inseto, a não eliminação de possíveis criadores junto aos domicílios, ao comportamento cosmopolita e a sua ampla distribuição por todo o território brasileiro. As maiores cargas destas enfermidades concentram-se nas regiões tropicais e subtropicais acometendo principalmente as populações mais pobres (OPAS, 2020).

No que diz respeito ao cenário atual do controle entomológico, é necessário o desenvolvimento de técnicas que visem promover a maior eficiência dos inseticidas no controle desses insetos. Apesar dos avanços da comunidade científica, é urgente a demanda por mais pesquisas que apresentem alternativas de controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VETORES DE ARBOVIROSES (CULICÍDEOS) E CONTROLE

Os mosquitos são insetos cosmopolitas com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (FORATTINI, 2002; BARRETO *et al.* 2020). A transmissão das arboviroses restringe-se ao momento da realização da hematofagia por parte das fêmeas, que previamente entraram em contato com sangue infectado de algum indivíduo (WHO, 2019; WHO, 2020). Estes insetos ingerem microorganismos patogênicos junto com o sangue de um portador infectado, podendo ser uma pessoa ou animal, e a contaminação de um novo indivíduo ocorre após o novo repasto sanguíneo por parte deste inseto (WHO, 2020).

Dentro da família Culicidae, destacam-se os representantes do gênero *Aedes* apontados como sendo os responsáveis pela vetoração de diversas arboviroses, exemplos: vírus da dengue, febre amarela, zika e chikungunya (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; BARRETO *et al.* 2020; WHO, 2020). Seus imaturos são encontrados em recipientes capazes de reter água e estes locais apresentam associação próxima as residências evidenciando elevado grau de sinantropia do inseto (WHO, 2019).

A dengue é uma infecção viral transmitida principalmente pelo mosquito *A. aegypti*, as sintomatologias mais comuns são: febre, dores musculares, mal-estar, dores de cabeça e nos olhos, ausência de apetite e manchas vermelhas pelo corpo. Existem quatro sorotipos do vírus e uma vez infectado por um deles a pessoa adquire imunidade permanente ao sorotipo específico (FIOCRUZ, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). É uma doença que não possui tratamento específico e segundo os profissionais de saúde o recomendado é repousar, ingerir bastante água e não se automedicar. Em caso de suspeita, o ideal é buscar um profissional de saúde para ter o diagnóstico. A prevenção e o controle dependem de medidas profiláticas efetivas de controle vetorial. Em alguns países asiáticos e latino-americanos, as crianças são as principais atingidas. Aproximadamente metade da população mundial encontra-se em risco de contrair essa doença, sendo as regiões de clima tropical e subtropical os locais de maior ocorrência, especialmente em zonas urbanas e semiurbanas (OMS, 2017). No âmbito nacional os registros para essa doença vêm se mantendo elevados e em 2019 foram contabilizados 1.544.987 casos prováveis, com uma taxa de

incidência de 735,2 casos por 100 mil habitantes e 782 óbitos confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

A febre amarela é uma doença viral aguda, hemorrágica transmitida por mosquitos infectados (*Haemagogus*, *Sabethes* e *A. aegypti*). Os sintomas relatados são: febre, dores de cabeça, icterícias, dores musculares, náuseas, vômitos e cansaço. A prevenção ocorre através da vacinação, sendo esta ferramenta a medida mais eficaz de proteção contra esta enfermidade. É uma doença endêmica de países tropicais, estando estes localizados no continente africano, na América Central e na América do Sul. No Brasil, anteriormente a vacinação era disponibilizada apenas para as regiões com registro de casos, com o passar do tempo e maior monitoramento o Ministério da Saúde optou por expandir de forma gradual a cobertura vacinal. Atualmente, todos os estados do país contam com a vacina contra a febre amarela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019a). Desde 2017 seguindo a recomendação da OMS, o Brasil adota o esquema vacinal de dose única durante toda a vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a; BVS-MS, 2018). O imunizante aplicado desta forma confere ao indivíduo proteção com uma taxa de eficácia de 99% (OPAS, 2018). Durante o período de monitoramento (2019/2020), foram notificados 976 casos suspeitos em humanos, sendo oito em investigação e dos 19 confirmados, quatro óbitos (letalidade de 21,1%). A maioria dos casos confirmados envolviam homens, com uma única exceção, com idades entre 16 e 59 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a). A recusa por parte de alguns indivíduos em se vacinar e a exposição a áreas com incidência da doença, favorecem a ocorrência de casos e conseqüentemente risco de morte, tendo em vista a alta letalidade atrelada a doença. Desta forma, é fundamental a colaboração da sociedade civil na adesão das medidas propostas pelos serviços de saúde na prevenção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a).

O vírus zika é transmitido pelo *A. aegypti* e os seus principais sintomas são: febre baixa, erupções cutâneas, dores de cabeça e nas articulações, mialgias, mal-estar e conjuntivites não purulentas, a intensidade dos sintomas varia de leve a moderada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; OPAS, 2021). O vírus zika é responsável pelo desenvolvimento de complicações e doenças neurológicas, tais como encefalite, Síndrome de Guillain Barré e microcefalia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). A melhor prevenção é acabar com os focos de proliferação do mosquito eliminando possíveis criadouros, como garrafas plásticas, pneus, pratos dos vasos de plantas e

manter caixas d'águas tampadas. A transmissão pode ocorrer de três formas principais: picada do mosquito, relação sexual e materno-fetal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). O uso de repelentes, telas de proteção (mosquiteiro) e roupas compridas capazes de cobrir a pele exposta são aconselhados para evitar a picada do mosquito. Essas recomendações devem ser seguidas por todos em especial as gestantes, devido ao aumento de casos de microcefalia em bebês relacionados ao zika. O tratamento da doença é focado no controle da febre e das dores com uso de antitérmicos e analgésicos, sempre sob recomendação médica. Havendo sequelas mais graves, envolvendo doenças neurológicas, acompanhamento médico é fundamental. Atualmente não existem vacinas contra o vírus zika. Em boletim epidemiológico publicado, entre os anos de 2015 e 2020, foram confirmados 3.577 casos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Apenas no ano de 2020 foram notificados 1.007 novos casos suspeitos e até o momento 35 tiveram confirmação, 597 permanecem sob investigação e os outros foram classificados como prováveis, descartados, inconclusivos e excluídos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Nos dados mais recentes, entre fevereiro e maio de 2021, foram notificados 2.006 casos prováveis que representa uma taxa de incidência de 0,9 caso/100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021c). Em relação ao ano anterior, houve uma redução de 43,3% no número de casos. Nenhum óbito foi confirmado até maio e apenas os estados do Amazonas, Roraima e Santa Catarina detectaram a presença do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021c).

A chikungunya é uma doença viral transmitida pelo *A. aegypti* e *Aedes albopictus*. A sintomatologia apresentada pelos pacientes são: febre, dores severas nas articulações e músculos, náuseas, cefaleia, calafrios, cansaço e erupções cutâneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Os sinais clínicos são facilmente confundidos com o quadro de dengue e zika. A doença não possui cura, sendo conhecidas apenas medidas paliativas que focam no alívio dos sintomas. As ocorrências concentram-se na África, Ásia, no subcontinente indiano e nas Américas, onde vêm ocorrendo grandes surtos (OMS, 2017). O vírus chikungunya foi confirmado em território brasileiro no segundo semestre de 2014 no Amapá e Bahia e atualmente todos os estados registram transmissão dessa doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b). Segundo o Boletim Epidemiológico mais recente, entre o período de janeiro a maio de 2021 (semanas epidemiológicas 1 a 20), foram notificados 32.978 casos

prováveis (taxa de incidência de 15,6 casos/100 mil habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021c). Através de análise laboratorial foram confirmados quatro óbitos em decorrência da doença, sendo dois no estado de São Paulo, um no Espírito Santo e um em Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021c).

Grandes surtos de dengue, chikungunya, febre amarela e zika, vêm sendo notificados e ceifando vidas humanas em diversos países. A disseminação dessas enfermidades está correlacionada com fatores demográficos – intenso processo de urbanização e deslocamento em massa proporcionado pelas viagens e atividades comerciais globais; ambientais – mudanças climáticas; e sociais – desigualdade, precariedade dos sistemas de saúde e déficit educacional (WHO, 2020).

O ciclo de vida do *A. aegypti* é dividido em quatro etapas: ovo, larva, pupa e adultos. Para que o ciclo se complete o tempo estimado para o desenvolvimento é de aproximadamente 7 a 10 dias em condições favoráveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O ciclo se inicia com uma fêmea adulta realizando a ovoposição dos seus ovos sobre uma superfície de um reservatório com água limpa e parada. Os ovos desta espécie são extremamente resistentes ao ressecamento, a eclosão só ocorre quando eles entram em contato com a água e de cada ovo sai uma larva em 2 ou 3 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A fase larval é subdividida em quatro estágios (L₁, L₂, L₃ e L₄), onde estes imaturos irão se alimentar e através do processo de ecdise vão aumentando de tamanho. Após 5 dias, as larvas crescem e alcançam o estágio de pupa, assim elas permanecem por aproximadamente 2 dias e então o mosquito atinge a fase adulto completando seu ciclo de vida (OXITEC, 2012; SANTOS, 2016; CDC, 2020).

O controle químico é amplamente utilizado devido sua eficiência, baixo custo e facilidade de uso em relação aos demais. A contínua utilização desses produtos pode vir a causar desequilíbrios mediante a eliminação de insetos benéficos e explosões populacionais. Segundo Vieira; Mafezoli e Biavatti (2001), pode ocorrer a seleção de insetos resistentes principalmente através da aplicação de produtos organoclorados e organofosforados. Além disso, existe o risco de contaminação do meio ambiente, como o solo, água (lençóis freáticos), atmosfera e seres vivos. Devido a esses problemas uma alternativa seria a produção de outros tipos de inseticidas tendo como base produtos naturais. Recentemente, têm-se buscado novos compostos com ação inseticida que possuam características desejáveis, assim os inseticidas botânicos

demonstram ser uma fonte promissora. Cientistas vêm estudando as atividades das mais diversas plantas, sendo algumas delas ricas em compostos já conhecidos e que apresentam atividade contra insetos, como exemplo os alcaloides (PARK *et al.* 2002; KAMBOU; GUISSOU, 2011). Certas substâncias quando ingeridas por espécies herbívoras podem ocasionar a interrupção da alimentação, repelência temporária ou permanente e interferência no processo de desenvolvimento. Essas substâncias agem estimulando o sistema nervoso do inseto e a resposta pode variar de acordo com a sua especificidade (STOKA, 1987). São geralmente específicas para determinadas espécies, não causando diretamente sua morte, mas inibindo suas funções fisiológicas e bioquímicas, além disso, podem interferir no sistema endócrino, responsável pelo desenvolvimento, metamorfose, reprodução e controle de outros processos do metabolismo, representando um ponto vulnerável em seu ciclo de vida (STOKA, 1987).

No Brasil, as políticas e estratégias para o controle do *A. aegypti* são baseadas na aplicação de pesticidas (ovicidas, larvicidas e inseticidas), tendo sido implementadas a partir do ano de 1986 (MINISTRY OF HEALTH BRAZIL, 2016). No entanto, os resultados têm sido decepcionantes. Diferentes inseticidas organofosforados e piretróides foram utilizados, resultando no aumento da resistência do vetor (FREITAS; VALLE, 2014). A seleção em decorrência dos inseticidas é um exemplo das adaptações que passam a selecionar os genes de resistência dentro das populações de culicídeos selvagens (CROW, 1957). Apesar desses resultados negativos, tem-se aplicado de forma ativa a mesma estratégia para enfrentar as epidemias de zika e chikungunya com a mobilização das forças armadas para inspecionar casas, aplicar ovicidas e larvicidas nos recipientes coletores de água e usando termonebulização como uma tentativa de controlar o vetor adulto, apesar de sérias preocupações relacionadas a segurança dos larvicidas pyriproxyfen e malathion (DA SILVA *et al.* 2016; IARC, 2017).

O controle necessita ser realizado de forma que a agressão ao meio ambiente seja minimizada, atingindo apenas os organismos alvos, evitando a seleção de insetos resistentes, provocando o mínimo de contaminação ambiental, reduzindo de forma substancial o número de casos e possíveis óbitos decorrentes da veiculação dos diferentes patógenos transmissíveis por estes insetos (DE MENDONÇA *et al.* 2005; AMARASINGHE *et al.* 2020). Nas regiões com elevada incidência de casos

envolvendo arboviroses, as pesquisas focadas na busca por novos compostos com atividade inseticida (ovicida, larvicida, pupicida e/ou adulticida) possuem elevado grau de relevância (DE OMENA *et al.* 2006). Dentre as principais formas de controle utilizadas os inseticidas de origem vegetal se destacam sobre os de origem sintética, pois atendem a todos esses pressupostos.

2.2 USO DE PLANTAS COM ATIVIDADE INSETICIDA

As plantas e os seus derivados têm mostrado atividade contra ácaros, roedores, nematódeos, bactérias, vírus, fungos e insetos, incluindo mosquitos (GRAINGE; AHMED, 1988). Os testes realizados com produtos obtidos a partir de plantas, tais como extratos aquosos (KUMUL, 1983; ESPINOSA, 1985; SALCEDO, 1985; RODRÍGUEZ; LAGUNES, 1987; SÁNCHEZ, 1987; RIVERA, 1992; BOWERS *et al.* 1995; SÁNCHEZ; GONZÁLEZ; GONZÁLEZ, 1997), extratos a base de acetona (SUBRAMONIA; KATHIRESAN, 1992; PUSHPALATHA; MUTHUKRISHNAN, 1995; SAGAR; SEHGAL, 1997; AMARILES-BARRERA; GARCÍA-PAJÓN; PARRA-HENAO, 2013;) e óleos essenciais (HO; GOH; LEE, 1992; ANSARI, 2000; ANSARI, *et al.* 2000; LARA REYNA *et al.* 2004) demonstraram atividade larvicida em Culicidae (GRAINGE; AHMED, 1988).

Os extratos naturais das plantas têm gerado inseticidas valiosos, apresentando vantagens perante a outros compostos de origem sintética, já que estes não parecem causar o surgimento de linhagens de insetos resistentes (CREMLYN, 1995). As substâncias naturais obtidas a partir de algumas espécies de plantas superiores podem apresentar propriedades bactericidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas (BAUDILLO, 1973). Na busca por produtos alternativos para o controle da espécie *A. aegypti*, pesquisas vêm sendo desenvolvidas e estimuladas no intuito de encontrar novas substâncias com tal atividade, exemplo da espécie *Ocimum sanctum*, planta descrita tendo efeito inseticida sobre as espécies de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (TAWATSIN *et al.* 2006). O óleo essencial extraído desta planta tem como seu maior constituinte o eugenol, substância como ação inseticida sobre *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (BHATNAGAR *et al.* 1993).

2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Annona glabra* L. (Annonaceae)

A família Annonaceae é o grupo de maior relevância inserido na ordem Magnoliales, constituído aproximadamente de 135 gêneros e 2.500 espécies, sendo considerada uma das maiores entre as angiospermas basais (TSOU; FU, 2002; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003; CHATROU; RAINER; MAAS, 2004; GROUP, 2009). O gênero *Annona* L. nativa da região Neotropical – Américas (Central e Sul) e África tropical, é formado por cerca de 175 espécies (FRIES, 1959; LARRANAGA; HORMAZA, 2015). Os frutos produzidos por algumas espécies do gênero eram apreciados e cultivados por civilizações pré-colombianas na América Central e do Sul (NAP, 1989; LARRANAGA; HORMAZA, 2015) sendo esta prática mantida até os dias atuais em países em desenvolvimento com climas tropicais e subtropicais (LARRANAGA; HORMAZA, 2015).

A espécie *Annona glabra* L. (Annonaceae), *Annona australis*, *Annona palustris* ou *Annona palustris* var. *grandiflora*, possui diversos nomes populares como araticum do brejo, araticum-cortiça, araticum da praia, araticum, araticum de jangada, araticum do rio, araticum-panã, anona-lisa, panã, maçã de jacaré, araticupana e ou em inglês pond-apple (CORRÊA, 1984; PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004). A espécie *A. glabra* é constituída por plantas de pequeno porte (arbustos ou arvoretas), frutífera, com ampla distribuição geográfica e é encontrada nas margens de lagos e rios, se desenvolvendo em ambientes sujeitos a inundações podendo durar por períodos curtos, longos ou até constantemente inundados (CROAT, 1978; CAMPBELL; STONE; ROSAS, 1992), isso se deve ao seu sistema hidráulico de troncos e galhos eficientes, similar a outras espécies encontradas em regiões tropicais e temperadas (SCHERER, 1995; ZOTZ *et al.* 1995; ZOTZ; TYREE; PATIÑO, 1997).

Em território brasileiro, a espécie apresenta uma ampla distribuição passando pelos estados do Amapá, Pará, Paraíba, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina (FRIES, 1931; MAAS *et al.* 2001; PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004; LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005).

2.4 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA ESPÉCIE *Annona glabra*

As plantas dessa espécie (**Figura 1**) possuem folhas oblongas ou ovado-lanceoladas, cartáceas, subcoriáceas e glabras com pecíolo longo; flores isoladas, terminais, com pétalas carnudas, coloração esbranquiçada típica das Annonaceae tropicais e com uma fragrância que remete à acetona; os frutos são de tom amarelado, sincárpico e obovado à ovado semelhante a uma maçã, contudo o consumo não se destaca frente a outros representantes do gênero (CHEN *et al.* 2000; MAAS *et al.* 2001; PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004; LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005; GROUP, 2009; CHATROU *et al.* 2012; CNCFLORA, 2012; LARRANAGA; MATSUMOTO *et al.* 2014; HORMAZA, 2015).

Figura 1 – *Annona glabra* L. (Magnoliales: Annonaceae) (A); Frutos (B).



Fonte: Próprio Autor

Algumas das propriedades ligadas à espécie são relacionadas a sua ação inseticida (OHSAWA *et al.* 1991; PADMAJA *et al.* 1995; ZENG *et al.* 1996; CHANG, *et al.* 2000; DE MENDONÇA *et al.* 2005); antimicrobiana (PADMAJA *et al.* 1995; ZENG *et al.* 1996; GALVÃO *et al.* 2016); antifúngica (PADMAJA *et al.* 1995); antiparasitária (BALBACH, 1961; OHSAWA *et al.* 1991); antirreumática e emoliente (BALBACH, 1961); inibição das células carcinogênicas, leucemia linfocítica crônica e do complexo mitocondrial I (LI *et al.* 1998; LIU *et al.* 1999; COCHRANE *et al.* 2008; MATSUMOTO *et al.* 2014); antimutagênica (VILAR *et al.* 2008); antioxidantes (ROESLER *et al.* 2007; GENOVESE *et al.* 2008; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010); significativa inibição da replicação do HIV em linfócitos H9 e na inibição do transcriptase reversa (HIV-1) (CHANG *et al.* 1998).

A espécie ocorre em habitats pantanosos de manguezais e são tolerantes a água salgada ou salobra, porém não são capazes de sobreviver em terrenos com baixa retenção, escassez hídrica, solos arenosos e bem drenados (ZOTZ; TYREE; PATIÑO, 1997; GOODRICH; RAGUSO, 2009; MATSUMOTO *et al.* 2014) e quando expostas a condições de seca suas raízes rapidamente são afetadas (ZOTZ; TYREE; PATIÑO, 1997; GOODRICH; RAGUSO, 2009). Devido a sua biologia, a espécie se torna ideal para estudos de adaptações fisiológicas de plantas tolerantes a ambientes ricos em recursos hídricos, além de exercer um importante papel na sucessão ecológica, como fica evidenciado em alguns estudos (CROAT, 1978; ZOTZ; TYREE; PATIÑO, 1997).

A espécie apresenta virtudes e aplicações na área da saúde, com propriedades relacionadas à fitoquímica; uso na medicina tradicional, extratos crus empregues no sistema de saúde chines, japonês e mexicano (COCHRANE *et al.* 2008); e atividade biológica, nos frutos encontram-se compostos (acetogeninas, *ent*-cauranos, peptídeos e alcalóides) com inúmeras propriedades clínicas e farmacológicas em seres humanos (ANH *et al.* 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a atividade larvicida dos extratos de *Annona glabra* (Annonaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

3.2 ESPECÍFICOS

1. Testar os extratos hexânicos [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], diclorometânicos (CH_2Cl_2) e etanólicos ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) obtidos dos frutos verdes e maduros de *A. glabra*, sobre a fase larval (L3) de *A. aegypti* em diferentes concentrações;
2. Aferir a ação residual larvicida dos extratos diclorometânicos (CH_2Cl_2) e etanólicos ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) contra imaturos de *A. aegypti*;

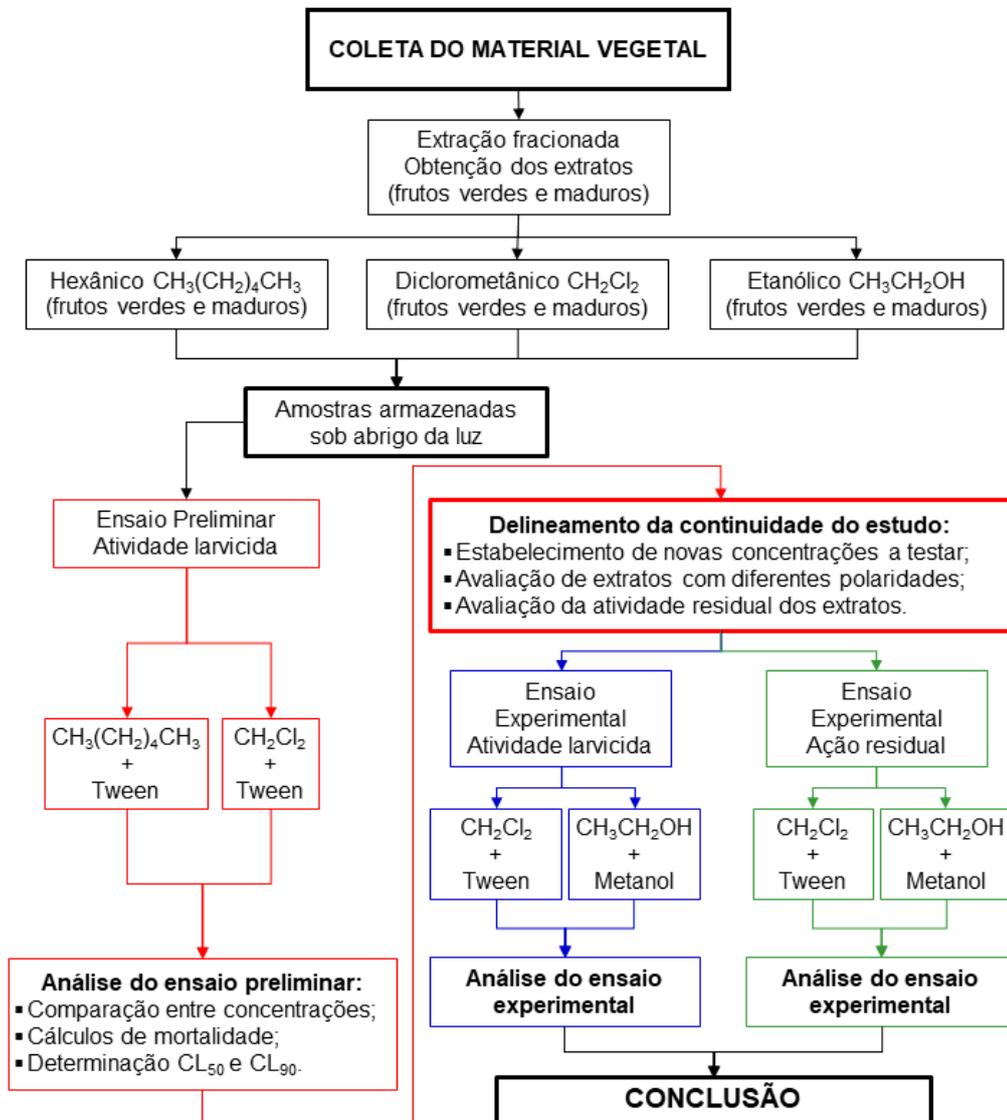
3. Determinar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) sobre a fase larval (L3) de *A. aegypti* em diferentes concentrações tratadas com os extratos diclorometânicos (CH₂Cl₂) e etanólicos (CH₃CH₂OH) obtidos dos frutos verdes e maduros de *A. glabra*.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As amostras coletadas de *A. glabra* incluíam caules, folhas, flores e frutos. Parte desse material serviu para a montagem de uma exsicata que fora depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA). As amostras de frutos frescos totalizaram: frutos verdes – 3.790 Kg e frutos maduros – 8.403 Kg, sendo que apenas uma parte deste material foi utilizado. O fluxograma geral descrevendo o passo a passo do presente estudo se mostra na **Figura 2**.

Figura 2 – Fluxograma do estudo da atividade larvídica e ação residual dos extratos de *Annona glabra* frente a espécie *Aedes aegypti*.



Fonte: Próprio Autor

A coleta do material vegetal se deu na região norte do Brasil, no estado do Amapá, município de Santana, Travessa Senador Nilo Coelho 124, nas coordenadas geográficas (- 0.04773705218987986, - 51.16201764417858) e na Travessa Vinte e Três (- 0.04326750798166975, -51.154986189767165).

4.2 PROCESSAMENTO E SECAGEM DA PLANTA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.1 PROCESSAMENTO E SECAGEM DA PLANTA

O material vegetal coletado para obtenção dos extratos (frutos verdes e maduros) foi conduzido ao Laboratório Multiusuário (LabMu) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Posteriormente, passou por um procedimento de lavagem em água corrente e seleção de possíveis frutos estragados, os quais foram descartados, seguido de separação dos frutos verdes dos maduros ambos com sementes, sendo pesados separadamente e cortados com faca para facilitar a secagem.

Após serem fragmentados, foi determinada a massa dos frutos verdes e maduros, colocados em bandejas de alumínio e secos em estufa de secagem da marca FANEM, modelo ORION® 515, a uma temperatura de 45°C por 5 (cinco) dias até completar a desidratação.

Após secagem do material vegetal, foram pesados em balança comum da marca XTRAD, modelo SF-400, para determinar sua massa seca e cálculo do teor de umidade. Posteriormente, foram triturados separadamente em liquidificador da marca Arno, modelo Clic Lav 700W, até reduzir a partículas pequenas para facilitar a obtenção dos extratos.

4.2.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE *Annona glabra*

O processo de extração decorreu de forma fracionada com uso de três diferentes solventes – Hexânico $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, Diclorometânico (CH_2Cl_2) e Etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) grau PA. As amostras dos frutos verdes e maduros, foram alocadas separadamente em frascos de vidro ($\cong 2$ L) com tampas rosqueadas e devidamente identificadas e a partir desse momento foi iniciado o processo de extração com os solventes de forma sequenciada.

A extração se deu à frio em temperatura ambiente pelo procedimento de maceração, cada procedimento teve uma duração mínima de 10 (dez) dias e cada solvente foi utilizado três vezes consecutivamente, a fim de extrair ao máximo os componentes presentes nas amostras solúveis desse solvente.

As extrações seguiram o modelo:

Extração com solvente Hexânico [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] – frutos verdes (80 g) e frutos maduros (144 g) – utilizou-se 750 mL, repetindo por três vezes consecutivas, sendo o

solvente trocado a cada 10 dias. O produto de cada extração obtido (solução extrativa) foi transferido para beakers (1.000 mL) devidamente identificados, cobertos com papel alumínio com pequenos orifícios e presos por fita crepe e as amostras foram deixadas em temperatura ambiente para permitir a evaporação do solvente.

Extração com solvente Diclorometânico (CH_2Cl_2) – após as extrações com o primeiro solvente, ocorreram as extrações com diclorometano seguindo o mesmo modelo apresentado anteriormente.

Extração com solvente Etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 92,8° INPM – o procedimento seguiu o modelo anterior, desta vez com 1.000 mL de solvente para cada extração.

Após a evaporação dos solventes os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico foram transferidos separadamente para frascos de vidro pequenos (frascos de insulina), pesados em Balança Analítica da marca BEL do modelo M214-Ai para determinar o rendimento de cada extrato e todos os frascos foram guardados sobre o abrigo da luz dentro de um armário, sendo expostos ao ambiente apenas no momento da realização do preparo das concentrações.

4.3 ENSAIO PRELIMINAR

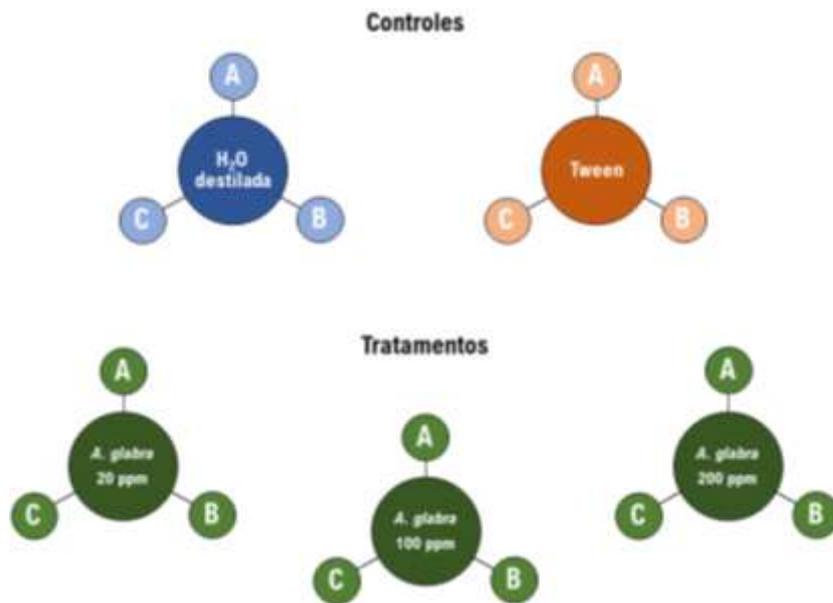
4.3.1 ATIVIDADE LARVICIDA COM EXTRATO HEXÂNICO [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], e DICLOROMETÂNICO (CH_2Cl_2) A PARTIR DE *Annona glabra* (FRUTOS VERDES E MADUROS)

Os imaturos de *A. aegypti*, larvas (L3), alvo do estudo, foram cedidos pelo Arthrolab (Laboratório Arthropoda da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP – Macapá, Brasil), de uma colônia da cepa Rockefeller. A cepa Rockefeller foi estabelecida pelo Instituto Rockefeller no ano de 1959 (New York, EUA), esta linhagem é utilizada como controle de suscetibilidade nos estudos de atividade inseticida (HARTBERG; CRAIG, 1970; MARTINS *et al.* 2009), a cepa é empregue a anos como referência para estudos em laboratório (JUNIOR; JESUS, 2009).

Para realização da atividade larvicida foi preparada uma solução mãe a 1000 partes por milhão (ppm), utilizando 1 mL (0,9 g) dos extratos dos frutos (verdes e maduros) de *A. glabra*, solubilizado em 4 mL de Tween 80 e completado o volume com água destilada para 1000 mL de solução. O ensaio preliminar (**Figura 3**) consistiu no controle H_2O destilada; Tween e três concentrações (20, 100 e 200 ppm) dos

diferentes extratos de *A. glabra* (Hexânico e Diclorometânico – frutos verdes e maduros). Foram utilizadas triplicatas identificadas de A a C para cada tratamento, sendo constituídas por 10 larvas/frasco, totalizando 30 indivíduos por tratamento, cada teste contou com um número amostral de 150 indivíduos e seus respectivos controles e o experimento com o somatório geral de 600 larvas (L3). Esses indivíduos foram alocados em recipientes plásticos (250 mL sem tampa) que continham 100 mL do volume da substância respectiva aos seus grupos testados.

Figura 3 – Modelo do ensaio preliminar com extrato Hexânico [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$] e Diclorometânico (CH_2Cl_2) a partir dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) sobre as larvas (L3) de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).



Fonte: Próprio Autor

Os ensaios foram conduzidos sob ambiente controlado a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 1\%$ URA e fotoperíodo de 12 horas. As observações foram realizadas em três momentos, logo após o início (0 horas) e com 24 e 48 horas; estes momentos consistiam em contabilizar os números de larvas mortas ou moribundas. As larvas contabilizadas, deviam ser incapazes de alcançar a superfície da solução dos recipientes plásticos e/ou não apresentar movimento na coluna d'água, mesmo após estimulações por meio de agitação.

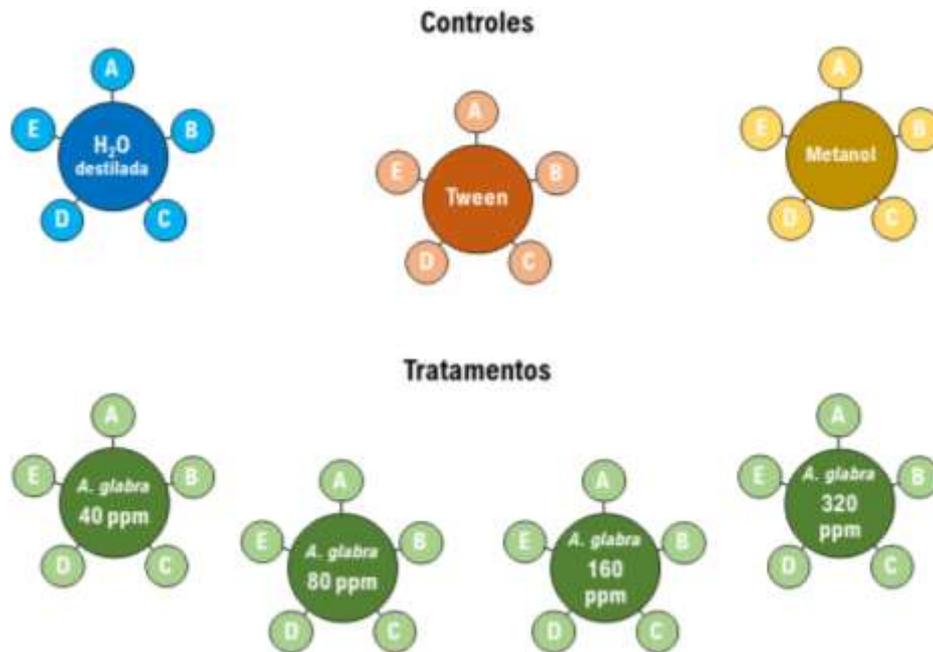
4.4 ENSAIO EXPERIMENTAL

4.4.1 ATIVIDADE LARVICIDA COM EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH_2Cl_2) e ETANÓLICO ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) A PARTIR DE *Annona glabra* (FRUTOS VERDES E MADUROS)

Desta vez, as larvas (L3) de *A. aegypti*, alvos do estudo, foram cedidos pelo Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – Laboratório de Entomologia Médica (IEPA/LabEnMed), de uma colônia da cepa Rockefeller.

Para avaliação da atividade larvicida, foram preparadas duas soluções mães a 1000 partes por milhão (ppm) cada, utilizando 1 mL (0,9 g) dos extratos dos frutos (verdes e maduros) de *A. glabra*, solubilizado em 4 mL de Tween 80 (extrato diclorometânico) e solubilizado em 4 mL de Metanol (extrato etanólico) e ambos tendo o volume de 1000 mL de solução completado com água destilada. O desenho experimental (**Figura 4**) consistiu no controle H_2O destilada; controle Tween ou controle Metanol e quatro concentrações (40, 80, 160 e 320 ppm) dos diferentes extratos de *A. glabra* (Diclorometânico e Etanólico – frutos verdes e maduros). Foram utilizadas quintuplicatas (A, B, C, D e E) para cada tratamento, sendo constituídas por 10 larvas/frasco, totalizando 50 indivíduos por tratamento, cada teste contou com uma amostra de 300 indivíduos e seus respectivos controles e o experimento com o somatório geral de 1200 larvas (L3). Esses indivíduos foram alocados em recipientes plásticos (250 mL sem tampa) que continham 100 mL do volume da substância respectiva aos seus grupos testados.

Figura 4 – Modelo do ensaio experimental com extrato Diclorometânico (CH_2Cl_2) e Etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a partir dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) sobre as larvas (L3) de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).



Fonte: Próprio Autor

Os ensaios foram conduzidos sob ambiente controlado a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 1\%$ URA e fotoperíodo de 12 horas. As observações foram realizadas em três momentos, logo após o início (0 horas) e com 24 e 48 horas; estes momentos consistiam em contabilizar os números de larvas mortas ou moribundas. As larvas contabilizadas, deviam ser incapazes de alcançar a superfície da solução dos recipientes plásticos e/ou não apresentar movimento na coluna d'água, mesmo após estimulações por meio de agitação.

4.4.2 AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH_2Cl_2) E ETANÓLICO ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) DE *Annona glabra* (FRUTOS VERDES E MADUROS) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE *Aedes aegypti*

O experimento consistiu na observação das larvas (L3) de *A. aegypti*, mantidas em contato com o extrato de *A. glabra* (CH_2Cl_2 e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ – frutos verdes e maduros), ao longo de um determinado período para averiguar por quanto tempo as substâncias testadas apresentavam ação residual sobre os imaturos. Os insetos, novamente, foram cedidos pelo IEPA/LabEnMed.

O desenho experimental consistia em quatro concentrações (40, 80, 160 e 320 ppm) dos diferentes extratos. Foi mantido o uso de quintuplicatas (A, B, C, D e E) para cada tratamento, sendo constituídas por 10 larvas/frasco, totalizando 50 indivíduos por tratamento, os testes para cada extrato contaram com um N amostral de 200 indivíduos e foram utilizadas 800 larvas em cada observação. Esses indivíduos foram alocados em recipientes plásticos (250 mL sem tampa) que continham 100 mL do volume da substância respectiva aos seus grupos testados.

Os ensaios foram conduzidos sob ambiente controlado, a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 1\%$ de URA e fotoperíodo de 12 horas. As observações ocorreram em cinco momentos ao longo de 10 dias (48, 96, 144, 192 e 240 horas) e sempre respeitando o intervalo de 48 horas entre elas, estes momentos consistiam em contabilizar os números de larvas mortas ou moribundas. Após cada observação, as larvas dos recipientes plásticos eram substituídas por outras novas, sempre no mesmo estágio de desenvolvimento (larvas - L3) e a substância analisada retornava ao seu recipiente de origem. As larvas contabilizadas, deviam ser incapazes de alcançar a superfície da solução dos recipientes plásticos e/ou não apresentar movimento na coluna d'água, mesmo após estimulações por meio de agitação.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de significância dos dados larvicidas foi realizado utilizando o teste de variância (ANOVA 1; $P \leq 0,05$) e o teste de comparação de múltiplas médias de Tukey e para os dados da ação residual foi utilizando o teste de Qui-quadrado (χ^2), ambos através do software GraphPad Prism 9[®] (San Diego, Califórnia, EUA). O método Finney Probit foi utilizado para determinar as Concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) na população. Para a comparação dos valores de mortalidades em 24 e 48 horas foi primeiramente determinada a normalidade dos dados usando um teste de Shapiro-Wilk, seguido do teste t pareado ou do teste de Wilcoxon. Aplicou-se análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) para a comparação das mortalidades no ensaio residual, executados também no software GraphPad Prism 9[®].

5 RESULTADOS

5.1 ELABORAÇÃO DO ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A PLANTA *Annona glabra*.

Foi elaborado um artigo de revisão bibliográfica intitulado: “Aplicação de *Annona glabra* L. (Annonaceae) na área da saúde, composição química e atividade biológica”. A carta de aceite para a publicação do artigo (**Anexo IV**) foi emitida pela revista Amazonia Investiga (ISSN 2322 - 6307), publicado no Volume 11, número: 49 páginas da 224 a 238 com Identificador de Objeto Digital (DOI): <https://doi.org/10.34069/AI/2022.49.01.25>.

5.2 ENSAIO PRELIMINAR – ATIVIDADE DOS EXTRATOS HEXÂNICO [CH₃(CH₂)₄CH₃], DICLOROMETÂNICO (CH₂Cl₂) DE *Annona glabra* (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE *Aedes aegypti*.

Os produtos obtidos através da extração fracionada foram transferidos para frascos de vidro com tampa (17 mL), devidamente separados e identificados. Os rendimentos foram: Frutos [verdes/CH₃(CH₂)₄CH₃] – 41,6088 g; Frutos [maduros/CH₃(CH₂)₄CH₃] – 22,2713 g; Frutos (verdes/CH₂Cl₂) – 13,3814 g; Frutos (maduros/CH₂Cl₂) – 39,2389 g e Frutos (verdes/CH₃CH₂OH) – 22,4520 g; Frutos (maduros/CH₃CH₂OH) – 22,6734 g.

A fim de iniciar o primeiro estudo com os extratos Hexânicos e Diclorometânicos dos frutos (verdes e maduros) de *A. glabra*, foi necessário realizar ensaios preliminares para aferir a possível atividade larvicida e determinar quais concentrações deveriam ser utilizadas nos ensaios futuros. Como primeira evidência do tratamento com todos os extratos se observou que nenhum deles teve efeito agudo imediato, ou seja, não apresentaram atividade larvicida logo após o momento da aplicação (tempo zero horas), sendo assim se assumem, no presente estudo, valores de mortalidade absolutos e relativos com valor zero (0) para o tempo inicial (0).

Ao se observar resultados encontrados provenientes dos ensaios utilizando os extratos hexânicos dos frutos verdes de *A. glabra* foi possível verificar que apenas a concentração máxima aplicada (200 ppm) apresentou diferenças estatísticas quando comparada com os grupos controles, com uma média de 3,67 ±1,53 nas primeiras 24 horas e 4,00 ±1,00 às 48 horas. Já no caso dos extratos hexânicos obtidos a partir

dos frutos maduros de *A. glabra*, estes não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle nem entre eles (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos hexânicos [CH₃(CH₂)₄CH₃] dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).

Grupos	Tratamentos	Mortalidade 24h		Mortalidade 48h	
		$\chi \pm DP$	Intervalo de Variação	$\chi \pm DP$	Intervalo de Variação
Frutos Verdes	Controle puro	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	Tween	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	<i>Annona glabra</i> 20 ppm	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	<i>Annona glabra</i> 100 ppm	0,33 ± 0,58 a	0 - 1	1,00 ± 1,00 a	0 - 1
	<i>Annona glabra</i> 200 ppm	3,67 ± 1,53 b	2 - 5	4,00 ± 1,00 b	3 - 5
Frutos Maduros	Controle puro	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	Tween	0,33 ± 0,58 a	0 - 1	0,33 ± 0,58 a	0 - 1
	<i>Annona glabra</i> 20 ppm	0 ± 0 a	0 - 0	0,33 ± 0,58 a	0 - 1
	<i>Annona glabra</i> 100 ppm	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	<i>Annona glabra</i> 200 ppm	0,33 ± 0,58 a	0 - 1	0,33 ± 0,58 a	0 - 1

Sendo χ a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle e entre eles, quando aplicado o ANOVA e o pós-teste de comparação de múltiplas médias de Tukey (p -valor < 0,05). Cada tratamento contou com um N amostral de 30 larvas (L3).

Fonte: Próprio Autor

A mesma análise ao ser realizada nos extratos diclorometânicos, mostrou que para os frutos verdes, as concentrações de 100 ppm e 200 ppm, tanto nas primeiras 24 horas como nas 48 horas depois da aplicação, apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas com os grupos controle (Água destilada e Tween). As médias calculadas tiveram valores absolutos de mortalidade de 5,67 ± 3,22 (100 ppm) e 6,67 ± 2,08 (200 ppm) nas primeiras 24 horas. Já às 48 horas e com o encerramento das leituras os registros mostraram médias de mortalidade de 6,67 ± 2,52 (100 ppm) e 7,67 ± 2,52 para a concentração de 200 ppm. No caso dos extratos obtidos a partir dos frutos maduros, tanto nas 24 horas como nas 48 horas, foi apenas a concentração máxima (200 ppm) que apresentou valores absolutos de mortalidade que mostraram diferença estatística quando comparados aos grupos controles, Água destilada e Tween (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos diclorometânicos (CH₂Cl₂) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).

Grupos	Tratamentos	Mortalidade 24h		Mortalidade 48h	
		$\chi \pm DP$	Intervalo de Variação	$\chi \pm DP$	Intervalo de Variação
Frutos Verdes - CH ₂ Cl ₂	Controle puro	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	Tween	0,33 ± 0,58 a	0 - 1	0,66 ± 0,58 a	0 - 1
	<i>Annona glabra</i> 20 ppm	1,00 ± 1,73 a,b	0 - 3	1,67 ± 2,89 a,b	0 - 5
	<i>Annona glabra</i> 100 ppm	5,67 ± 3,22 b,c	2 - 8	6,67 ± 2,52 b	4 - 9
	<i>Annona glabra</i> 200 ppm	6,67 ± 2,08 c	5 - 9	7,67 ± 2,52 b	5 - 10
Frutos Maduros - CH ₂ Cl ₂	Controle puro	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	Tween	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	<i>Annona glabra</i> 20 ppm	0 ± 0 a	0 - 0	0 ± 0 a	0 - 0
	<i>Annona glabra</i> 100 ppm	1,00 ± 1,00 a	0 - 2	1,67 ± 2,10 a	0 - 4
	<i>Annona glabra</i> 200 ppm	4,33 ± 1,37 b	3 - 6	6,00 ± 0,00 b	6 - 6

Sendo χ a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle e entre eles, quando aplicado o ANOVA e o pós-teste de comparação de múltiplas médias de Tukey (p -valor < 0,05). Cada tratamento contou com um N amostral de 30 larvas (L3).

Fonte: Próprio Autor

Uma vez calculados os valores relativos em percentuais de mortalidade de *A. aegypti*, e construídos os gráficos em relação as concentrações testadas dos extratos hexânicos e diclorometânicos, a partir de frutos verdes e maduros, foi possível verificar que o efeito larvicida dos extratos hexânicos foi consideravelmente menor do que nos extratos diclorometânicos. Os menores valores de mortalidade correspondem ao extrato hexânico de *A glabra* elaborado a partir de frutos maduros que apenas atingiram 3,3% na maior concentração (200 ppm). No caso do extrato hexânico a partir de frutos verdes atingiu uma mortalidade de 36,7% nas primeiras 24 horas e 40% após 48 horas da aplicação (**Figura 5**).

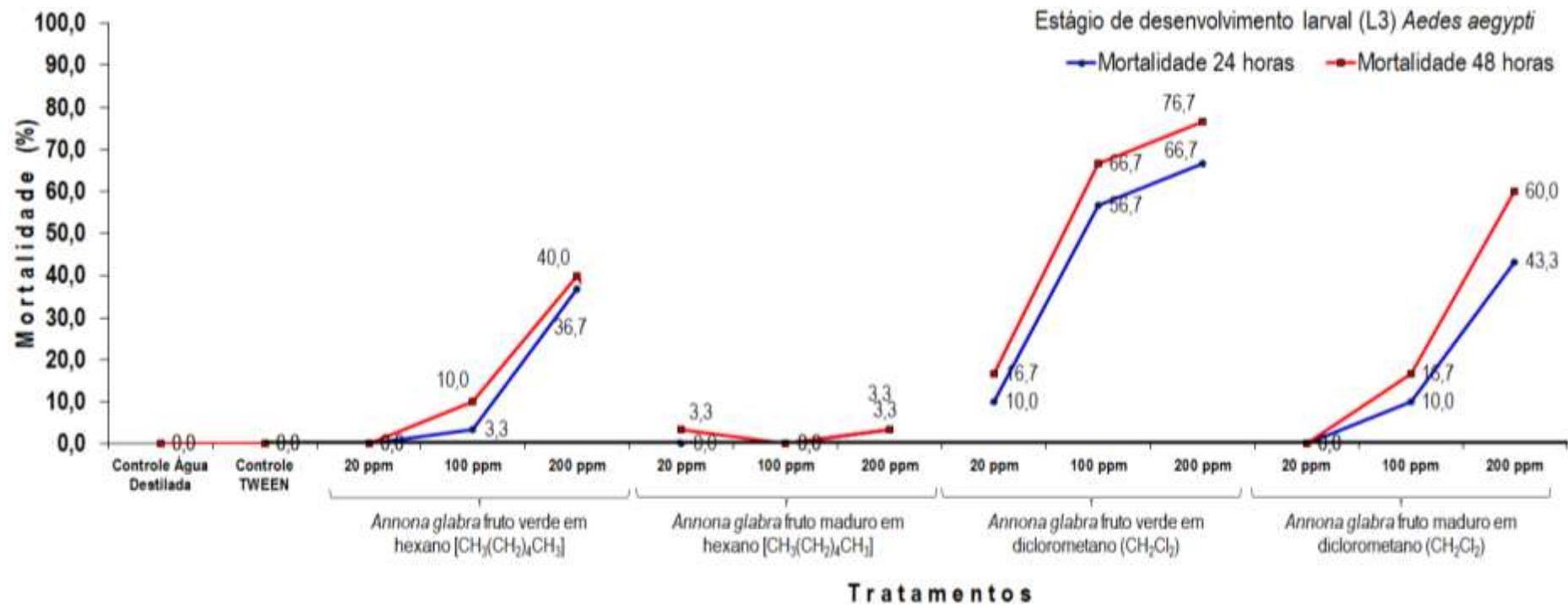
Ao observar na **Figura 5**, o comportamento dos extratos diclorometânicos se faz evidente que ambos os extratos possuem uma relação concentração/efeito positiva pois aumenta a mortalidade na medida que aumenta a concentração (de 20 ppm até 200 ppm). O extrato elaborado a partir de frutos verdes apresenta uma maior efetividade inclusive desde a concentração mais baixa (20 ppm) onde atinge 10% de mortalidade nas primeiras 24 horas e 16,7% após 48 horas da aplicação, chegando a atingir na maior concentração (200 ppm) 66,7% nas primeiras 24 horas e 76,7% após 48 horas da aplicação de tempo inicial zero (**Figura 5**).

O comportamento dos valores de mortalidade do extrato diclorometânico a partir de frutos maduros, também possui um efeito larvicida considerável ainda quando é menos efetivo do que o extrato com frutos verdes, já que na concentração mais baixa (20 ppm) não foi capaz de provocar a morte de nenhuma larva (0% nas primeiras 24 horas e mesmo valor nas 48 horas posteriores à aplicação), porém consegue atingir 43,3% de mortalidade às 24 horas e 60% após 48 horas da aplicação na maior concentração (200 ppm) (**Figura 5**).

A análise feita mediante o modelo de regressão Probit para descrever a relação concentração/mortalidade a partir das predições inversas permitiu determinar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) e corroborar os resultados até aqui mostrados. Foi possível verificar que no caso dos extratos hexânicos tanto para frutos verdes (CL₅₀ - 24h= 221,93 ppm; CL₅₀ - 48h= 218,62 ppm e CL₉₀ - 24h= 305,49 ppm; CL₉₀ - 48h= 326,02 ppm) quanto para frutos maduros (CL₅₀ - 24h= 246,99 ppm; CL₅₀ - 48h= 8422,65 ppm e CL₉₀ - 24h= 279,82 ppm; CL₉₀ - 48h= 13723,20 ppm), as concentrações letais calculadas ultrapassam consideravelmente o valor da concentração máxima testada (200 ppm), evidenciando que a atividade larvicida não é muito significativa para no caso de extratos usando hexano como solvente (**Tabela 313**).

Esta mesma análise feita com extratos diclorometânicos mostrou que, no caso do extrato elaborado a partir de frutos verdes de *A. glabra*, ambas as CL₅₀ (às 24h e 48h) estavam dentro da faixa de valores de concentrações testados, sendo 127,05 ppm e 107,54 ppm respectivamente. Já a predição dos valores de CL₉₀ segundo o modelo ajustados ultrapassaram levemente o valor da concentração máxima testada (200 ppm) resultando em 276,64 ppm para 24 horas e de 237,58 ppm para 48 horas. Os valores de concentrações letais no caso do extrato diclorometânico dos frutos maduros foram maiores ao seu valor equivalente do extrato de frutos verdes, sendo as CL₅₀ para 24 e 48 horas de 211,11 ppm e 178,86 ppm respectivamente e as CL₉₀ foram de 312,66 ppm para 24 horas e 270,17 ppm para 48 horas. Desta forma se fez evidente que os extratos diclorometânicos de frutos verdes têm uma eficácia levemente superior aos extratos maduros (**Tabela 313**).

Figura 5 – Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos diclorometânico (CH_2Cl_2) e etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).



Fonte: Próprio Autor

Tabela 3I – Concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ calculadas mediante análise Probit da espécie *Aedes aegypti* após o tratamento com os extratos hexânicos [CH₃(CH₂)₄CH₃] e diclorometânicos (CH₂Cl₂) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).

Tratamentos	Tempo	CL ₅₀ ppm	CL ₉₀ ppm	X ²	Graus de liberdade	p-valor
Extrato hexânico dos frutos verdes de <i>A. glabra</i>	24h	221,93	305,49	7,47	1	0,0063
	48h	218,62	326,02	6,83	1	0,0090
Extrato hexânico dos frutos maduros de <i>A.</i> <i>glabra</i>	24h	246,99	279,82	0,74	1	0,3899
	48h	8422,65	13723,20	0,0013	1	0,9711
Extrato diclorometânico dos frutos verdes de <i>A. glabra</i>	24h	127,05	276,64	6,57	1	0,0104
	48h	107,54	237,58	8,45	1	0,0037
Extrato diclorometânico dos frutos maduros de <i>A.</i> <i>glabra</i>	24h	211,11	312,66	7,68	1	0,0056
	48h	178,86	270,17	11,27	1	0,0008

X²: Qui-quadrado; p-valor<0,05.

Fonte: Próprio Autor

A comparação dos valores de mortalidade de 24 e 48 horas de exposição das larvas aos extratos testados no ensaio preliminar não mostrou diferenças significativas. Foi usado o teste de Wilcoxon para os extratos hexânico frutos verdes (W=3; p= 0,5000); hexânico frutos maduros (W=1; >0,9999) e diclorometânico frutos maduros (W=3; p=0,5000), enquanto para o extrato diclorometânico frutos verdes (t=2,327 df=4; p=0,0805) foi usado o test t pareado. Esses resultados sugerem que o tempo não é uma variável determinante no efeito larvicida dos extratos ensaiados para as concentrações estudadas.

Os resultados até aqui apresentados com relação a: efetividade das concentrações testadas quando comparadas com os grupos controle, as análises de percentual de mortalidade e a determinação das CL₅₀ e CL₉₀ feitas sobre os extratos hexânicos dos frutos (verdes e maduros) e diclorometânicos dos frutos (verdes e maduros) de *A. glabra* sustentaram um novo delineamento experimental para aprofundar o estudo do efeito larvicida da planta em questão. Sendo assim foram

definidas novas concentrações a serem testadas variando de 40 a 320 ppm seguindo uma progressão geométrica crescente. Adicionalmente se propõe a testagem de extratos etanólicos elaborados também a partir dos frutos verdes e maduros de *A. glabra* seguindo uma lógica de aumento de polaridade no processo de extração (Hexano < Diclorometano < Etanol). Além disso, será avaliada a efetividade dos extratos (efeito residual) ao longo de 240 horas com troca das larvas a cada 48 horas. Os resultados deste novo desenho experimental se apresentam no tópico a seguir.

5.3 ENSAIO EXPERIMENTAL – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH_2Cl_2) E ETANÓLICO ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) DE *Annona glabra* (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE *Aedes aegypti*.

No presente estudo experimental foi evidenciado novamente que o tratamento com todos os extratos não teve um efeito agudo imediato, ou seja, não apresentaram atividade larvicida logo após o momento da aplicação (tempo zero horas), sendo assim continua-se assumindo valores de mortalidade absolutos e relativos com valor zero (0) para o tempo inicial (0).

A análise estatística realizada com os dados coletados durante os experimentos no caso dos tratamentos com extratos diclorometânicos com frutos verdes e maduros para as novas dosagens 40, 80, 160 e 320 ppm se comportou de forma coerente aos resultados obtidos no teste preliminar. Sendo que no extrato diclorometânico com frutos verdes tanto nas 24 horas como nas 48 horas todos os tratamentos testados apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com os grupos controle (Água destilada e Tween), e inclusive entre eles de forma crescente, atingindo as maiores médias de mortalidade absoluta de $7,20 \pm 1,30$ nas primeiras 24 horas e $9,60 \pm 0,55$ após 48 horas da aplicação. Os valores médios de mortalidade para este extrato foram: 40 ppm - $2,20 \pm 1,30$; 80 ppm - $3,80 \pm 0,84$ e 160 ppm $6,00 \pm 0,71$ e para as primeiras 24 horas é de: 40 ppm - $5,40 \pm 0,55$; 80 ppm - $6,80 \pm 1,48$ e 160 ppm - $8,60 \pm 0,55$, em ambos os casos de forma crescente (**Tabela 4114**).

O extrato diclorometânico com frutos maduros mostrou uma eficácia mais discreta, de forma que nas primeiras 24 horas apenas apresentou diferença estatística na maior concentração quando comparado com os grupos controles, e com as outras

concentrações atingindo um valor de mortalidade de $3,40 \pm 2,10$. Já transcorridas as 48 horas, este mesmo extrato mostrou diferença estatística nas concentrações 160 ppm (média de mortalidade igual a $8,60 \pm 0,55$) e 320 ppm (média de mortalidade igual a $6,20 \pm 1,79$). Os tratamentos 40 e 80 ppm mostraram valores de média de mortalidade mais discretos sendo $1,60 \pm 1,14$ e $2,80 \pm 1,64$, respectivamente (**Tabela 4II4**).

Tabela 4II – Atividade larvicida em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com o extrato diclorometânico (CH_2Cl_2) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).

Grupos	Tratamentos	Mortalidade 24h		Mortalidade 48h	
		$\chi \pm \text{DP}$	Intervalo de Variação	$\chi \pm \text{DP}$	Intervalo de Variação
Frutos Verdes Diclorometânico (CH_2Cl_2)	Controle H ₂ O Destilada	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	Controle TWEEN	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	<i>A. glabra</i> 40 ppm	$2,20 \pm 1,30$ b	0 – 3	$5,40 \pm 0,55$ b	5 – 6
	<i>A. glabra</i> 80 ppm	$3,80 \pm 0,84$ b	3 – 5	$6,80 \pm 1,48$ c	5 – 9
	<i>A. glabra</i> 160 ppm	$6,00 \pm 0,71$ c	5 – 7	$8,60 \pm 0,55$ d	8 – 9
	<i>A. glabra</i> 320 ppm	$7,20 \pm 1,30$ c	6 – 9	$9,60 \pm 0,55$ d	9 – 10
Frutos Maduros Diclorometânico (CH_2Cl_2)	Controle H ₂ O Destilada	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	Controle TWEEN	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	<i>A. glabra</i> 40 ppm	$0,60 \pm 0,55$ a	0 – 1	$1,60 \pm 1,14$ a	0 – 3
	<i>A. glabra</i> 80 ppm	$0,40 \pm 0,55$ a	0 – 1	$2,80 \pm 1,64$ a,b	1 – 4
	<i>A. glabra</i> 160 ppm	$0,20 \pm 0,45$ a	0 – 1	$4,00 \pm 1,23$ b,c	2 – 5
	<i>A. glabra</i> 320 ppm	$3,40 \pm 2,10$ b	0 – 5	$6,20 \pm 1,79$ c	4 – 8

Sendo χ a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle e entre eles, quando aplicado o ANOVA e o pós-teste de comparação de múltiplas médias de Tukey (p -valor < 0,05). Cada tratamento contou com um N amostral de 50 larvas (L3).

Fonte: Próprio Autor

A análise dos dados obtidos de atividade larvicida contra a espécie *A. aegypti* envolvendo os extratos etanólicos de frutos verdes e maduros de *A. glabra*, mostrou que, no caso do extrato com frutos verdes não se evidenciaram diferenças estatísticas entre os tratamentos e os grupos controle nem entre eles. Já o extrato com frutos maduros apresentou diferença estatística apenas na maior concentração 320 ppm, sendo uma média de $1,60 \pm 1,14$ nas primeiras 24 horas e $2,20 \pm 1,48$ após 48 horas

da aplicação do extrato. Ainda sem diferenças significativas, as concentrações de 80 e 160 ppm apresentaram médias de mortalidade que atingiram os valores de $1,00 \pm 1,00$ e $1,40 \pm 1,14$ que não apresentam diferenças com a maior concentração e, também não com os grupos controles (Água destilada e Metanol) (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Atividade larvicida em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com o extrato etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).

Grupos	Tratamentos	Mortalidade 24h		Mortalidade 48h	
		$\chi \pm \text{DP}$	Intervalo de Variação	$\chi \pm \text{DP}$	Intervalo de Variação
Frutos Verdes Etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	Controle H ₂ O Destilada	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	Controle Metanol	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	<i>A. glabra</i> 40 ppm	$0,40 \pm 0,89$ a	0 – 2	$0,40 \pm 0,89$ a	0 – 2
	<i>A. glabra</i> 80 ppm	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	<i>A. glabra</i> 160 ppm	$0,20 \pm 0,45$ a	0 – 1	$0,40 \pm 0,55$ a	0 – 1
	<i>A. glabra</i> 320 ppm	$0,40 \pm 0,89$ a	0 – 2	$0,60 \pm 1,34$ a	0 – 3
Frutos Maduros Etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	Controle H ₂ O Destilada	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	Controle Metanol	0 ± 0 a	0 – 0	0 ± 0 a	0 – 0
	<i>A. glabra</i> 40 ppm	$0,60 \pm 0,89$ a,b	0 – 2	$0,80 \pm 1,30$ a,b	0 – 3
	<i>A. glabra</i> 80 ppm	$0,80 \pm 0,84$ a,b	0 – 2	$1,00 \pm 1,00$ a,b	0 – 2
	<i>A. glabra</i> 160 ppm	$0,80 \pm 0,84$ a,b	0 – 2	$1,40 \pm 1,14$ a,b	0 – 3
	<i>A. glabra</i> 320 ppm	$1,60 \pm 1,14$ b	0 – 3	$2,20 \pm 1,48$ b	0 – 4

Sendo χ a média, DP o desvio padrão. Letras distintas indicam médias diferentes entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle e entre eles, quando aplicado o ANOVA e o pós-teste de comparação de múltiplas médias de Tukey (p -valor < 0,05). Cada tratamento contou com um N amostral de 50 larvas (L3).

Fonte: Próprio Autor

Os dados levantados através dos ensaios com os extratos diclorometânico e etanólico a partir dos frutos de *A. glabra* (verdes e maduros), foram analisados e trabalhados (**Figura 6**). As porcentagens de mortalidade para os grupos tratados com os extratos diclorometânicos dos frutos (verdes e maduros) foram os maiores dentre todos os testes realizados neste trabalho, destaque para o produto da extração do fruto verde que apresentou um padrão linear crescente conforme as concentrações analisadas aumentavam, demonstrando uma relação concentração/efeito (larvicida) sobre os imaturos de *A. aegypti*. As duas maiores concentrações (160 e 320 ppm –

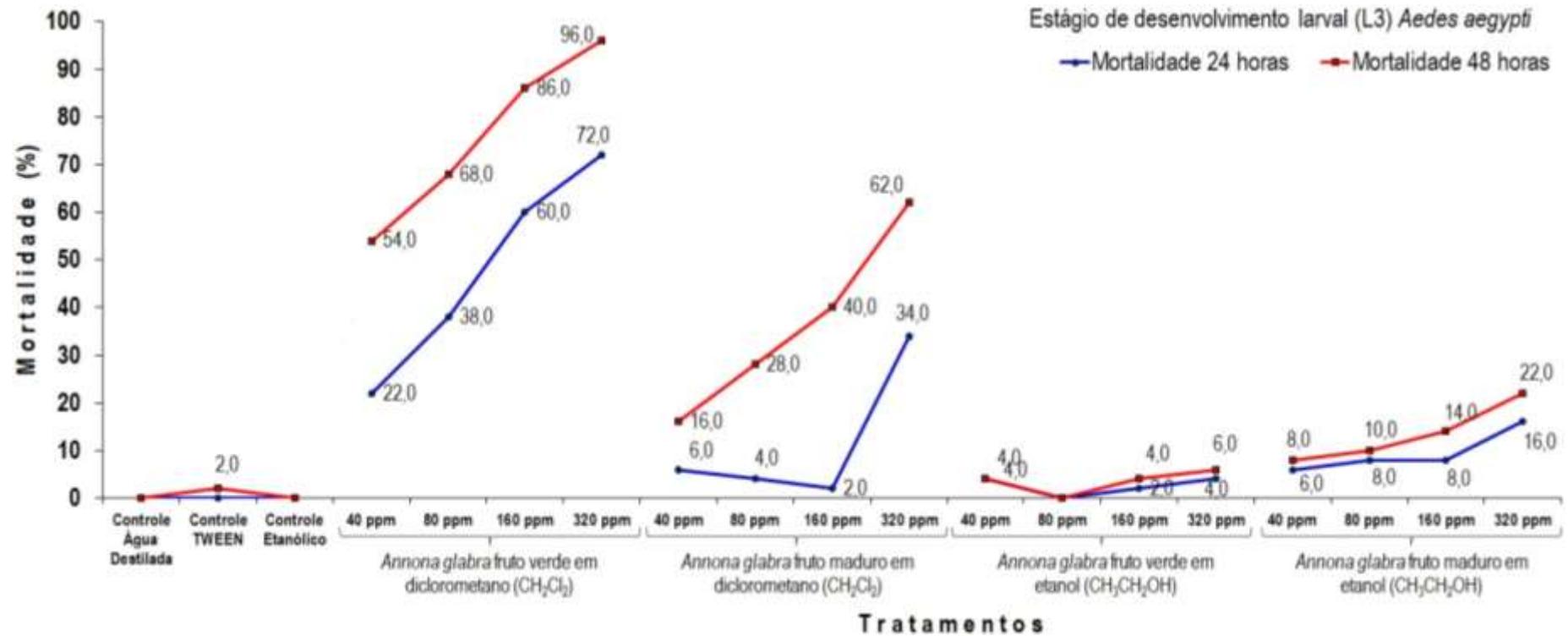
24h) mataram 60 e 72% das larvas testadas e essas concentrações mantiveram o comportamento no período de 48 horas após a aplicação (160 ppm – 86% e 320 ppm – 96%).

Para os testes com extrato do fruto maduro não foi observada uma relação concentração/efeito no período de 24 horas, contudo o destaque ficou por conta da maior concentração (320 ppm) registrando a porcentagem de 34%. Já os valores obtidos para as 48 horas, mostraram nitidamente um aumento gradativo relacionado a crescente das concentrações (40 ppm – 16,0%; 80 ppm – 28,0%; 160 ppm – 40,0% e 320 ppm – 62%) (**Figura 6**).

Ao analisar a relação concentração/efeito dos extratos etanólicos foi possível verificar que no caso do extrato elaborado com frutos verdes, na concentração inicial 40 ppm tanto nas primeiras 24 horas como às 48 horas após a aplicação, o percentual de mortalidade foi de 4,0% e houve uma caída a zero mortes na concentração de 80 ppm interrompendo uma possível relação da variável dependente. Os valores máximos de mortalidade atingidos pelo extrato etanólico com frutos verdes foram de 4,0% nas primeiras 24 horas e de 6,0% após 48 horas da aplicação na maior concentração 320 ppm (**Figura 6**).

Já o extrato etanólico obtido a partir de frutos maduros mostrou resultados um pouco mais eficazes, apresentando uma relação concentração/efeito dependente positiva. No caso dos registros feitos às 24 horas o percentual de mortalidade inicial na menor concentração (40 ppm) foi de 4,0%, com uma constância entre as concentrações de 80 ppm e 160 ppm com valor de mortalidade igual a 8,0% e finalmente atinge o valor de 16% na maior concentração (320 ppm). O comportamento crescente mais regular se observou nos registros após 48 horas da aplicação com mortalidades cresceram desde 8,0% (40 ppm) < 10,0% (80 ppm) < 14,0% (160 ppm) até atingir o valor máximo de 22,0% na maior concentração testada (320 ppm) (**Figura 6**).

Figura 6 – Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, após o tratamento com os extratos diclorometânico (CH_2Cl_2) e etanólico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).



Fonte: Próprio Autor

As concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) tanto para os extratos diclorometânicos (frutos verdes e maduros) e etanólicos (frutos verdes e maduros) foram determinadas mediante análise de regressão de Probit e se apresentam na **Tabela 6**. O comportamento das concentrações calculadas foi coerente com os resultados até aqui apresentados, pode se observar que o extrato diclorometânico de frutos verdes é o que apresenta os menores valores de concentração letal (maior efeito larvicida), sendo as CL_{50} igual a 160,61 ppm e 10,13 ppm nas 24 e 48 horas respectivamente e as CL_{90} igual a 445,39 ppm e 216,52 ppm para 24 e 48 horas respectivamente, portanto a maior eficácia foi alcançada após as 48 horas da aplicação do extrato.

Os extratos diclorometânicos de frutos maduros tiveram valores de CL_{50} igual a 420,59 ppm e 237,70 ppm nas 24 e 48 horas respectivamente e as CL_{90} igual a 671,04 ppm e 538,57 ppm para 24 e 48 respectivamente, sendo valores superiores aos determinados para o extrato diclorometânico verde, e assim mostrando que o efeito larvicida é menos eficaz (**Tabela 6**).

Quando calculadas as concentrações letais para os extratos etanólicos se observou que foram menores para o extrato com frutos maduros sendo as CL_{50} igual a 851,34 ppm e 666,78 ppm para às 24 e 48 horas respectivamente e as CL_{90} igual a 1522,81 ppm e 1250,87 ppm para às 24 e 48 horas respectivamente. Já no caso do extrato etanólico produzido a partir de frutos verdes os valores de CL_{50} foram consideravelmente maiores, sendo de 2362,62 ppm e 1292,24 ppm nas 24 e 48 horas respectivamente, e as CL_{90} foram determinadas nos valores 3802,60 ppm e 2087,79 ppm nas 24 e 48 horas respectivamente. Em ambos os casos (etanólico com frutos verdes e com frutos maduros) as concentrações letais a 48 horas tiveram uma redução nos valores das concentrações letais (**Tabela 6**).

Na comparação das mortalidades após 24 e 48 horas de tratamento para o ensaio experimental houve diferenças significativas entre as mortalidades de 24 e 48 horas para os extratos diclorometânico de frutos verdes ($t=2,901$; $df=6$; $p=0,0273$) e etanólico de frutos maduros ($t=2,714$; $df=6$; $p = 0,0349$). A diferença dos resultados obtidos para o diclorometânico frutos verdes no ensaio preliminar e no experimental poderiam dever-se ao estudo de concentrações mais elevadas no teste experimental, dada a dependência que mostrou a mortalidade da concentração evidenciada nos resultados do Qui-quadrado.

Tabela 6 – Concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ calculadas mediante análise Probit da espécie *Aedes aegypti* após o tratamento com os extratos diclorometânicos (CH₂Cl₂) e etanólicos (CH₃CH₂OH) dos frutos verdes e maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae).

Tratamentos	Tempo	CL ₅₀ ppm	CL ₉₀ ppm	χ ²	Graus de liberdade	p-valor
Extrato diclorometânico de frutos verdes de <i>A. glabra</i>	24 h	160,61	445,39	5,44	1	0,0197
	48 h	10,13	216,52	6,09	1	0,0136
Extrato diclorometânico de frutos maduros de <i>A. glabra</i>	24 h	420,59	671,04	4,59	1	0,0321
	48 h	237,70	538,57	4,91	1	0,0268
Extrato etanólico de frutos verdes de <i>A. glabra</i>	24 h	2362,62	3802,60	0,056	1	0,8130
	48 h	1292,24	2087,79	0,23	1	0,6313
Extrato etanólico de frutos maduros de <i>A. glabra</i>	24 h	851,34	1522,81	0,59	1	0,4404
	48 h	666,78	1250,87	0,94	1	0,3321

χ²: Qui-quadrado; p-valor<0,05.

Fonte: Próprio Autor

Chegado a este ponto, depois de ter avaliado o efeito das diferentes concentrações testadas quando comparadas com os grupos controle, as análises de percentual de mortalidade e a determinação das concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ feitas sobre os extratos hexânicos dos frutos (verdes e maduros) e etanólicos dos frutos (verdes e maduros) de *A. glabra* pode-se dizer, sobre o sustento experimental que: o extrato diclorometânico mostrou ter um ótimo efeito larvicida sendo o melhor de entre todos os extratos testados, seguido pelo extrato diclorometânico com frutos maduros. No caso dos extratos etanólicos não mostraram um efeito larvicida promissor.

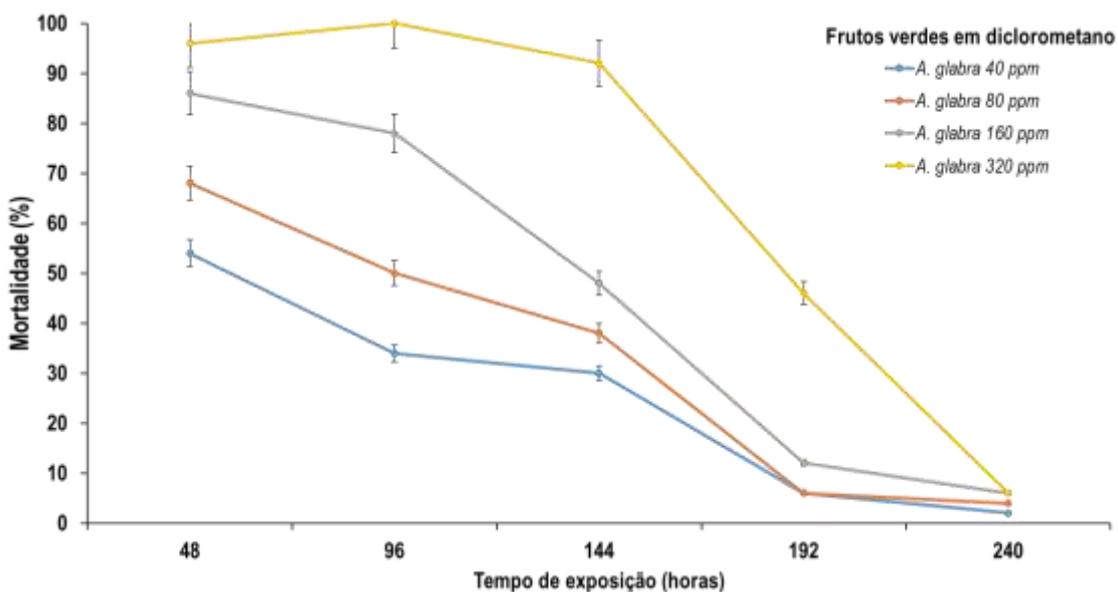
Desta forma, sugere-se que o metabólito ou os metabólitos com atividade larvicida são extraídos em maior concentração com diclorometano, solvente de “polaridade intermediária” se considera por exemplo a escala crescente de polaridade: Pentano < **Hexano** < Heptano < Triclorotrifluoretano < Tolueno < Clorofórmio <

Diclorometano < Éter dietílico < Acetato de etila < Metil t-butil éter < Dioxano < Acetonitrila < Acetona < Tetrahidrofurano < 2-propanol < **Etanol** < Água destilada.

5.4 ENSAIO EXPERIMENTAL – AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH_2Cl_2) E ETANÓLICO ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) DE *Annona glabra* (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE *Aedes aegypti*

Na **Figura 7**, era de se esperar que as maiores concentrações apresentassem taxas de mortalidades expressivas e com o passar do tempo esse ritmo fosse reduzindo. É nítido que tal ação ocorreu em todas as concentrações do início ao final do experimento, porém foi observada uma exceção no tratamento com 320 ppm onde houve certa constância no ritmo de mortalidade do 2° ao 6° dia (>90%), vindo a reduzir de forma significativa no 8° (50%) e 10° (13,04%) dias de experimento. Ressalta-se que todas as concentrações ultrapassaram 50% de mortalidade da população tratada até o 2° dia.

Figura 7 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato diclorometânico dos frutos verdes de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas.

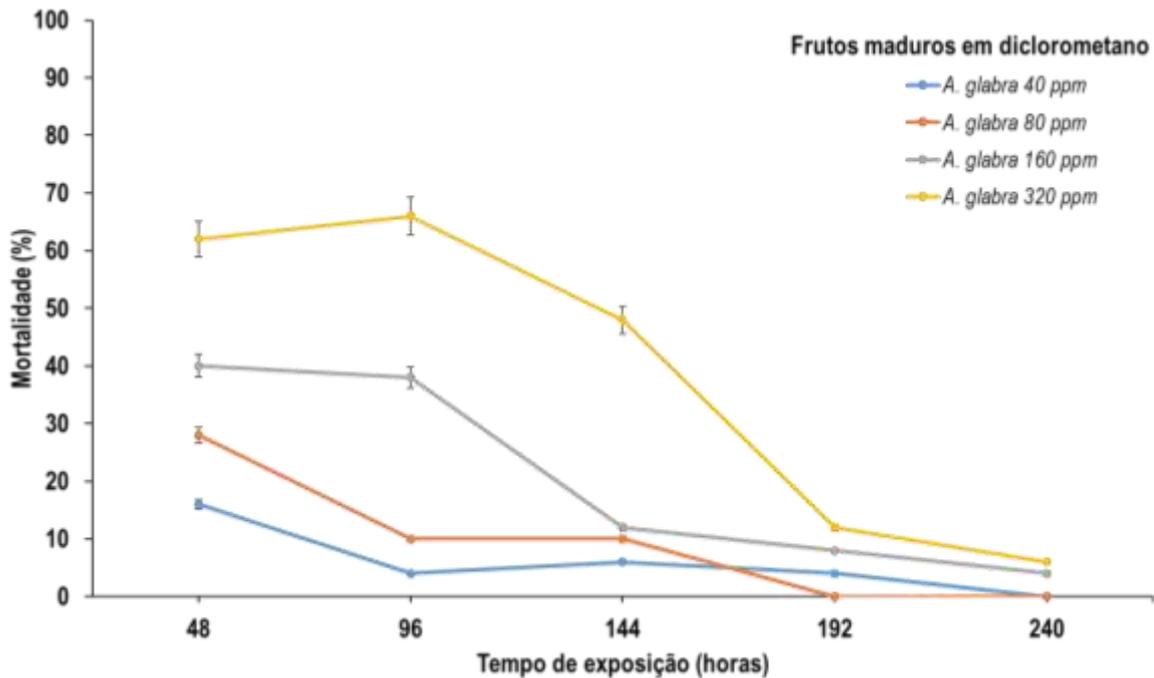


Fonte: Próprio Autor

A ANOVA realizada para o ensaio residual do extrato diclorometânico produzido com frutos verdes mostrou diferenças estatísticas significativas tanto para a concentração quanto para o tempo ($p=0,0001$ para ambos). O teste de Tukey para as comparações múltiplas mostrou apenas diferença na concentração de 40 ppm para 48 horas quando comparado com 192 horas ($p=0,0178$), repetindo-se esse resultado em todas as concentrações (p-valor 80 ppm = 0,0037; p-valor 160 ppm = 0,0011; p-valor 320 ppm = 0,0141). A comparação de 98 horas contra 192 horas mostrou diferenças estatísticas para as concentrações de 80 ppm (p-valor = 0,0285), 160 ppm (p-valor = 0,0024) e 320 ppm (p-valor = 0,0089). Esta última concentração mostrou diferença para 144 vs 192 horas (p-valor = 0,0225).

Ao analisar a **Figura 8**, foi possível notar que houve uma relação de concentração/efeito no extrato diclorometânico dos frutos maduros de *A. glabra* até o período do 8º dia e a interrupção deste padrão apenas na concentração 80 ppm (0%), cuja eficácia cessou e veio a ser seguida pela dosagem de 40 ppm apenas no 10º dia de observação e que já apresentava taxas de mortalidade inferiores a 10% desde o 4º dia. As concentrações analisadas apresentaram porcentagens de mortalidade inferiores a 70%.

Figura 8 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato diclorometânico dos frutos maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas.



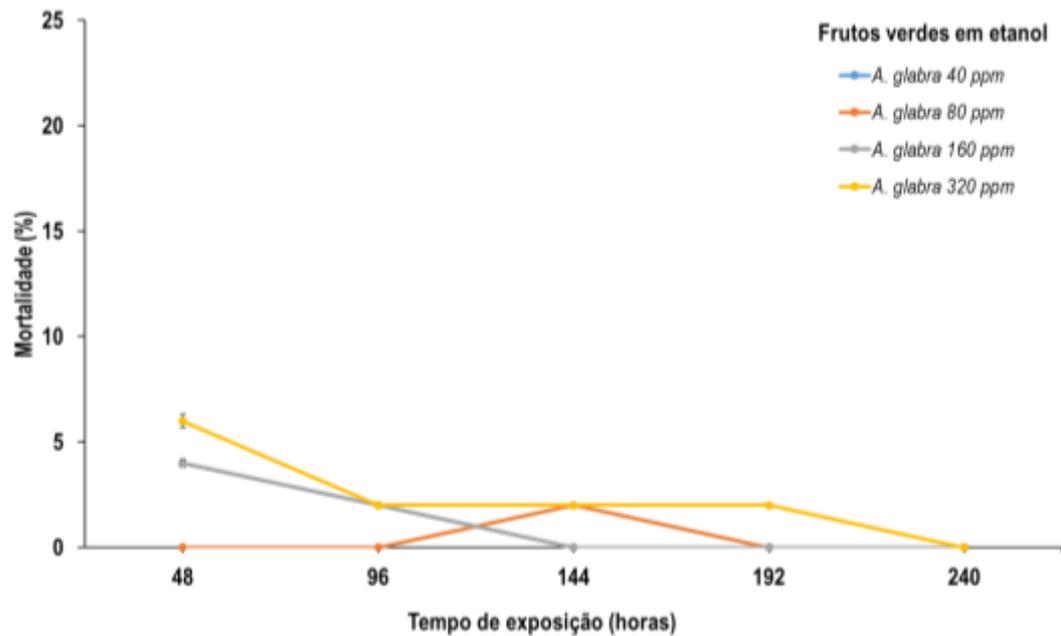
Fonte: Próprio Autor

A ANOVA realizada ao extrato diclorometânico de frutos maduros mostrou que existem diferenças estatísticas significativas entre as diferentes concentrações estudadas ($p=0,0051$) e o tempo ($p= 0,0030$) de permanência da atividade larvicida. As comparações múltiplas evidenciaram diferenças entre 48 horas quando comparado com as 192 horas ($p=0,0189$), 48 horas *versus* 240 horas ($p=0,0090$), assim como, entre 96 horas e 240 horas ($p=0,0395$).

Os resultados encontrados nos testes de mortalidade realizados com os extratos etanólicos dos frutos verdes (**Figura 9**) foram os menores dentre todos, pois os percentuais variaram entre 0 e 6% (80 e 320 ppm, respectivamente). Chama a atenção o fato da não ocorrência do efeito concentração/resposta registrada nos outros testes, demonstrando que este extrato não apresenta relação de proporcionalidade, exemplo disto são os resultados encontrados nas concentrações de 40 e 160 ppm, ao longo do tempo, que foram exatamente os mesmos. A

concentração de 80 ppm apresentou efeito nulo ao longo de todo o experimento, tendo sido registrada uma única morte (2%) no 6º dia. A única concentração que apresentou alguma mortalidade ao longo dos dias foi 320 ppm, chegando a registrar até o 8º dia.

Figura 9 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato etanólico dos frutos verdes de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas.



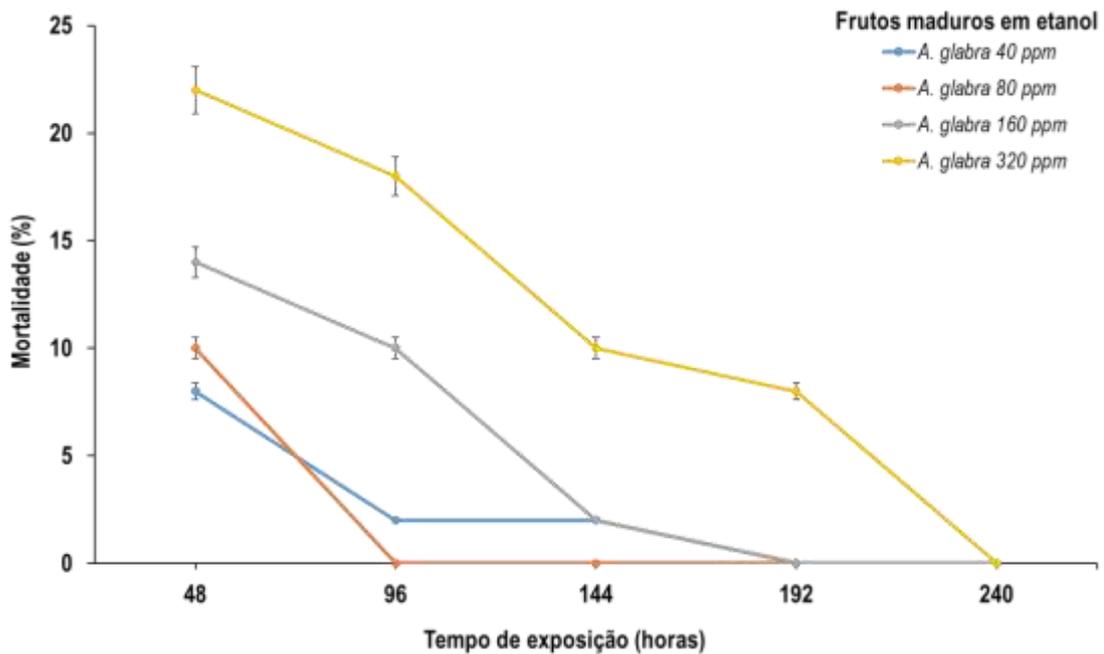
Fonte: Próprio Autor

A análise de variâncias para o extrato etanólico apenas evidenciou diferenças no comportamento dos valores de mortalidades das larvas no tempo ($p=0,0168$), essas divergências se apresentaram unicamente para a comparação das mortalidades 48 horas, com 96 horas e 240 horas, com valores de p iguais a 0,0354 e 0,0134 respectivamente.

Quando analisado o efeito do extrato etanólico, desta vez, provindo de frutos maduros (**Figura 10**), foi notório que os resultados não demonstraram ação larvicida significativa para o solvente com esta natureza química que tende a maior polaridade. Os percentuais variaram entre si, contudo, foi possível verificar uma relação de concentração/efeito até o 4º dia de experimento (96 horas). Porém, vale ressaltar que o ritmo de mortalidade foi reduzindo de forma notória, cessando na concentração 80 ppm no 4º dia e para 40 e 160 ppm no 8º dia após ter se iniciado o experimento. A

concentração de 320 ppm apresentou um decréscimo constante no ritmo de mortalidade ao longo do tempo.

Figura 10 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), instar L3, em contato com o extrato etanólico dos frutos maduros de *Annona glabra* (Magnoliales: Annonaceae) nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 ppm ao longo do tempo (240 horas) com observações em intervalos de 48 horas.



Fonte: Próprio Autor

Ao realizar a ANOVA do extrato etanólico maduro, foi possível verificar que houve um comportamento similar ao extrato diclorometânico maduro, mostrando diferenças significativas nas mortalidades tanto para o tempo ($p=0,0007$) quanto para a concentração ($p=0,0021$). O teste de comparações de múltiplas médias de Turkey mostrou diferenças para quatro comparações dos tempos (48 horas *versus* 144 horas, $p=0,0075$; 48 horas *versus* 192 horas, $p=0,0026$; 48 horas *versus* 240 horas, $p=0,0007$; e 96 horas *versus* 240h, $p=0,0471$).

A análise geral dos resultados das análises de variância (ANOVA) mostrou que os extratos diclorometano verde e maduro e o etanólico maduro apresentaram diferenças estatisticamente significativas para a concentração e para o tempo, enquanto o etanólico verde mostrou apenas, diferenças para o tempo. De acordo com o teste de Tukey a única comparação que evidenciou diferenças para os quatro

extratos estudados foi para o tempo 48 horas quando comparado com o tempo de 192 horas.

6 DISCUSSÃO

6.1 EFEITO DOS EXTRATOS HEXÂNICO [CH₃(CH₂)₄CH₃], DICLOROMETÂNICO (CH₂Cl₂) E ETANÓLICO (CH₃CH₂OH) DE *Annona glabra* (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE *Aedes aegypti*

Os compostos derivados de plantas pertencentes aos membros da família Annonaceae, mostram atividade significativa contra larvas de dipteros do gênero *Culex* (MIKOLAJCZAK; MCLAUGHLIN; RUPPRECHT, 1988; MEHRA; HIRADHAR, 2000; GEORGE; VINCENT, 2005). As partes aéreas (galhos) da espécie *A. glabra* são fontes de substâncias com função inseticida (OHSAWA *et al.* 1991; PADMAJA *et al.* 1995; ZENG *et al.* 1996; CHANG *et al.* 2000; MENDONÇA *et al.* 2005) e ação larvicida sobre a espécie *A. aegypti* (MENDONÇA *et al.* 2005; AMARASINGHE *et al.* 2020). Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a espécie a fim de entender melhor a composição química e aplicabilidade na área da saúde e no controle entomológico. Os resultados encontrados corroboram com outros autores que abordaram a efetividade inseticida da espécie.

MENDONÇA *et al.* (2005) testaram uma série de extratos e óleos de plantas medicinais brasileiras com o objetivo de verificar as atividades larvicidas sobre a espécie *A. aegypti*, utilizando a metodologia preconizada pela OMS (WHO, 1996). A fração etanólica de *A. glabra* foi a mais ativa, preparado em aparelho Soxhlet a partir do caule, apresentando uma CL₅₀ de 27 ppm. Este estudo corrobora com o trabalho aqui apresentado, demonstrando a atividade larvicida da planta. Todavia, o melhor resultado não foi obtido com o extrato etanólico, mas sim com o diclorometano (frutos verdes) o que diferencia os estudos, sendo as CL₅₀ igual a 160,61 ppm e 10,13 ppm nas 24 e 48 horas respectivamente.

Em estudo realizado por KABIR (2010), foi analisado o efeito de uma fração contendo alcaloides a partir da casca do caule da planta da espécie *Artabotrys odoratissimus* (Annonaceae), em seis concentrações (10 a 320 ppm) sobre larvas (L3) de *C. quinquefasciatus*. A atividade larvicida no período de 24 horas registrou uma CL₅₀ de 99,13 ppm. Os resultados apresentados pelo autor corroboram com os

achados no presente trabalho, indicando que outros membros da família Annonaceae apresentam propriedades larvicidas. O extrato diclorometânico (frutos verdes e maduros) de *A. glabra* registrou as CL₅₀ de 160,61 ppm e 420,59 ppm, respectivamente. Segundo DE CÁSSIA SEFFRIN *et al.* (2010), as acetogeninas encontradas nos membros da família Annonaceae seriam as responsáveis por provocar toxicidade em diferentes membros da classe insecta.

ACIOLE *et al.* (2011), avaliaram o efeito inseticida dos óleos essenciais de três diferentes espécies de plantas pertencente a família Annonaceae (*Guatteria hispida*, *Guatteria blepharophylla* e *Guatteria friesiana*) contra larvas *A. aegypti* (L3), em condições de laboratório. Os óleos essenciais foram extraídos a partir das folhas das plantas por hidrodestilação. As larvas de *A. aegypti* foram expostas a sete diferentes concentrações (12; 15; 20; 35; 40; 60 e 85 ppm) e a mortalidade larval foi aferida 24 horas após iniciado os testes. A maior taxa registrada para CL₅₀ foi para *G. hispida* e a menor para *G. Friesiana*, sendo os valores: *G. hispida* – 85,74 ppm; *G. blepharophylla* – 58,72 ppm; e *G. friesiana* – 52,6 ppm. Novamente os membros da família Annonaceae demonstram sua excelência e aplicabilidade no controle larvicida, reforçando os dados levantados por este trabalho com *A. glabra*. Os produtos derivados do processo extrativo com a fração etanólica não demonstraram ser os mais atraentes, porém o destaque ficou a cargo dos derivados do extrato diclorometânico dos frutos verdes com CL₅₀ de 160,61 ppm, seguido pelo extrato diclorometânico dos frutos maduros com CL₅₀ de 420,59 ppm, ambos no período de 24 horas.

6.2 EFEITO DA AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS DICLOROMETÂNICO (CH₂Cl₂) E ETANÓLICO (CH₃CH₂OH) DE *Annona glabra* (FRUTO VERDE E MADURO) SOBRE A MORTALIDADE DAS LARVAS (L3) DE *Aedes aegypti*

GUARIDO (2010) abordou em seu estudo o efeito residual considerando a CL₉₉, apenas do extrato diclorometânico das sementes da planta *A. foetida* sobre as larvas de *A. aegypti*. O efeito residual do extrato para tal concentração registrou o valor de 47,22 ppm (24 horas). A eficácia da CL₉₉ foi de 100% de mortalidade das larvas até o 12º dia, chegando <70% após o 18º dia e a partir do 25º dia não foi mais observada mortalidade. Em virtude da quantidade de material obtido dos outros extratos não foi possível a realização deste experimento com as outras frações. O

extrato de *A. foetida* demonstrou ser eficaz no controle de *A. aegypti* e o mesmo é visto com *A. glabra* registrando um percentual de mortalidade para a mesma espécie de mosquito. A maior concentração (320 ppm) do extrato de diclorometânico dos frutos verdes de *A. glabra*, apresentou ritmo de mortalidade superior aos 90% no 2º, 4º e 6º dia de experimento, reduzindo no 8º para 50% e no 10º para 13,04%, com observações realizadas a cada 48 horas.

De acordo com o próprio GUARIDO (2010), é evidente a dificuldade para encontrar na literatura estudos que se dediquem a abordar o período de atividade larvívica com produtos de origem vegetal e este cenário aparentemente não demonstra ter mudado, grande parte dos artigos abordam apenas a atividade e a composição fitoquímica dos compostos. O conhecimento mais aprofundado acerca do tempo de atividade inseticida dos extratos é fundamental, tendo em vista a possibilidade no futuro da elaboração de um produto viável e aplicável em maior escala.

Em seu estudo PROPHIRO *et al.* (2012), verificaram o efeito residual dos óleos de duas plantas nas seguintes concentrações: *Carapa guianensis* – 1400 ppm e *Copaifera* sp. - 150 ppm, ambas contra larvas (L3 e L4 - jovens) de *A. aegypti*. A espécie *C. guianensis* manteve a taxa de mortalidade em 100% até o 12º dia de experimento e quando chegou no 32º dia não foram mais observadas larvas mortas. Já para *Copaifera* sp. verificou-se 100% de letalidade até o 4º dia e a partir de então, se observou uma queda contínua e abrupta nos dias seguintes chegando a zerar a taxa de mortalidade no 22º dia.

A ação residual ou efeito residual é a capacidade que uma substância tem de se manter ativa, em determinada dosagem e apresentando atividade larvívica ao longo de um período de tempo (PONTES *et al.* 2005). Os testes com os produtos derivados da extração com diclorometano frutos verdes de *A. glabra* na concentração de 320 ppm matou mais de 90% das larvas até o 6º dia de experimento e no 8º a taxa de letalidade reduziu para 50%; a mesma concentração com frutos maduros registrou até o 4º dia valores próximos de 70% de mortalidade. Estes resultados demonstraram que tais produtos tiveram êxito tendo em mente os pontos levantados por PONTES *et al.* (2005) e sendo corroborado pelo estudo de PROPHIRO *et al.* (2012).

7 CONCLUSÃO

1. As porcentagens de mortalidade com os maiores valores registrados foram para ambos os extratos de frutos (verdes e maduros) da espécie *A. glabra* com diclorometânico (CH_2Cl_2), evidenciando neste caso que a planta possui atividade larvicida e promissora aplicabilidade, indo ao encontro de outros trabalhos na literatura. A extração do fruto verde (CH_2Cl_2) apresentou um padrão linear crescente conforme as concentrações analisadas aumentavam, demonstrando uma relação concentração/efeito (larvicida) sobre *A. aegypti*. Já o efeito dos extratos etanólicos ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) provindo de frutos (verdes e maduros) não demonstraram ação larvicida significativa para o solvente com esta natureza química que tende a maior polaridade.
2. A ação residual com extrato dos frutos verdes (CH_2Cl_2) nas maiores concentrações apresentaram taxas de mortalidade expressivas e com o passar do tempo esse ritmo foi reduzindo. Isto ocorreu em todas as concentrações do início ao fim do experimento, porém a única exceção foi com 320 ppm, onde houve certa constância no ritmo de mortalidade que veio a reduzir com o passar dos dias; e as concentrações do extrato dos frutos maduros de *A. glabra* (CH_2Cl_2) apresentaram uma relação de concentração/efeito até o 8º dia e todas as concentrações analisadas demonstraram porcentagens de mortalidade inferiores a 70%. O efeito dos extratos etanólicos ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dos frutos verdes e maduros nos modelos experimentais demonstraram reduzida capacidade no controle de larvas, sendo plausível afirmar que a polaridade das substâncias com maior efeito larvicida foram mais bem extraídas com diclorometano e não com etanol.
3. As concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) tanto para os extratos diclorometânicos (frutos verdes e maduros) e etanólicos (frutos verdes e maduros) foram determinadas. Dentre os produtos analisados, os extratos diclorometânicos dos frutos verdes e maduros demonstraram possuir os maiores efeitos larvicidas, tendo nos frutos verdes encontrado o menor valor de concentração letal conseqüentemente maior efeito larvicida. Desta forma, é evidente o potencial da espécie *A. glabra* no controle de larvas de *A. aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S. D. G.; PICCOLI, C. F.; DUQUE L., J. E.; COSTA, E. V.; NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; SALES MAIA, B. H. L. N.; PINHEIRO, M. L. B.; REBELO, M. T. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 262–268, dez. 2011.
- AMARASINGHE, L. D.; WICKRAMARACHCHI, P. A. S. R.; ABERATHNA, A. A. A. U.; SITHARA, W. S.; DE SILVA, C. R. Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, v. 6, n. 6, 27 jun. 2020. DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e04322. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7327262/>.
- AMARILES-BARRERA, S.; GARCÍA-PAJÓN, C. M.; PARRA-HENAO, G. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. n. 2, p. 12, 2013.
- ANH, H. L. T.; HIEN, N. T. T.; HANG, D. T. T.; HA, T. M.; NHIEM, N. X.; HIEN, T. T. T.; THU, V. K.; THAO, D. T.; VAN MINH, C.; KIEM, P. V. Ent-Kaurane diterpenes from *Annona glabra* and their cytotoxic activities. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 12, p. 1681–1682, dez. 2014.
- ANSARI, M. A.; VASUDEVAN, P.; TANDON, M.; RAZDAN, R. K. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 3, p. 267–271, fev. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00079-6).
- ANSARI, M. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 207–211, jul. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00180-7).
- BALBACH, A. **As Plantas Curam**. 12. ed. Missionária, 1961. v. 1.
- BARRETO, E.; RESENDE, M. C.; EIRAS, A. E.; DEMARCO JÚNIOR, P. C. Evaluation of the baited ovitrap with natural attractant for monitoring *Aedes* spp. in Dili, capital of East Timor. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 2, p. 665–672, fev. 2020. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020252.12512018>.
- BAUDILLO, I. Livro: Lucha Contra Los Parasitos Vegetales - Tratado de Fitoparasitologia - Baudilio Juscafresa. 1973. **Estante Virtual**. Disponível em: <https://www.estantevirtual.com.br/livros/audilio-juscafresa/lucha-contra-los-parasitos-vegetales-tratado-de-fitoparasitologia/2812081310>.

BHATNAGAR, M.; KAPUR, K.K.; JALEES, S.; SHARMA, S.K. Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* Linnaeus and *O. sanctum* Linnaeus plant's essential oils and their major constituents against vector mosquito species. v. 17, n. 1, p. 21–26, 1993.

BOWERS, W.; SENER, B.; EVANS, P.; BINGOL, F.; ERDOGAN ORHAN, I. Activity of Turkish medicinal plants against mosquitoes *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 16, p. 339–341, 1 dez. 1995. <https://doi.org/10.1017/S1742758400017379>.

BVS-MS. O que mudou na vacinação contra febre amarela? – BVS Atenção Primária em Saúde. 13 nov. 2018. **O que mudou na vacinação contra febre amarela?** Disponível em: <https://aps.bvs.br/aps/o-que-mudou-na-vacinacao-contra-febre-amarela/>.

CAMPBELL, D. G.; STONE, J. L.; ROSAS, A. A comparison of the phytosociology and dynamics of three floodplain (Várzea) forests of known ages, Rio Juruá, western Brazilian Amazon. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 108, n. 3, p. 213–237, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1992.tb00240.x>.
CDC. Mosquito life cycle. 5 maio 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/aedes.html>.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA - CNCFLORA. 8 jun. 2012. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Annona%20glabra>.

CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; HSIEH, T. J.; CHO, C. P.; WU, Y. C. Chemical Constituents from *Annona Glabra* III. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, n. 4B, p. 913–920, 2000. <https://doi.org/10.1002/jccs.200000124>.

CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 4, p. 437–439, abr. 1998. <https://doi.org/10.1021/np970497z>.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. **Flowering Plants of the Neotropics**. New York: Smith, N. *et al.* 2004.

CHATROU, Lars W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01235.x>.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; CHO, C. P.; WU, Y. C. Ent-kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1000–1003, jul. 2000. <https://doi.org/10.1021/np0000320>.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623–636, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>.

COCHRANE, C. B.; NAIR, P. K. R.; MELNICK, S. J.; RESEK, A. P.; RAMACHANDRAN, C. Anticancer effects of *Annona glabra* plant extracts in human leukemia cell lines. **Anticancer Research**, v. 28, n. 2A, p. 965–971, abr. 2008.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/2708>.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura. Brasil: 1984.

CREMLYN, R. **Plaguicidas modernos y su accion bioquimica**. Limusa, 1995.
CROAT, T. B. **Flora of Barro Colorado Island**. Stanford University Press, 1978.
CROW, J. F. Genetics of Insect Resistance to Chemicals. **Annual Review of Entomology**, v. 2, n. 1, p. 227–246, 1957.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.02.010157.001303>.

DA SILVA, A. L. G.; GURGEL, A. M.; COSTA, A. M.; DIDERICHSEN, F.; LACAZ, F. A.; PARRA-HENAO, G.; RIGOTTO, R. M.; NODARI, R.; SANTOS, S. L. *Aedes aegypti* control in Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1052–1053, mar. 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00626-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00626-7).

DE CÁSSIA SEFFRIN, R.; SHIKANO, I.; AKHTAR, Y.; ISMAN, M. B. Effects of crude seed extracts of *Annona atemoya* and *Annona squamosa* L. against the cabbage looper, *Trichoplusia ni* in the laboratory and greenhouse. **Crop Protection**, v. 29, n. 1, p. 20–24, 1 jan. 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.09.003>.

DE OMENA, M. C.; BENTO, E. S.; DE PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. **Vector Borne and Zoonotic**

Diseases (Larchmont, N.Y.), v. 6, n. 2, p. 216–222, 2006.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2006.6.216>.

DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES, A. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 28 abr. 2010.
<https://doi.org/10.1021/jf903875u>.

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. 595–602, dez. 2012. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000400017>.

ESPINOSA, P. J. **Búsqueda de plantas del área del lago de Texcoco con actividad tóxica contra mosquito casero *Culex quinquefasciatus***. 1985. 68 f. Tesis de licenciatura – Parasitología Agrícola, UACH, Chapingo, México, 1985.

FAUSTINO, C. G.; DE MEDEIROS, F. A.; RIBEIRO GALARDO, A. K.; LOBATO RODRIGUES, A. B.; LOPES MARTINS, R.; DE MEDEIROS SOUZA LIMA, Y.; FECHINE TAVARES, J.; ALVES DE MEDEIROS, M. A.; DOS SANTOS CRUZ, J.; ALMEIDA, S. S. M. da S. de. Larvicide Activity on *Aedes aegypti* of Essential Oil Nanoemulsion from the *Protium heptaphyllum* Resin. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, p. E5333, 16 nov. 2020.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225333>.

FIEHN, O. Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 114, n. 1, abr. 2016. DOI 10.1002/0471142727.mb3004s114.
 Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb3004s114>.

FIOCRUZ. Biblioteca de Manguinhos - Dengue. 2010. Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/bibmang/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=87&sid=106>.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. EDUSP, 2002. v. 2.

FRIES, R. E. **Die Natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen, unter Mitwirkung zahlreicher hervorragender Fachgelehrten begründet**. 2. ed. Berlin, Germany: Engler, A. & Prantl, K., 1959. v. 17.

FRIES. Revision der Arten einiger Anonaceen-Gattungen II. **Acta Horti Bergiani**, v. 10, p. 129–341, 1931.

GALVÃO, S. de S. L.; MONTEIRO, A. de S.; SIQUEIRA, E. P.; BOMFIM, M. R. Q.; DIAS-SOUZA, M. V.; FERREIRA, G. F.; DENADAI, A. M. L.; SANTOS, Á. R. C.; LÚCIA DOS SANTOS, V.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M.; FERNANDES, E. S.; MONTEIRO-NETO, V. Annona glabra Flavonoids Act As Antimicrobials by Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Cell Walls. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 21 dez. 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.02053. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5174114/>.

GENOVESE, M. I.; PINTO, M. D. S.; GONÇALVES, A. E. D. S. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Exotic Fruits and Commercial Frozen Pulpes from Brazil: **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, p. 207–214, 1 jun. 2008. <https://doi.org/10.1177/1082013208092151>.

GEORGE, S.; VINCENT, S. Comparative efficacy of Annona squamosa Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. juss against mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 42, n. 4, p. 159–163, dez. 2005.

GOODRICH, K. R.; RAGUSO, R. A. The olfactory component of floral display in *Asimina* and *Deeringothamnus* (Annonaceae). **The New Phytologist**, v. 183, n. 2, p. 457–469, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02868.x>.

GRAINGE, M.; AHMED, S. **Handbook of Plants With Pest–Control Properties**. 1ª edição. Honolulu, Hawaii: New York: Wiley–Blackwell, 1988.

GROUP, T. A. P. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105–121, 1 out. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>.

GUARIDO, M. M. Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). 8 dez. 2010. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/24936>. Acesso em: 10 fev. 2022.

HARTBERG, W. K.; CRAIG, G. B. REPRODUCTIVE ISOLATION IN STEGOMYIA MOSQUITOES. II. HYBRID BREAKDOWN BETWEEN *Aedes aegypti* AND *A. mascarensis*. **Evolution**, v. 24, n. 4, p. 692–703, dez. 1970. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01805.x>.

HO, S. H.; GOH, P. M.; LEE, K. M. Evaluation of two pine oil-based formulations of Kitz against various life stages of *Aedes aegypti*. v. 34, n. 6, p. 180–181, 1992.
 HONOUR, J. W. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *In*: WHEELER, M. J.; HUTCHINSON, J. S. M. (orgs.). **Hormone Assays in Biological Fluids**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 53–74. DOI 10.1385/1-59259-986-9:53. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-986-9:53>.

IARC. **Some organophosphate insecticides and herbicides**. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436774/>.

JUNIOR, M.; JESUS, A. de. **Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e resistência a piretróide**. 2009. Thesis – 2009. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4276>. Acesso em: 4 jan. 2022.

KABIR, K. E. Larvicidal effect of an alkaloidal fraction of *Artabotrys odoratissimus* (Annonaceae) bark against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 30, n. 3, p. 167–169, set. 2010. <https://doi.org/10.1017/S1742758410000263>.

KAMBOU, G.; GUISSOU, I. P. Phytochemical Composition and Insecticidal Effects of Aqueous Spice Extracts on Insect Pests Found on Green Beans (*Phaseolus vulgaris*) in Burkina Faso. n. 4, p. 212–217, 2011.

KUMUL, D. E. **Búsqueda de plantas silvestres del estado de Veracruz con propiedades toxicas contra gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* y mosquito casero *Culex quinquefasciatus***. 1983. 76 f. Tesis de licenciatura – Parasitología Agrícola, UACH., México, 1983.

LARA REYNA, J.; BELMONT, R.; PÉREZ-PACHECO, R.; RAMIREZ, G.; HERNÁNDEZ, C. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). **Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)**, v. 20, 1 jan. 2004.

LARRANAGA, N.; HORMAZA, J. I. DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus *Annona* (Annonaceae). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 589, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00589>.

LI CHAO-MING; TAN NING-HUA; MU QING; ZHENG HUI-LAN; HAO XIAO-JIANG; LIANG HUI-LING; ZHOU JUN. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1293–1296, 1 abr. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00752-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00752-8).

LIU, X. X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 5, p. 815–821, mar. 1999. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)00466-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00466-x).

LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, D. S. D. de; KURTZ, B. C. ANNONACEAE DAS RESTINGAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85–96, maio 2005. <https://doi.org/10.1590/2175-78602005568706>.

LU, H.; LIANG, Y.; DUNN, W. B.; SHEN, H.; KELL, D. B. Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 215–227, mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.11.004>.

MAAS, P. J. M.; DE KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M.; DE KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65–98, jan. 2001. <https://doi.org/10.1590/2175-78602001528005>.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; VALLE, D. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 92, n. 9, p. 685–689, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.119081>.

MARTINS, A. J.; LINS, R. M. M. de A.; LINSS, J. G. B.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, seç. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, p. 108–115, 1 jul. 2009. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.108>.

MATSUMOTO, S.; VARELA, R. M.; PALMA, M.; MOLINILLO, J. M. G.; LIMA, I. S.; BARROSO, C. G.; MACÍAS, F. A. Bio-guided optimization of the ultrasound-assisted extraction of compounds from *Annona glabra* L. leaves using the etiolated wheat coleoptile bioassay. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1578–1584, jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.024>.

MEHRA, B. K.; HIRADHAR, P. K. Effect of crude acetone extract of seeds of *Annona squamosa* Linn (Family: Annonaceae) on possible control potential against larvae of *Culex quinquefasciatus* Say., p. 141–146, 2000.

MENDONÇA, F. A. C. **Atividade larvicida de diferentes extratos de *Annona glabra* L. frente às larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** Poços de Caldas, Minas Gerais: 2003. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/26ra/>.

MENDONÇA, Fernando A. C.; DA SILVA, K. F. S.; DOS SANTOS, K. K.; RIBEIRO JÚNIOR, K. a. L.; SANT'ANA, A. E. G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7–8, p. 629–636, dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.06.013>.

MIKOLAJCZAK, K. L.; MCLAUGHLIN, J. L.; RUPPRECHT, J. K. **Control of pests with annonaceous acetogenins.** 1988. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US4721727A/en>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico SVS 46.pdf — Português (Brasil). 18 maio 2021a. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/09/boletim_epidemiologico_svs_46.pdf/view.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim_epidemiologico_SVS_4.pdf — Português (Brasil). fev. 2021b. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf/view.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Em 2020, Ministério da Saúde amplia público para vacinas contra febre amarela e gripe. 12 dez. 2019a. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/ultimas-noticias/3089-em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contr a-febre-amarela-e-gripe>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FEBRE DE CHIKUNGUNYA. 8 maio 2018. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/edicoes-2018/is-n-2/2697-febre-de-chikungunya>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.** 3^a. Brasil: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019b. Disponível em: <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sul/husm-ufsm/saude/nveh/guia-de-vigilancia-epidemiologico-2019.pdf/view>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde lança campanha nacional de combate ao mosquito *Aedes aegypti*. 24 nov. 2020a. **Governo do Brasil.** Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/11/ministerio-da-saude-lanca-campanha-nacional-de-combate-ao-mosquito-aedes-aegypti>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 20, 2021. 31 maio 2021c. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/31/boletim_epidemiologico_svs_20.pdf/view.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. Boletim Epidemiológico. v. 51, n. 2, p. 16, jan. 2020b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota informativa nº 94/2017 - Orientações e indicação de concentrações única da vacina febre amarela. 10 abr. 2017a. Disponível em: http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/nota_informativa_94_1concentraçõesfebreamarela.pdf.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saiba como é o ciclo do mosquito *Aedes aegypti*. 18 dez. 2017. **Ministério da Economia**. Disponível em: <https://www.gov.br/economia/pt-br/assuntos/noticias/planejamento/saiba-como-e-o-ciclo-do-mosquito-aedes-aegypti>. Acesso em: 8 jan. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Zika Vírus: causas, sintomas, tratamento e prevenção. 2 maio 2017b. **Zika Vírus: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>.

MINISTRY OF HEALTH BRAZIL. Information System on Diseases of Compulsory Declaration. Incidence of dengue cases and deaths number in Brazil from 1990 to 2015. 2016. **Ministry of Health (Brazil)**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>.

NAP. Read “**Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation**” at **NAP.edu**. Washington, DC. 1989. DOI 10.17226/1398. Disponível em: <https://www.nap.edu/read/1398/chapter/1>. OHSAWA, K.; ATSUZAWA, S.; MITSUI, T.; YAMAMOTO, I. Isolation and Insecticidal Activity of Three Acetogenins from Seeds of Pond Apple, *Annona glabra* L. **Journal of Pesticide Science**, v. 16, n. 1, p. 93–96, 1991. <https://doi.org/10.1584/jpestics.16.93>.

OMS. Chikungunya. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>.

OPAS. Dengue – OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>.

OPAS. Febre amarela - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/40>.

OPAS. Zika - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/zika>.

OXITEC. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Life cycle, biology and distribution. 2012. Disponível em: http://www.genewatch.org/uploads/f03c6d66a9b354535738483c1c3d49e4/appen_4__doc_4.pdf.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 1, p. 21–24, 11 ago. 1995. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01277-K](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01277-K).

PARK, B. S.; LEE, S. E.; CHOI, W. S.; JEONG, C. Y.; SONG, C.; CHO, K. Y. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperoctadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. **Crop Protection**, v. 21, n. 3, p. 249–251, 1 abr. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00079-5).

PNU. El Dengue - Publicação das Nações Unidas, 2002. Disponível em: <http://www.un.org/Pubs/%20CyberSchoolBus/spanish/health/htm/dengue.htm>. Acesso em: 28 jun. 2017.

PNU. **El Dengue - Publicação das Nações Unidas**, 2002. Disponível em: <http://www.un.org/Pubs/%20CyberSchoolBus/spanish/health/htm/dengue.htm>. Acesso em: 28 jun. 2017.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. de V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281–293, jun. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000200008>.

PONTES, R. J. S.; REGAZZI, A. C. F.; LIMA, J. W. O.; KERR-PONTES, L. R. S. Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 316–321, ago. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000400007>.

PRESUTTI, T. R. **Aplicação da cromatografia a gás associada à espectrometria de massas em tandem no diagnóstico da deficiência de 3β-hidroxiesteroide desidrogenase**. 2017. 76 f. Mestrado em Análises Clínicas –

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. DOI 10.11606/D.9.2017.tde-10052017-152745. Disponível em:
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-10052017-152745/>.

PROPHIRO, J. S.; DA SILVA, M. A. N.; KANIS, L. A.; DA SILVA, B. M.; DUQUE-LUNA, J. E.; DA SILVA, O. S. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 713–719, 1 fev. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2547-5>.

PUSHPALATHA, E.; MUTHUKRISHNAN, J. Larvicidal activity of a few plant extracts against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi*. v. 32, n. 1, p. 14–23, 1995.

RAFAEL, J.; MELO, G.; DE CARVALHO, C.; CASARI, S.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 1ª edição. Ribeirão Preto, SP: Holos, 2012.

RIVERA, R. I. **Toxicidad de extractos acuosos vegetales en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 1992. 59 f. Tesis de licenciatura – Parasitología Agrícola, UACH, Chapingo, México, 1992.

RODRÍGUEZ, H. C.; LAGUNES, A. T. Actividad tóxica de *Cestrum* spp. (Solanaceae) en larvas del mosquito casero *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). México, ed. 67, p. 147–159, jul. 1987.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 1 jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.017>.

SAGAR, S. K.; SEHGAL, S. S. Toxicity of neem seed coat extract against mosquitoes. v. 59, n. 2, p. 215–223, 1997.

SALCEDO, B. A. **Búsqueda de plantas nativas de Morelos con propiedades tóxicas contra gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, y mosquito casero *Culex quinquefasciatus***. 1985. 85 f. Tesis de licenciatura – Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México, 1985.

SÁNCHEZ, L. G. **Toxicidad de extractos acuosos de plantas ornamentales del área de influencia de Chapingo, Edo. de México, sobre larvas del mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti***. 1987. 65 f. Tesis de licenciatura – Parasitología Agrícola, UACH, Chapingo, México, 1987.

SÁNCHEZ, M. C.; GONZÁLEZ, N.; GONZÁLEZ, E. Efecto larvicida de extractos acuosos vegetales sobre *Aedes aegypti*. ed. 45, p. 30–33, 1997.

SANTHOSH, S. B.; YUVARAJAN, R.; NATARAJAN, D. *Annona muricata* leaf extract-mediated silver nanoparticles synthesis and its larvicidal potential against dengue, malaria and filariasis vector. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 3087–3096, 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4511-2>.

SANTOS, V. S. Ciclo de vida do mosquito | PROGRAMA DE COMBATE AO MOSQUITO *Aedes aegypti* EsalQ/USP. 18 maio 2016. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/combate-aedes/sobre-o-mosquito/ciclo-de-vida-do-mosquito>. Acesso em: 8 jan. 2022.

SCHERER, H. W. Larcher, W. (Hrsg.): Ökophysiologie der Pflanzen. Ulmer Verlag, Stuttgart 1994; 360 S., DM 78 (ISBN 3-8252-8074-8). **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v. 158, n. 2, p. 207–207, 1995. <https://doi.org/10.1002/jpln.19951580214>.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z.; KITSON, F. G. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide**. 2ª edição. Boston, MA: Academic Press, 2011.

STOKA, A. M. **Ecdysteroids, juvenile hormones and metamorphosis in Triatominae**. In **Chagas' Disease Vectors**. CRC Press, Boca Raton, FL: Brenner R. R. e Stoka A. M., 1987. v. 3.

SUBRAMONIA, T. T.; KATHIRESAN, K. Mosquito larvicidal activity of mangrove plant extracts against *Aedes aegypti*. v. 4, n. 34, p. 116–119, 1992.

TAWATSIN, A.; ASAVADACHANUKORN, P.; THAVARA, U.; WONGSINKONGMAN, P.; BANSIDHI, J.; BOONRUAD, T.; CHAVALITTUMRONG, P.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; KOMALAMISRA, N.; MULLA, M. S. Repellency of essential oils extracted from plants in thailand against four mosquito vectors (diptera: culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Southeast Asian J. Trop Med. Public Health**, v. 37, n. 5, p. 17, 2006.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399–436, abr. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>.

TSOU, C.H.; FU, Y.L. Tetrad pollen formation in *Annona* (Annonaceae): proexine formation and binding mechanism. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 5, p. 734–747, maio 2002. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.5.734>.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. **Produtos Naturais no Controle de Insetos**. 1. ed. São Carlos, São Paulo: Editora da UFSCar, 2001.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L. A.; CHEN, C. L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, fev. 2008. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100020>.

WHO. Dengue control. World Health Organization (WHO). 24 out. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 15 jun. 2020.

WHO. Dengue y dengue grave. Organización Mundial de la Salud (OMS). 24 jun. 2020. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>. WHO. Report of the WHO Informal Consultation on the “Evaluation and Testing of Insecticides”, WHO/HQ, Geneva, 7 to 11 October 1996. 1996. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65962>.

YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. M.; COURTNEY, G. W.; MEIER, R.; LAMBKIN, C.; PAPE, T. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects*. **Zootaxa**, v. 1668, n. 1, p. 565–590, 21 dez. 2007. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.27>.

ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Recent advances in *Annonaceous acetogenins*. **Natural Product Reports**, v. 13, n. 4, p. 275–306, ago. 1996. <https://doi.org/10.1039/np9961300275>.

ZOTZ, G.; TYREE, M.; PATIÑO, S. Hydraulic architecture and water relations of a flood-tolerant tropical tree, *Annona glabra*. **Tree physiology**, v. 17, p. 359–65, 1 jul. 1997. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.6.359>.

ZOTZ; G, H.; M, K.; K, W. High rates of photosynthesis in the tropical pioneer tree, *Ficus insipida* Willd. **Flora.**, v. 190, n. 3, p. 265–272, 1 jul. 1995.
[https://doi.org/10.1016/s0367-2530\(17\)30663-1](https://doi.org/10.1016/s0367-2530(17)30663-1).

ANEXOS

**ANEXO I – PLANILHA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA –
Annona glabra L. (Magnoliales: Annonaceae) versus *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae)**

TEST

Nº do Experimento:		Pesquisador principal:			Local:		Data início do tratamento:	
Material:			Formulação:		Temperatura:		Fotoperíodo:	Espécie:
Instar:	Larvas/frasco:	Água:	Volume de água:		Solvente:		Data preparo solução:	

Grupo	Concentrações (ppm)	Data		/ /	
		Tempo (horas)		24	
		Tempo (dias)		1	
Controle H ₂ O (destilada)		A			
		B			
		C			
		D			
		E			
Controle Tween ou Controle Metanol		A			
		B			
		C			
		D			
		E			
<i>A. glabra</i>	40	A			
		B			
		C			
		D			
		E			
<i>A. glabra</i>	80	A			
		B			
		C			
		D			
		E			
<i>A. glabra</i>	160	A			
		B			
		C			
		D			
		E			
<i>A. glabra</i>	320	A			
		B			
		C			
		D			
		E			

Fonte: Próprio Autor

**ANEXO II – PLANILHA AVALIAÇÃO DA AÇÃO RESIDUAL DOS EXTRATOS -
Annona glabra L. (Magnoliales: Annonaceae) versus *Aedes aegypti* (Diptera:
 Culicidae)**

TESTE

Nº do Experimento:		Pesquisador principal:			Local:		Data início do tratamento:	
Material:			Formulação:		Temperatura:	Fotoperíodo:	Espécie:	
Instar:	Larvas/frasco:	Água:	Volume de água:		Solvente:		Data preparo solução:	

Grupo Concentrações (ppm)	Data	/ /	/ /	/ /	/ /	/ /
	Tempo (horas)	48	96	144	192	240
	Tempo (dias)	2	4	6	8	10
Controle H ₂ O (destilada)	A					
	B					
	C					
	D					
	E					
Controle Tween ou Controle Metanol	A					
	B					
	C					
	D					
	E					
<i>A. glabra</i> 40	A					
	B					
	C					
	D					
	E					
<i>A. glabra</i> 80	A					
	B					
	C					
	D					
	E					
<i>A. glabra</i> 160	A					
	B					
	C					
	D					
	E					
<i>A. glabra</i> 320	A					
	B					
	C					
	D					
	E					

Fonte: Próprio Autor

ANEXO III – CERTIDÃO DE CADASTRO NO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO – SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AAA76E9

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AAA76E9**
 Usuário: **Unifap**
 CPF/CNPJ: **34.868.257/0001-81**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Annona glabra

Composição química

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **BIOATIVIDADE DO EXTRATO DE Annona glabra (ANNONACEAE) SOBRE DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DE Aedes aegypti**

Equipe

Luiz Eduardo D'Elia Oliveira **Unifap**

Parceiras Nacionais

34.868.257/0001-81 / Fundação Universidade Federal do Amapá

Data do Cadastro: **27/02/2020 12:34:03**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:06** de **16/03/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

**ANEXO IV – CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO DE REVISÃO
DE *Annona glabra* (Annonaceae)**



AMAZONIA
Investiga

Ref. Confirmation of acceptance

The editorial team of the Revista Amazonia Investiga ISSN 2322- 6307 informs the next paper has been accepted for publication:

Paper

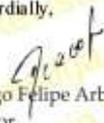
Aplicação de *Annona glabra* L. (Annonaceae) na área da saúde, composição química e atividade biológica.

Authors

Luiz Eduardo D'Elia Oliveira
<https://orcid.org/0000-0003-4215-1598>
Carlos Manuel Dutok-Sánchez
<https://orcid.org/0000-0001-6712-3185>
Romário Balieiro Monteiro
<https://orcid.org/0000-0002-5986-3447>
Fernando Antônio de Medeiros
<https://orcid.org/0000-0003-0588-1858>

Date of submission: November 2, 2021
Date of Acceptance: December 26, 2021
Date of publication: Vol. 11 - Issue 49th, 2022

Cordially,


Diego Felipe Arbeláez Campillo
Editor

Revista Amazonia Investiga :: ISSN 2322- 6307
www.amazoniainvestiga.info

Disponível em: <https://amazoniainvestiga.info/index.php/amazonia/article/view/1894>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA Nº 34/2021 DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO LUIZ
EDUARDO D'ELIA OLIVEIRA

Ao décimo quinto dia do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e um, às 09:00 horas, por meio de videoconferência através do Link (defesa por videoconferência): (<https://meet.google.com/ofb-xwjm-znb>), realizou-se a defesa da dissertação do acadêmico **Luiz Eduardo D'Elia Oliveira**, do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde - PPGCS. A Comissão Examinadora da defesa da dissertação, obedecendo ao disposto no Regimento Interno do PPGCS, foi constituída pelos Doutores: Fernando Antônio de Medeiros, Orientador e presidente sem direito à avaliação, Madson Ralide Fonseca Gomes (PPGCS), Emerson Augusto Castilho Martins (PPGCS) e Paloma Martins Mendonça (Externo). O tema arguido foi: "**Bioatividade dos Extratos de *Annona glabra* L. (Magnoliales: Annonaceae) sobre a fase larval de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**". Após apresentação e arguição, o mestrando respondeu às perguntas formuladas e, posteriormente, a Comissão Examinadora reuniu-se para proceder à avaliação, sendo atribuídos os seguintes pareceres (aprovado/reprovado): Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes, Dr. Emerson Augusto Castilho Martins e Dra. Paloma Martins Mendonça. Assim sendo, a Comissão Examinadora (aprovou/reprovou) **APROVOU** a dissertação do mestrando **Luiz Eduardo D'Elia Oliveira**, ressaltando as considerações abaixo. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão Examinadora deu por encerrado os trabalhos, sendo lavrada e conferida a presente ata, que depois de lida e achada conforme, vai devidamente assinada por quem é de direito. O discente e a Comissão Examinadora participaram por videoconferência e assinarão a ata por meio de assinatura digital.

Considerações da banca:

Os membros da banca se reuniram em reunião secreta para avaliação final do trabalho, após discussão decidiram por "**APROVAR**" a versão do documento escrito, devendo o mestrando cumprir com todas as exigências apontadas pela banca examinadora para entrega da versão final do documento escrito a coordenação do curso.

Fernando Antônio de Medeiros
Presidente

Dr. Emerson Augusto Castilho Martins
Membro Titular

Luiz Eduardo D'Elia Oliveira
Mestrando

Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes
Membro Titular

Dra. Paloma Martins Mendonça
Membro Titular