



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

HYAGO LUIZ RIQUE

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO LIOFILIZADO DE
Agave sisalana EM EMBRIÕES DE PEIXE ZEBRA E *Artemia salina***

JOÃO PESSOA

2020

HYAGO LUIZ RIQUE

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO LIOFILIZADO DE
Agave sisalana EM EMBRIÕES DE PEIXE ZEBRA E *Artemia salina***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado a Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba- UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

Orientadora:

Prof Dr^a Fabíola Da Cruz Nunes

Coorientador:

Prof Dr. Ian Porto Gurgel Do Amaral

João Pessoa

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R594e Rique, Hyago Luiz.

Estudo da toxicidade do extrato liofilizado de Agave sisalana em embriões de peixe zebra e Artemia salina / Hyago Luiz Rique. - João Pessoa, 2020.

41 f. : il.

Orientação: Fabíola da Cruz Nunes.

Coorientação: Ian Porto Gurgel do Amaral.

TCC (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Bioinseticida. 2. Aedes aegypti. 3. Produtos naturais. 4. Embriotoxicidade. 5. Prevenção de epidemias. I. Nunes, Fabíola da Cruz. II. Amaral, Ian Porto Gurgel do. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 614.4(043.2)

HYAGO LUIZ RIQUE

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO LIOFILIZADO DE
Agave sisalana EM EMBRIÕES DE PEIXE ZEBRA E *Artemia salina***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado a Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba- UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

Aprovado em: 27 de Novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Fabiola da Cruz Nunes

Prof Dr^a Fabíola Da Cruz Nunes
Cbiotec-UFPB
Orientadora

Ian Amard

Prof Dr. Ian Porto Gurgel Do Amaral
Cbiotec-UFPB
Coorientador

Louise Helena Guimarães de Oliveira

Louise Helena Guimarães de Oliveira
Graduação em Biotecnologia- UFPB

Dedico este trabalho aos meus pais, por tudo que fizeram e sacrificaram para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses anos de vida enfrentei muitas batalhas internas e externas que questionavam sobre a minha capacidade de seguir e evoluir. No entanto, apesar das lutas, evoluí e evoluo todo dia para me tornar uma pessoa melhor. Nesta caminhada, várias pessoas tiveram participação e contribuíram com esta evolução e por elas tenho uma eterna gratidão.

Neste contexto, venho aqui agradecer a todos que tiveram alguma participação nesta minha jornada, tanto antes do meu ingresso a graduação quanto durante os quatro anos de seu curso.

Primeiramente agradeço à minha família, por terem me ensinado que nada é impossível e que podemos alcançar nossos objetivos sem prejudicar os outros. Aos meus pais, Geraldo Luiz Filho e Valgezia Rique Pereira, por terem sacrificado tanto para que eu tivesse uma educação de qualidade e por garantirem que nunca me faltasse nada. À minha irmã, Kamila, por sempre estar ao meu lado nos momentos de maior dificuldade. À minha avó, Gezira Rique, por ser meu porto seguro e ser minha segunda mãe. E às minhas tias, Leda e Girleide, por trazerem tanta espontaneidade e alegria em minha vida.

Às minhas amigas do ensino médio, Paulinha e Gisele, pelo companheirismo e acolhimento, e por trazerem a tranquilidade e paz mesmo em um período escolar.

Agradeço à Jackelly, minha companheira de grandes aventuras e desafios, por ser tão presente em minha vida, por dividir pensamento e reflexões que permitem o meu crescimento e por compartilhar sonhos e conquistas.

Ao longo do curso conheci pessoas maravilhosas que trilharam grandes aventuras ao meu lado e que possuo memórias que aquecem o coração. Agradeço à Olivia Costa, por ser uma das primeiras pessoas a me acolher na graduação e por todo afeto e carinho que temos um com o outro. Aos meus eternos amigos, Mariana e Junior, por estarem presentes ao meu lado nestes anos de muita luta e sofrimento, mas, sobretudo, de muita alegria, companheirismo e crescimento.

Na metade da graduação tive uma das experiências mais enriquecedoras da minha vida, o intercâmbio. Agradeço à Renata e Izannery, por vivenciarem comigo este momento que mais contribuiu para a construção da minha identidade. À Isabela, Bruna, Marcelinha, Luisa e Bea, por fazerem da Casa da Moeda um lugar único, com muitas histórias e dias inesquecíveis que levarei para o resto da minha vida.

Aos meus companheiros do LAPAVET (Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Parasitas e Vetores), local onde tive muito aprendizado e que hoje tenho um imenso carinho. À Patrícia Alexandria e Rafaela Costa, por todo o aprendizado e momentos compartilhados no laboratório. E, em especial, agradeço à Louise Guimarães, por ter me acolhido tão bem, pelo conhecimento repassado, por todo seu carinho e afeto único.

À minha eterna amiga e orientadora, Fabíola da Cruz Nunes, por todas as oportunidades que foram oferecidas dentro do laboratório, por todo conhecimento científico ensinado e por seus conselhos que permitiram o meu crescimento profissional e, acima de tudo, o pessoal. Fabíola é uma mãe científica, que ensina e cuida do seu “filhote” para que ele cresça e voe e, por isso, sou eternamente grato por tê-la em minha vida.

Agradeço aos professores e ao Centro de Biotecnologia que, apesar das limitações espaciais e tecnológicas, fornecem todas as ferramentas para a construção do conhecimento e contribuem, diariamente, para a ciência.

Aos membros da banca examinadora, Fabiola, Louise e Ian, agradeço por aceitarem o convite e por terem contribuído tanto para o meu conhecimento.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares, por contribuírem diretamente e indiretamente para a realização desta conquista. Obrigado.

RESUMO

Dengue, zika, chikungunya e febre amarela urbana são arboviroses que assolam a sociedade, tendo como vetor em comum, o mosquito *Aedes aegypti*. O controle dessas doenças é baseado no combate direto ao vetor, com a utilização, na maioria das vezes, de inseticidas químicos. No entanto, ao longo dos anos, o mosquito *Ae. aegypti* começou a adquirir resistência aos inseticidas convencionais fazendo-se assim, necessário uma prospecção por novas substâncias com característica inseticida. Na natureza, diversas plantas possuem potenciais substâncias pesticidas, provenientes do metabolismo secundário, que desempenham um papel defensivo da planta contra pragas. O sisal (*Agave sisalana*), por exemplo, recentemente foi atribuído como planta com propriedades inseticidas contra todas as fases do mosquito *Ae. aegypti*. Para avaliar a segurança desse tipo de inseticida, faz-se necessária a avaliação da sua toxicidade. Desse modo, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito tóxico do extrato liofilizado do sisal em náuplios de *Artemia salina* e embriões de *Danio rerio*. Para avaliação da atividade citotóxica, 20 náuplios de *Artemia salina* e 24 embriões de peixe-zebra foram transferidos para tubos de ensaio e placa de 24 poços, respectivamente, e expostos a concentrações de 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,250 mg/mL; 0,125 mg/mL do extrato liofilizado da *Agave sisalana*. Como resultado, foi visto que o extrato apresentou efeito letal para a *Artemia salina* e para os embriões. Dessa forma, podemos concluir que o extrato da *A. sisalana*, embora possua atividade inseticida documentada contra mosquitos *Ae. aegypti*, deve ter a sua aplicação cautelosa quando a mesma ocorrer em corpos de água em que existam outras espécies não-alvo, especialmente de peixes e crustáceos, tendo em vista sua toxicidade para as espécies estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinseticida. *Aedes aegypti*. Produtos naturais. Embriotoxicidade. Prevenção de epidemias.

ABSTRACT

Dengue, zika, chikungunya and urban yellow fever are arboviruses that devastate the society having the *Aedes aegypti* mosquito as their common vector. Control of these diseases is based on the direct combat of the vector with the use of chemical insecticides. However, over the years, the *A. aegypti* mosquito has begun to acquire resistance to conventional insecticides making it necessary to prospect for new substances with insecticide characteristics. In nature, several plants have potential pesticide substances, derived from secondary metabolism, which play a defensive role of the plant against insects. Sisal (*Agave sisalana*) has recently been attributed as a plant with insecticidal properties against all phases of the *Ae. aegypti* mosquito. Thus, to deduce the safety of this type of insecticide, it is necessary to evaluate its toxicity. This study aimed to evaluate the insecticidal effect of freeze-dried extract of *Agave sisalana* on nauplii of the brine shrimp and embryos of *Danio rerio*. For cytotoxic activity evaluation, 20 nauplii of *Artemia salina* and 24 zebrafish embryos were transferred to test tubes and plate of 24 wells, respectively, and exposed to concentrations of 2.0 mg/mL; 1.0 mg/mL; 0.5 mg/mL; 0.250 mg/mL; 0.125 mg/mL of freeze-dried extract of *Agave sisalana*. As a result, it was seen that the extract presented a lethal effect for *Artemia salina* and embryos. Therefore, we can conclude that the freeze-dried extract of *A. sisalana*, although it has documented insecticidal activity against *Ae. aegypti* mosquitoes, must have its cautious application when it occurs in water bodies in which there are other non-target species, especially fish and crustaceans, in view of its toxicity to the species studied.

KEYWORDS: Bioinsecticide. *Aedes aegypti*. Natural products. Embryotoxicity. Epidemic prevention.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Fêmea adulta realizando hematofagia (repasto sanguíneo). | 13 |
| Figura 2- Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> | 14 |
| Figura 3- Macho e fêmea de <i>Aedes aegypti</i> | 15 |
| Figura 4- Plantação de sisal (<i>Agave sisalana</i>). | 19 |
| Figura 5- Embrião de peixe zebra (<i>Danio rerio</i>). | 21 |
| Figura 6- Naúplios de <i>Artemia salina</i> | 22 |
| Figura 7- Extrato liofilizado da <i>Agave sisalana</i> | 25 |
| Figura 8- Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra. 26 | |
| Figura 9- Distribuição da placa dos testes de toxicidade do embrião do peixe-zebra. | 27 |
| Figura 10- Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> | 29 |
| Figura 11- Embriotoxicidade em peixe-zebra. | 30 |
| Figura 12- Embrião coagulado pós exposição do extrato liofilizado da <i>Agave sisalana</i> | 32 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 | Vetor..... | 13 |
| 2.2 | Produtos naturais e seus efeitos inseticidas | 16 |
| 2.3 | <i>Agave sisalana</i> | 19 |
| 2.4 | Teste de toxicidade | 20 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 24 |
| 3.1 | Objetivo geral | 24 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 24 |
| 4 | METODOLOGIA | 25 |
| 4.1 | Substância-teste: Extrato liofilizado da <i>A. sisalana</i> | 25 |
| 4.2 | Bioensaios..... | 25 |
| 4.2.1 | Ensaio de toxicidade com naúplios de <i>Artemia salina</i> | 25 |
| 4.2.2 | Ensaio de toxicidade com embriões de peixe-zebra | 26 |
| 5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 28 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 7 | CONCLUSÃO | 34 |
| | REFERÊNCIAS..... | 35 |
| | GLOSSÁRIO | 41 |

1 INTRODUÇÃO

Insetos causadores de doenças que afetam a agricultura, pecuária ou até mesmo o ser humano causam impactos negativos à economia e a saúde pública. Dengue, febre amarela urbana, chikungunya e zika podem ser destacadas como doenças que tem o mosquito *Aedes aegypti* como vetor. Através da picada da fêmea do mosquito infectada, durante o processo de repasto sanguíneo, o mosquito propaga o vírus na sociedade e, em paralelo, com os componentes que constituem o sangue maturam os seus ovos, possibilitando a continuidade do seu ciclo de vida e perpetuação na sociedade.

No Brasil, principalmente na região do Nordeste, a temperatura elevada associada ao crescimento desordenado das cidades e a inadequada infraestrutura urbana permitem a proliferação do mosquito *Aedes aegypti* e, conseqüentemente, a reemergência dos casos de arboviroses na população. Hoje há diversas linhas de pesquisas que buscam combater estas doenças na população por meio do combate aos patógenos. Entretanto, apesar do desenvolvimento das vacinas e medicações que tem como foco a imunização ou o tratamento da doença nos humanos, é necessário buscar e aprimorar novos métodos para o controle do vetor, para que haja a redução da propagação dos vírus transmitidos pelo vetor na sociedade e, em paralelo, a diminuição dos gastos públicos referentes às ditas conseqüências.

O controle do *Ae. aegypti* é uma tarefa complexa, devido aos diferentes estágios de desenvolvimento das populações dos mosquitos (ovo, larva, pupa ou adulto). No entanto, a prática do controle vetorial inclui e abrange todas as fases do desenvolvimento do mosquito, podendo ser remediada a partir da vigilância, redução da fonte (ou manejo ambiental); controle biológico, uso da *Wolbachia* reduzindo na metade do tempo de vida do mosquito adulto e possibilitando a progênie estéril (MCMENIMAN et al., 2009; YEAP et al., 2011); controle químico com uso de inseticidas e repelentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997) e armadilhas e manejo da resistência a inseticidas (ROSE, 2001).

Além do mais, o uso de inseticidas, em associação com as campanhas de educação popular, que fazem alusão à conscientização do combate aos ambientes propícios para a proliferação do vetor, contribuem para redução do número de insetos e conseqüentemente a uma desaceleração da transmissão dos patógenos

relacionados ao *Ae. aegypti* na sociedade. No entanto, em alguns casos, essas ferramentas são erroneamente utilizadas provocando o aparecimento de populações resistentes e ocasionando problemas para o controle de vetores, afetando, direta e profundamente, a reemergência das doenças transmitidas por vetores (BROGDON; MCALLISTER, 1998). Logo, nesse contexto, é notório que a inovação nos métodos para o combate do vetor é de suma importância em programa de controle de insetos.

A utilização de produtos naturais traz a possibilidade da inovação e desenvolvimento de tecnologia para controle de insetos. Na natureza, as plantas produzem naturalmente substâncias inseticidas e antimicrobianas como resultados do seu mecanismo de defesa contra insetos predadores. Em relação ao *Ae. aegypti*, diversos estudos comprovam a atividade e a potencialidade de extratos naturais para o combate de larvas ou mosquitos da espécie (CONSOLI et al., 1989; FERNANDES et al., 2018; FERREIRA et al., 2019). Nunes et al. (2019) evidencia a utilização da *Agave sisalana*, popularmente conhecida como sisal, como inseticida eficaz em diferentes fases de vida do *Ae. aegypti*.

No entanto, apesar das evidências científicas quanto ao potencial inseticida da *A. sisalana* contra o *Ae. aegypti*, não existem estudos sobre a toxicidade da planta contra organismos não alvo. Logo, este trabalho tem como objetivo realizar os ensaios toxicológicos do extrato liofilizado da *A. sisalana* em embriões de peixe zebra e em *Artemia salina*, possibilitando o conhecimento dos efeitos desta substância aos organismos não-alvos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vetor

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) pertence à família Culicidae (KNIGHT; STONE, 1977), sendo oriundo do Velho Mundo, provavelmente da região etiópica, tendo sido descrito no Egito (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Admite-se que sua propagação pelo mundo começou entre os séculos XVII ao XIX, através das embarcações mercantes e no Brasil, introduzida, provavelmente, durante o tráfico de escravos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; KYLE; HARRY, 2008).

O *Ae. aegypti* é vetor de arboviroses, tais como: dengue, Febre amarela urbana (FAU), Febre Chikungunya e Zika. Soma-se a essas arboviroses as síndromes congênitas associadas a essas infecções, como a microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, associada ao vírus Zika. Estas doenças são transmitidas através da picada do mosquito fêmea, que pode se alimentar várias vezes em um ciclo gonotrófico, que é o período que vai de uma ovoposição a outra (FARJANA; TUNO, 2013).

Os adultos do *Ae. aegypti* apresentam o tórax enegrecido, frequentemente com a presença de faixas branco-prateado nas bases dos segmentos tarsais e um desenho de lira no mesonoto, como representado na Figura 1 (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; OPAS, 1986). Em relação a alimentação, os machos e fêmeas se alimentam de solução que contém açúcar ou outras substâncias como néctar das plantas como fonte de nutrientes. No entanto, as fêmeas se alimentam também do sangue do hospedeiro, preferencialmente do sangue humano, por necessitarem das proteínas que nele constitui para a maturação dos ovos.

Figura 1 : Mosquito *Ae. aegypti* em sua forma adulta.

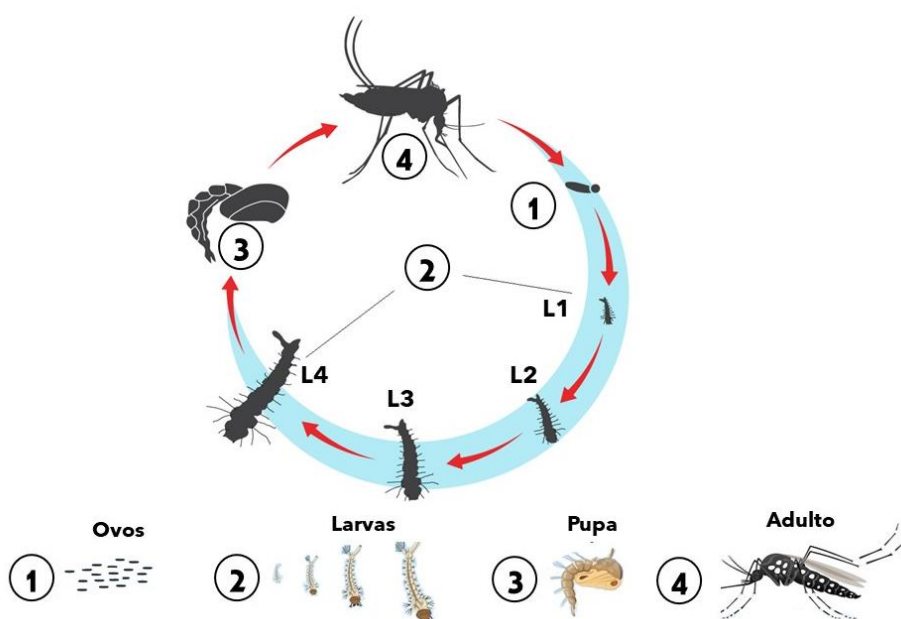


Fonte: Acervo LAPAVET

O *Ae. aegypti*, até seu completo desenvolvimento possui quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mosquito (Figura 2) (FORATTINI, 1973; GUIMARÃES; TUCCI;BATTESTI, 2001). Após o repasto sanguíneo, ocorre a postura dos ovos. As fêmeas são atraídas por ambientes escuros e sombreados e a oviposição não é feita diretamente na água, mas em superfícies ásperas, cerca de 1 a 2 cm acima do nível da água (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; ROBERTS; HSI, 1977). Os ovos, após completarem o desenvolvimento embrionário, em condições favoráveis de temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e umidade (75%), são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, podendo ser prolongada por mais de um ano, chegando até a 450 dias (TAUIL, 2002).

As larvas resultantes dos ovos, sempre aquáticas, apresentam-se aspecto vermiforme e corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Embora vivam em ambiente aquático, as larvas respiram o oxigênio do ar, através do seu sifão respiratório, necessitando ir periodicamente à superfície da água. As larvas possuem quatro estágios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4), e a duração de cada fase dependerá da temperatura e disponibilidade de alimento. Esta fase é caracterizada como período de alimentação e crescimento, alimentando-se de material orgânico acumulado nos recipientes do criadouro. Caso haja a alimentação e temperatura adequada, o período de eclosão e pupação não excede a cinco dias.

Figura 2- Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

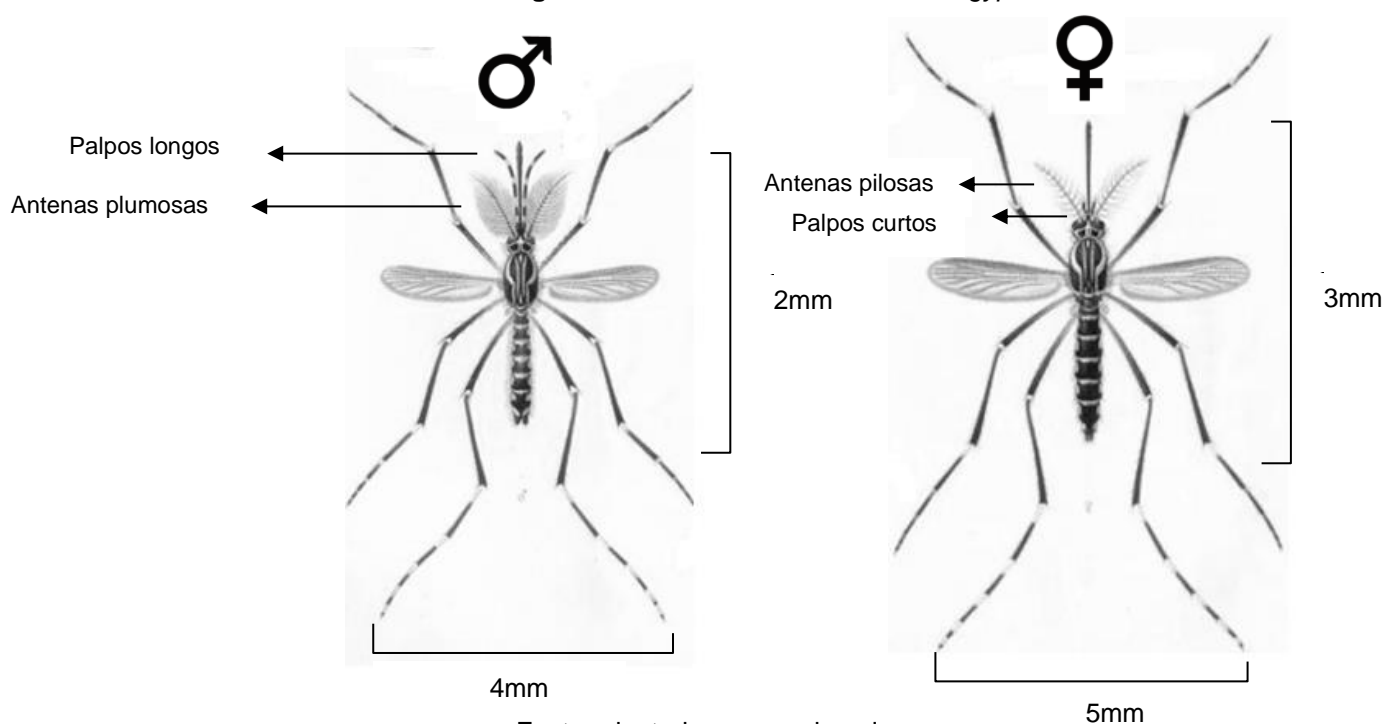


Fonte adaptada: <http://www.ciencias.seed.pr.gov.br>

Em relação as pupas, fase posterior ao último estágio larval, é o período de transição da fase aquática para a fase aérea da vida do *Ae. aegypti*. As pupas não se alimentam e utilizam a energia armazenada durante o estágio larvária. Estas ficam na superfície da água, flutuando, o que facilita a emergência do inseto adulto. A pupa tem formato de vírgula e é dividida em cefalotórax e abdômen. A pupa tem um par de tubos respiratórios ou "trompetas", que atravessam a água e permitem a respiração. Esta fase pode durar, geralmente, de dois a três dias.

A fase adulta representa o estágio de dispersão e reprodução do inseto. O corpo do adulto é dividido em cabeça, tórax e abdômen. Há algumas diferenças morfológicas entre o macho e a fêmea, tais como: os machos geralmente são menores que as fêmeas, apesar dos palpos maxilares das fêmeas serem menores que o do macho; as asas dos machos são mais compridas e finas do que as fêmeas; a distribuição de pelos nos segmentos do corpo do macho é mais numerosa e longa que nas fêmeas, dessa maneira, as antenas dos machos são classificadas como plumosas, ao contrário nas fêmeas, com menor número de pelos, são chamadas de pilosas e os palpos das fêmeas são menores que a probóscida e dos machos são longos (Figura 3). Além do mais, as fêmeas possuem o aparelho ovopositor no final do último segmento abdominal (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Após a cópula, ocorre a oviposição e o reinício do ciclo de uma nova geração do *Ae. aegypti*.

Figura 3- Macho e fêmea de *Aedes aegypti*.



Fonte adaptada: www.mdsauade.com

2.2 Produtos naturais e seus efeitos inseticidas

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade do mundo, além de um considerável conhecimento tradicional, o qual é passado de geração a geração (LEÃO; FERREIRA JARDIM, 2007;). Os recursos vegetais possuem uma estreita relação com a sociedade, sendo utilizados para diversas finalidades, seja como fonte de alimento, remédios ou até mesmo no controle pragas (CORREA; SALGADO, 2011; PAULA; CRUZ-SILVA, 2010; QUEIROZ; LAMANO-FERREIRA, 2014). Existem relatos na literatura do uso de plantas com propriedades paralisantes, por partes dos indígenas, nas caçadas para obtenção de alimento. Além do mais, podem ser utilizadas para o envenenamento intencional, homicídio e suicídio, ou ainda, como recurso terapêutico e desenvolvimento de novos fármacos (CAMPOS et al., 2016; MORAIS et al., 2005).

A utilização de plantas no controle de pragas se destaca no cenário, a fim de resultar na morte de insetos ou prevenir os seus comportamentos considerados destrutivos (WARE; WHITACRE, 2004). Plantas com atividade inseticida possuem compostos secundários, tais como monoterpenos e seus análogos, com a potencial capacidade para interferências tóxicas em processos bioquímicos, causando consequências fisiológicas e comportamentais nos insetos (PRATES; SANTOS, 2002). Na natureza, diversas substâncias químicas provenientes do metabolismo secundário desempenham um papel defensivo na planta. Mecanismo de ação dos compostos variam de acordo com o princípio ativo, podendo atuar no sistema nervoso do inseto, interrompendo as transmissões dos impulsos nervosos (MOREIRA; FIGUEIRA-MANSUR, 2012); no sistema neuroendócrino, interferindo nos processos normais de troca de tegumento (ecdise) (SILVA et al., 2011); e no metabolismo respiratório das células, impedindo a síntese de ATP (JACOBSON, 1975). Além do mais, podem atuar no sistema hormonal, nas glândulas anexas ao cérebro responsáveis pela metamorfose dos insetos, impedindo a troca do tegumento e maturação de ovos (MENEZES, 2005); podem inibir a alimentação do inseto (ALKOFAHI et al., 1989); causar repelência ou toxicidade ao inseto causando a morte ao inseto (MOREIRA; FIGUEIRA-MANSUR, 2012); podem atuar na redução na oviposição e na emergência de adultos de diversos insetos, principalmente quando é relacionado ao combate do *Ae. aegypti*. (BOEKE et al., 2004; NUNES, 2013; HUSSAIN et al., 2019).

Essas substâncias advindas do metabolismo secundário, apresentam uma

grande diversidade estrutural. Sua produção é determinada geneticamente, mas pode ser influenciada por fatores bióticos (exemplos de situações) e abióticos (exemplos de situações). Estes produtos metabólitos podem ser encontrados em todas as partes das plantas, tais como: raízes, caules, folhas, cascas e até mesmo nos frutos, em concentrações diferenciadas, dependendo do estágio do desenvolvimento da planta, época do ano, sazonalidade, ritmo circadiano, interação inseto-planta e entre outros fatores (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016).

Os inseticidas orgânicos, aqueles que possuem em sua estrutura química a presença do átomo de carbono, podem ser classificados em sintéticos e naturais. Entre os sintéticos, podemos mencionar os organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides e os inseticidas naturais, como nim, piretro, azadirachtina, espinosade e abamectina (MOSSA; MOHAFRASH; CHANDRASEKARAN, 2018; ISMAN, 2020). Apesar das contribuições dos inseticidas sintéticos à agricultura, o uso recorrente e errôneo das antigas formulações sintéticas causou e continua causando diversos problemas à vida, tais como: o aumento de resistência dos insetos e a elevada toxicidade aos organismos não-alvos, contaminação da água e solo, intoxicação de produtores rurais e consumidores. Hoje, algumas dessas formulações foram proibidas, favorecendo a busca da substituição gradativa das respectivas substâncias. (SIEGWART et al., 2015; RAJASHEKAR et al., 2016). Estudos relacionam a exposição desses inseticidas a alterações bioquímicas e hormonais em pulverizadores de algodão e problemas hepáticos e renais em animais experimentais expostos a estes (SONI et al., 2011; ABBASSY et al., 2014).

Os inseticidas naturais, por sua vez, na forma de extratos e óleos vegetais, com solventes orgânicos são constituídos de uma mistura complexa de compostos ativos voláteis, lipofílicos, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas, e de natureza terpênica, como os mono e sesquiterpenos ou fenilpropanóides (UPADHYAY, 2016). Além desses, podem ser encontrados, limonoides, furanocumarinas, cromenos, alcaloides e acetogeninas (VIEIRA; MAFEZOLI; BIAVATTI, 2007).

O interesse pelos inseticidas botânicos é uma resposta alternativa à necessidade da busca de novas substâncias no controle de pragas, que não afetem negativamente, com tanta intensidade quanto os inseticidas químicos, o meio ambiente e os humanos que nele vivem. Estas substâncias são mais rapidamente degradáveis que os compostos sintéticos, por muitos desses serem sensíveis à luz solar, umidade ou ao calor (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016).

Hoje, existe uma percepção na sociedade que o uso de plantas, seja para qualquer finalidade, é seguro, barato e eficaz. No entanto, a utilização destas é restrita a plantas conhecidas e identificadas (COLOMBO et al., 2010). A identificação das plantas e o vasto conhecimento de suas propriedades são de grande importância para o contorno dos efeitos adversos que podem causar aos organismos vivos não alvos (CAMPOS et al., 2016).

Os inseticidas naturais não possuem uma seletividade e segurança absoluta, possuindo em sua constituição alguns componentes tóxicos, como nicotina e arsênico, que já foram usados historicamente e que hoje são considerados obsoletos (MOSSA; MOHAFRASH; CHANDRASEKARAN, 2018).

Vendramim e Castiglioni (2000) apontam que hoje as pesquisas que envolvem a investigação de atividades inseticidas em vegetais possuem a tendência de serem direcionados a descoberta de novas moléculas que possam ser utilizadas como modelo para síntese de novos bioinseticidas, que sejam menos tóxicos e com uma menor persistência no ambiente. No entanto, essa tendência acaba negligenciando as pesquisas das moléculas já existentes, gerando resultados insatisfatórios (ISMAN, 2006).

Hoje o maior desafio entre os pesticidas é encontrar uma alternativa ecológica que seja economicamente viável e associada a impactos ambientais reduzidos (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016). Ressalta-se a importância dos testes toxicológicos, já que utilização em larga escala e descontrolada de pesticidas botânicos e sintéticos podem gerar toxicidade aguda e efeitos sub-letais em insetos benéficos responsáveis pelo controle natural de pragas e polinização, gerando assim, o desequilíbrio ecológico da região (NDAKIDEMI; MTEI; NDAKIDEMI, 2016).

Logo, a elucidação dos compostos ativos, isolados e seus mecanismos de ação, propicia uma maior efetividade no desenvolvimento de novos produtos naturais comerciais (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016). Além do mais, o estudo desses metabólitos permite, paralelamente, a maior compreensão da evolução da interação planta-inseto. Visto que os metabólitos secundários constituem uma ferramenta de adequação e representam características adaptativas a espécies de planta frente ao controle dos seus degradadores (WINK, 2003).

2.3 *Agave sisalana*

A *Agave sisalana*, nomeada popularmente como sisal, é uma planta originária do México, fazendo parte da família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea*, gênero *Agave* e subgênero *Euagave*. A planta é uma monocotiledônea, com sistema radicular majoritariamente fibroso, com folhas de forma linear lanceolada, destituída de pecíolo, rígida, com superfície côncava, de cor verde escuro, comprimento entre 120 e 160cm e com único acúleo nas extremidades da folha (EMBRAPA ALGODÃO , 2008)

Segundo a literatura, a planta se adequa em regiões onde a pluviosidade não é elevada e que a temperatura diurna gire em torno de 20° C a 28°C. No território brasileiro, os estados da Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará se destacam na produção sisaleira do país, representando 97,07%, 2,83%, 0,08% e 0,01%, respectivamente (IBGE, 2018).

Figura 4- Plantação de sisal (*Agave sisalana*).



Fonte:Odilon Reny R. F. da Silva, 2008.

A agaveicultura é responsável pela produção uma fibra dura e grossa de cor creme ou amarelado, no qual é considerada como principal fonte de renda para os pequenos agricultores. A fibra é o principal produto desta cultura, representando aproximadamente 4% do peso fresco da folha e os resíduos sólidos e líquidos 96% da planta, incluindo 81% do suco do sisal. No artesanato, a fibra é utilizada na manufatura de peças, cuja confecção de cordas de sisal dão origem a chapéus,

bolsas, luminárias e outros produtos. Já na indústria, a fibra é convertida em fios, barbantes, cordas, tapete, mantas. Além destes exemplos, a fibra do sisal pode ser empregada também na indústria automotiva, de móveis, eletrodoméstico e construção civil. Os resíduos do sisal, por sua vez, são utilizados como adubo e alimento animal, desde que seja os resíduos do desfibramento, pois quando utilizado na forma natural da planta, pode causar problemas digestivos aos animais, devido a grande quantidade de fibra e suco (SILVA et al., 2019).

O suco do sisal, por sua vez, é aproveitado contra patógenos e pragas de importância médica, veterinária e agrícola. Seu efeito tóxico é conhecido na literatura contra moluscos, ácaros, insetos e helmintos (LOPES et al., 2018; MWALE; MASIKA, 2015; NUNES et al., 2015). Em alguns estudos, as saponinas contidas no extrato aquoso da *Agave sisalana* demonstraram atividade contra larvas de *Ae. aegypti* (NUNES, 2013; NUNES et al., 2015). O interesse da atividade farmacológica e inseticida da planta advém da presença das saponinas glicosídicas, considerada como de grande interesse para a investigação científica. Além do mais, há outros metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos, flavonoides e taninos, associados a defesa da planta e a atividades biocidas (JESUS et al., 2015).

2.4 Teste de toxicidade

A toxicologia consiste no estudo dos efeitos nocivos decorrentes da interação de substâncias com os organismos, o que pode incluir desde alterações genéticas, imobilidade, deformidades e até a letalidade (PIMENTEL et al., 2011). A toxicologia pode ser compreendida por áreas de atuação, tais como: toxicologia clínica, a qual estuda os efeitos de drogas em pacientes humanos; toxicologia forense, investiga o uso ilegal de agentes tóxicos para fins judiciais e a toxicologia ambiental, a qual investiga o impacto de agentes tóxicos, seus metabólitos, produtos de degradação no ambiente e seus efeitos contaminantes sobre os organismos e populações (BUENO; PIOVEZAN, 2015; KENDALL et al., 2001; ZAKRZEWSKI, 1994).

A determinação da toxicidade segue através de bioensaios determinados por linha evolutiva a partir de testes mais simples, de curta duração, até os mais complexos, de longa duração. Apesar de existirem diferenças entre as metodologias, os testes regem o mesmo plano experimental, no qual organismos são expostos a diferentes concentrações da solução-teste (COSTA et al., 2008; RIBO, 1997). Os

testes toxicológicos podem ser classificados em agudo, sub-crônico e crônico, conforme a sua duração. Os testes agudos são realizados em curtos períodos (48h-96h), no qual são normalmente analisados a mortalidade ou a imobilização dos organismos e, paralelamente, a determinação da concentração da substância-teste que produz o efeito tóxico. Os testes de toxicidade sub-crônica são empregados para determinar a toxicidade susceptíveis a exposições repetidas de várias semanas a vários meses. Subsequentemente, os testes crônicos consistem na detecção dos efeitos sub-letais da substância-teste em um período longo de tempo, parte da vida do organismo em teste (ANDRADE, 2004).

No laboratório, os testes de toxicidade são realizados, em condições experimentais específicas e controladas, em organismos bioindicadores. Diferentes espécies podem ser utilizadas como bioindicadores para avaliar diferentes tipos de toxicidade tais como: camundongos, coelhos, peixes e crustáceos. Entre os organismos-teste para os ensaios de toxicidade, algumas espécies são as mais utilizadas, entre os que se destaca, o peixe-zebra (*Danio rerio*), figura 5 (BUENO; PIOVEZAN, 2015). Esta espécie possui preferência nos ensaios ecotoxicológicos devido ao seu desenvolvimento embrionário rápido, a taxa reprodutiva elevada e seu pequeno tamanho, possibilitando fácil manejo e baixo custo de manutenção (CAVALCANTE, 2017).

Figura 5- Embrião de peixe zebra (*Danio rerio*).



Fonte: Autoria própria.

Além do mais, a espécie *Danio rerio* possui grande sensibilidade quando exposta a produtos químicos, devido a sua capacidade de absorver rapidamente os

compostos que são adicionados na água e acumulá-los nos seus tecidos (ALBINATI, 2009; SANT`ANNA, 2009). Existe um vasto conhecimento científico sobre a espécie na literatura, sendo estudada no campo da genética molecular, da biologia dos vertebrados, bem como em neurobiologia e na investigação genética (OLIVEIRA, 2009; KIMMEL, 1995).

Os testes de ecotoxicidade com embriões e adultos podem ser utilizados para testes de solventes, metais pesados, produtos farmacêuticos e pesticidas (OLIVEIRA, 2009). Os bioensaios com o *D. rerio* são descritos em protocolos da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) e *Environmental Protection Agency*. U. S. (1996a).

Além do peixe, vários outros estudos sobre organismos e sua sensibilidade a determinadas substâncias foi observado, tal como a utilização de alguns microcrustáceos, em específico, a *Artemia salina*- figura 6 (SARAH; ANNY; MISBAHUDDIN, 2017; SOUZA et al., 2015). A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca e família Artemiidae, de água salgada, utilizado como bioindicador devido sua capacidade de resposta nítida frente a pequenas variações na qualidade do ambiente, sua praticidade de manuseio e cultivo e por ser um método rápido e barato (ABEL, 1989; CARVALHO et al., 2009; HNAME; KAVIYARASU; SIDDHARDHA, 2020). *A. salina* é compreendida como uma das espécies para a avaliação de toxicidade aguda pelo *US Environmental Protection Agency* (EPA, 2002; GAMBARDELLA et al., 2014).

Figura 6- Naúplios de *Artemia salina*.



Fonte: Autoria própria.

Os ensaios de toxicidade que envolvem a *Artemia salina* consiste em avaliar a toxicidade aguda da substância-teste e por isso considerado como fator determinante em bioensaios preliminares (COLEGATE; MOLYNEUX, 1993; NTUNGWE et al., 2020). Diante do cenário, é evidente ressaltar a importância destes ensaios ecotoxicológicos nos possíveis produtos que serão oferecidos à sociedade, a fim de avaliar os possíveis impactos destes no ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar a toxicidade do extrato bruto liofilizado de *Agave sisalana*, para organismos não alvos, visando desenvolver um bioinseticida contra o mosquito *Ae. aegypti*.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a toxicidade do extrato liofilizado de *A. sisalana* em náuplios de *Artemia salina*;
- Investigar a toxicidade do extrato liofilizado de *A. sisalana* em embriões de peixe-zebra.

4 METODOLOGIA

4.1 Substância-teste: Extrato liofilizado da *A. sisalana*

O extrato liofilizado foi fornecido pronto pela Embrapa Algodão-Campina Grande. O mesmo foi obtido por meio de moagem das folhas da *A. sisalana* em moinho manual até a completa extração da seiva clorofilada. Em seguida, o extrato foi coado e acondicionado em recipiente de vidro, ao abrigo da luz e congelado à -30°C . Posteriormente foi submetido à pressão negativa para retirada da água e obtendo assim o extrato liofilizado, em forma de pó. (Figura 7).

Figura 7- Extrato liofilizado da *Agave sisalana*.



Fonte: Acervo Lapavet.

4.2 Bioensaios

4.2.1 Ensaio de toxicidade com náuplios de *Artemia salina*

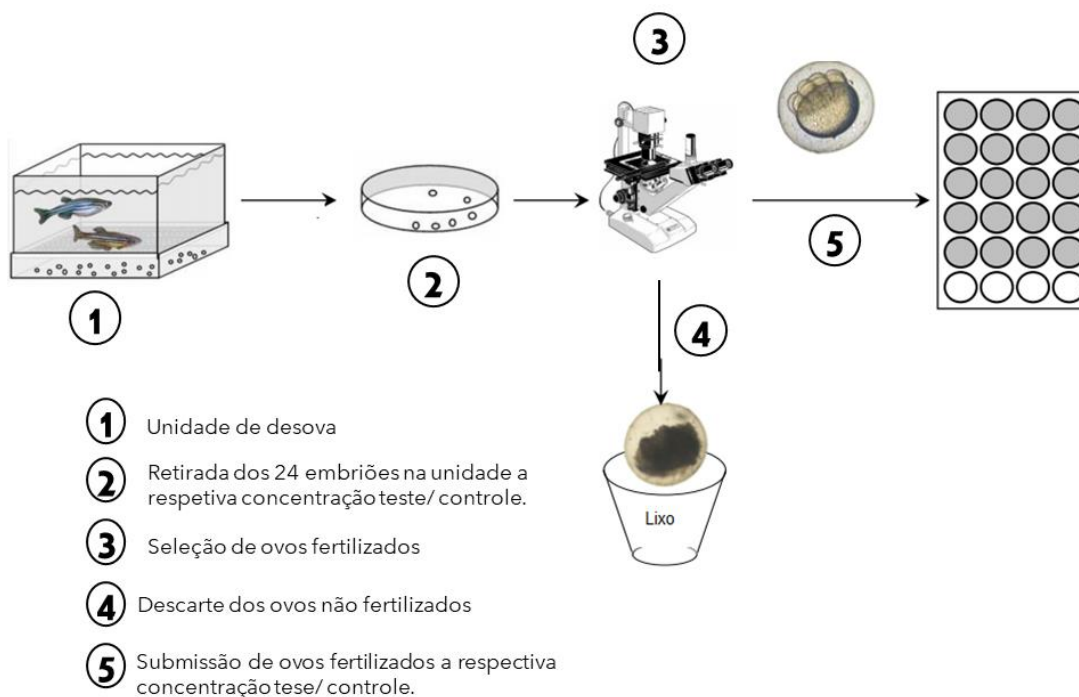
O ensaio de toxicidade foi realizado com náuplios de *Artemia salina*, através da adaptação da metodologia de Meyer (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 30 g L^{-1} . O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25°C . Vinte larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo as concentrações diferentes de 2 mg/mL , $1,0\text{ mg/mL}$, $0,5\text{ mg/mL}$, $0,250\text{ mg/mL}$, $0,125\text{ mg/mL}$ do extrato liofilizado de *A. sisalana*. Para o controle negativo, foram utilizados vinte larvas de

A. sisalana com solução salina que os náuplios eclodiram. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas.

4.2.2 Ensaio de toxicidade com embriões de peixe-zebra

O ensaio de toxicidade foi realizado com a embriões de peixe-zebra, através da metodologia adaptada da OECD (2013). Embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*) foram obtidos por cruzamentos naturais entre fêmeas e machos adultos mantidos a 27 °C e pH de 7,5. Após 6h da fertilização, os embriões foram observados em um estereomicroscópio. Embriões mortos ou com mal-formações foram excluídos do teste. Embriões com desenvolvimento normal foram transferidos individualmente para poços de uma placa com 24 poços com 2,5mL de água do sistema. No grupo teste (n=20 embriões), a água do sistema foi substituída por água contendo concentrações de 2 mg/mL ,1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,250 mg/mL, 0,125 mg/mL do extrato liofilizado de *A. sisalana*, figura 8. Cada placa continha controles negativos internos (embriões expostos à água de controle, n = 4 embriões).

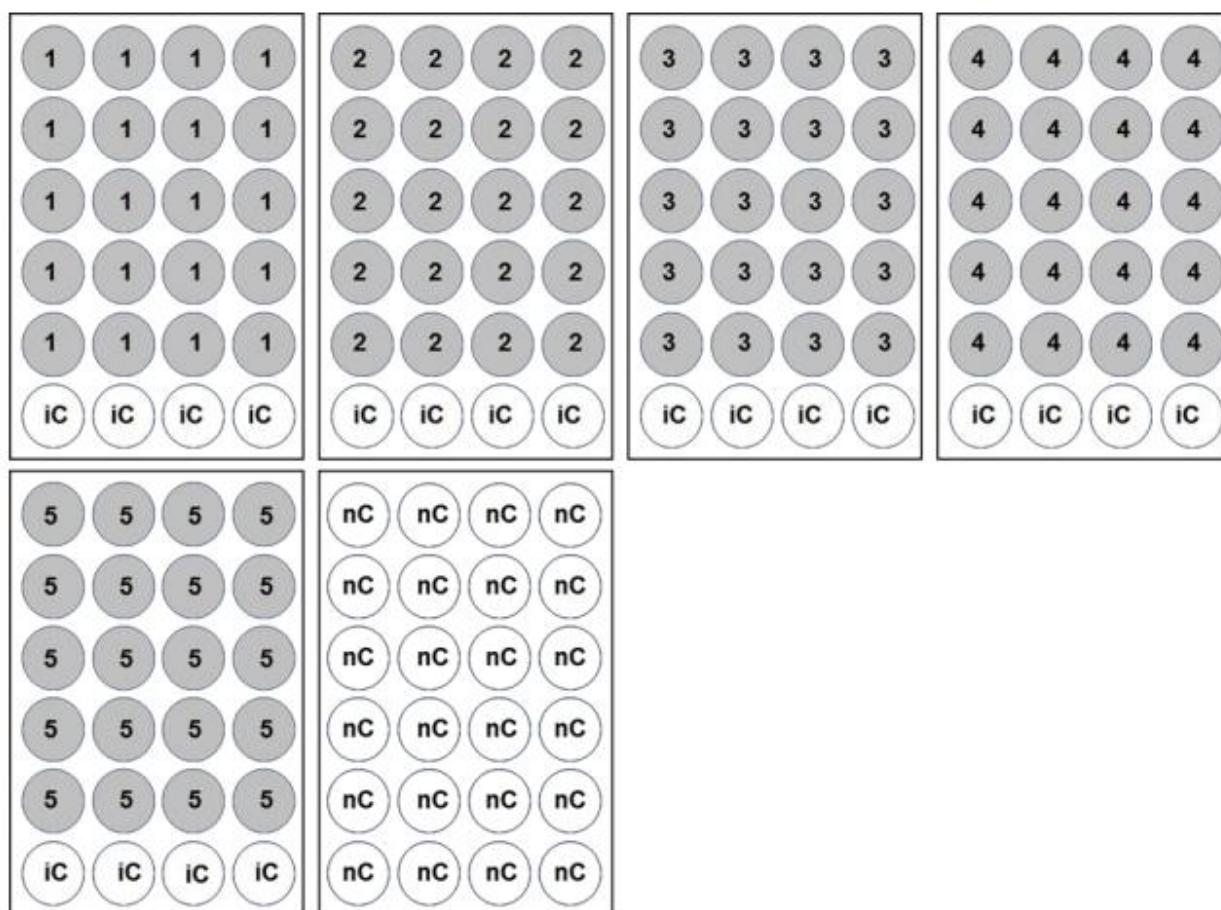
Figura 8- Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra.



Fonte: adaptado do OCDE 2013.

No grupo controle negativo (n = 24 embriões) foi utilizado da água que os embriões foram depositados na unidade de desova (figura 9). O teste de embriotoxicidade foi realizado a 26 ° C e fotoperíodo 12h: 12h claro: escuro. A taxa de mortalidade e taxa de teratogenicidade durante o desenvolvimento dos embriões do peixe-zebra foram determinadas nos seguintes pontos: 48h, 72h, 96h e 120h após fertilização. Os embriões foram observados sob um estereomicroscópio a cada 24 horas para efeitos letais e subletais (Lammer et al., 2009; OECD, 2013). Os protocolos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB (protocolo 5869060519).

Figura 9- Distribuição da placa dos testes de toxicidade do embrião do peixe-zebra.



.Legenda: 1-5 concentrações testadas; nC: Controle negativo; iC: Controle interno da placa.

Fonte: adaptado da OCDE 2013.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

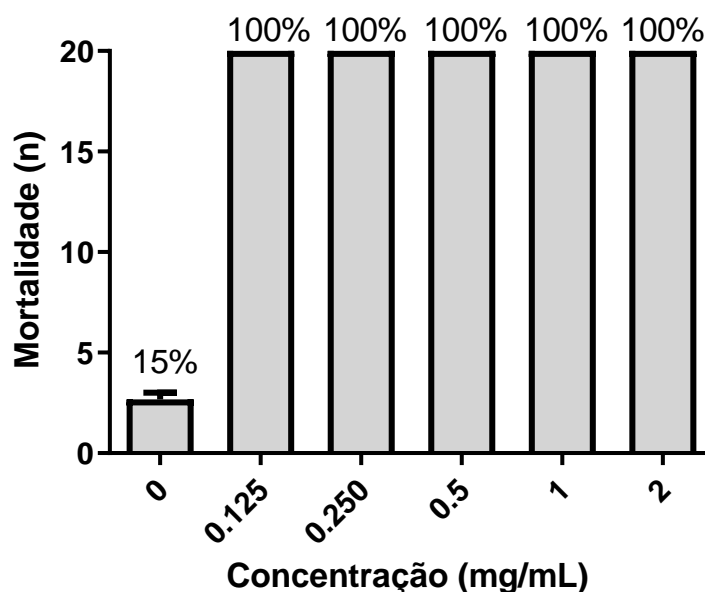
A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças entre os grupos foram analisadas por meio de ANOVA e post-Tukey test ($P < 0.05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar os efeitos do extrato liofilizado da *Agave sisalana* sobre os organismos não-alvos, foram realizados testes de toxicidade em náuplios de *Artemia salina* e embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*). Os resultados mostraram que o extrato liofilizado da *Agave sisalana* possui toxicidade nas larvas da *Artemia salina* e para os embriões de peixe-zebra.

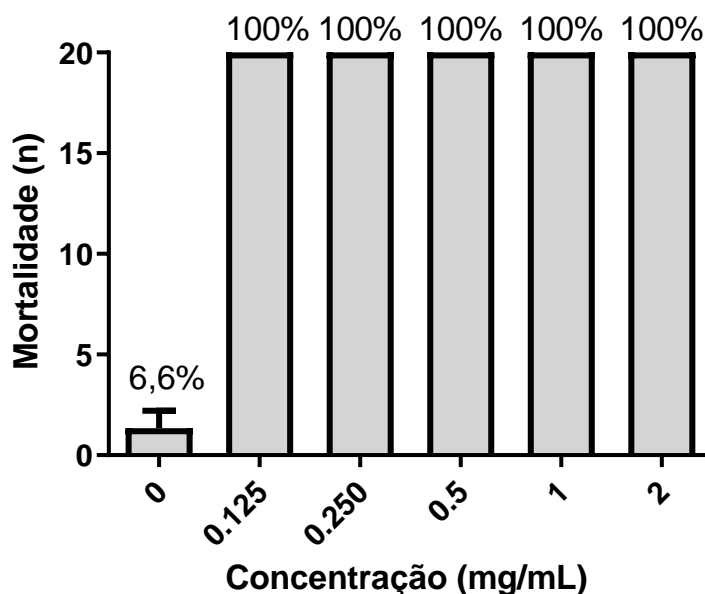
Para avaliar a taxa de toxicidade à *Artemia salina* foram testadas as concentrações de 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,250 mg/mL e 0,125 mg/mL do produto teste. Os resultados mostraram que as concentrações de 2 a 0,125 mg/mL do extrato liofilizado da *A. sisalana* causaram a mortalidade de 100% do número de artemias expostas à substância-teste em 24 horas (figura 10).

Figura 10- Ensaio de toxicidade com *Artemia salina* em 24 horas.



Ao avaliar os efeitos do extrato liofilizado de *A. sisalana* sobre os embriões do peixe-zebra, os resultados mostraram que o extrato possui toxicidade nos embriões do peixe-zebra. Os resultados mostraram que nas concentrações de 2 a 0,125 mg/mL apresentaram toxicidade e 100% dos embriões expostos a substância-teste em 24 horas apresentaram coagulação (figura 11). Como não houve variação entre os grupos, não foi possível aplicar a análise de variância, como análise estatística prevista.

Figura 11- Embriotoxicidade em peixe-zebra em 24 horas.



A busca por novas ferramentas e estratégias para o combate ao mosquito *Ae aegypti*, ou o seu desenvolvimento, é essencial para diminuir a taxa de propagação dos arbovírus que o mosquito é capaz de disseminar na sociedade. Na natureza, por exemplo, diversas plantas possuem potenciais substâncias, advindos da produção de metabólitos secundários, capazes de combater o *Ae aegypti*. Na pesquisa científica, é crescente a obtenção de produtos preparados a partir destas, como extrato e óleos essenciais, para o controle biológico (MOTTI; PORTO; ROEL, 2015). Entre os estudos, podem ser observados a ação inseticida contra o *Ae. aegypti*, dos extratos de plantas das espécies *Hyptis suaveolens*, *Lantana camara*, *Nerium oleander*, *Tecoma stans*, *Helicteres velutina* K. Schum e *Agave sisalana* (FERNANDES et al., 2020; HARI; MATHEW, 2018; NUNES, 2013). No entanto, estes metabólitos secundários nem sempre possuem uma especificidade na toxicidade em uma única espécie, sendo assim, são essenciais os testes de toxicidade das substâncias para organismos não-alvos (CAMPOS et al., 2016).

Em estudos prévios, o extrato liofilizado de *A. sisalana*, foi utilizado contra as larvas de *Aedes aegypti* apresentando uma elevada toxicidade (SOUSA, 2017). No estudo em questão, o extrato apresentou uma mortalidade de 100% da população de larvas do mosquito, na concentração letal de 0,8 mg/mL, enquanto as doses de 0,7 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,3 mg/mL e 0,25 mg/mL causaram a morte de 90%, 80%, 11,5%, 1,6% e 0% respectivamente. A partir do valor da concentração de maior

efeito letal populacional, foi elaborado testes de toxicidade para avaliar os efeitos do extrato sobre organismos não-alvos.

Segundo Costa et al. (2008), a toxicidade é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo, no qual depende diretamente da concentração, das propriedades da substância e do tempo de exposição. Na avaliação da toxicidade de uma amostra, é recomendado que o produto seja testado em mais de uma espécie representativa da biota aquática e, preferencialmente, em diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (RIBO, 1997). Na base da cadeia alimentar do ecossistema estão os produtores (algas), consumidores primários (microcrustáceos) e consumidores secundários (peixes), subsequentemente. Nesse estudo, foram abrangidos testes em organismos pertencentes ao segundo (*Artemia salina*) e ao terceiro nível (embriões de peixe-zebra) da cadeia alimentar.

No estudo em questão, o extrato liofilizado da *Agave sisalana* é tóxica para os náuplios de *Artemia salina* e embriões do peixe-zebra. A toxicidade permaneceu em todas as concentrações testadas de 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,250 mg/mL e 0,125 mg/mL, com uma taxa de mortalidade de 100% para as artemias e embriões de peixe-zebra, ao longo de 24 horas. Diante o exposto, é preciso ressaltar que o extrato liofilizado da *Agave sisalana* pode conter outras substâncias que também contribuíram para esta elevada toxicidade, além do princípio ativo identificado tóxico para as larvas de *Aedes aegypti*. Logo, no futuro, este estudo será repetido usando o princípio ativo isolado capaz de combater o *Aedes aegypti* para a finalização dos testes de toxicidade.

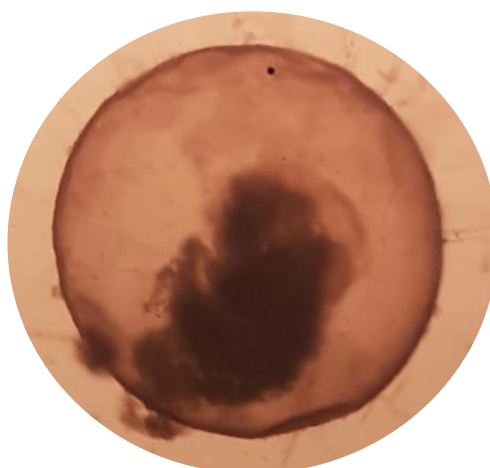
Nos testes *in vivo* com *A. salina* foi visto que o extrato liofilizado da *A. sisalana* apresenta uma alta toxicidade até mesmo na menor concentração testada (0,125 mg/mL). No entanto, esses resultados podem indicar uma possível atividade biológica do composto, como antimicrobiano e anticancerígeno (ROSA et al., 2016). Potencial biológico este visto em diversos estudos que envolvem a planta, como antioxidante, antiparasitário, antifúngico e antiinflamatória (ARALDI et al., 2018; CARDOSO, 2019; DOMINGUES et al., 2010).

Já nos testes que envolveram os embriões de peixe-zebra, foi possível observar a toxicidade aguda do extrato liofilizado frente aos embriões que sofreram uma taxa de 100% de coagulação em todas as concentrações testadas (figura 12). Segundo a OECD (2019), a determinação da toxicidade é determinada a partir do

resultado positivo de qualquer um dos quatro *endpoints* apicais utilizados como indicadores de letalidade, nos quais incluem: a coagulação dos ovos, a falta de formação de somito, ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelino e falta de batimentos cardíacos, quando são testados em larvas do peixe-zebra.

Diante da toxicidade aguda apresentada, é importante ressaltar que a sensibilidade ao produto testado pode estar limitada a esta fase de desenvolvimento do peixe-zebra, já que estes são mais sensíveis que juvenis ou adultos, ou seja, o extrato liofilizado pode não apresentar o efeito tóxico para os jovens e adultos do peixe-zebra. Nos testes de toxicidade de Rahman et al. (2020), por exemplo, foi visto esta sensibilidade apenas aos embriões quando comparado as larvas do peixe-zebra, quando testado um organofosforado sintético (Sumithion), inseticida agrícola amplamente utilizado para o controle do percevejo. Observação esta vista também no estudo de Silva et al. (2017), quando testado com a lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleífera*, agente larvicida de mosquito (*Ae. aegypti*).

Figura 12- Embrião coagulado pós exposição do extrato liofilizado da *Agave sisalana*.



Fonte: Autoria própria.

No estudo de Domingues et al. (2010), por exemplo, ao avaliar a capacidade do suco do sisal contra nematódeos gastrintestinais e sua possível toxicidade em caprinos, foi visto que além da eficácia anti-helmíntica, o suco na dose de 0,92 g.kg⁻¹ não causou efeitos tóxicos visíveis nos animais quando tratados via oral. Tal fato possivelmente explicado porque em geral as saponinas apresentam toxicidade reduzidas quando administradas por via oral, devido a sua má absorção no trato

gastrointestinal (PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987). Diante do exposto, é possível observar que os testes com o extrato liofilizado da *A. sisalana* foram realizados com animais menos desenvolvidos na linha evolutiva, quando comparamos aos mamíferos (caprinos), que foram submetidos ao mesmo produto e que, aparentemente, não houve toxicidade. Logo, pode-se ressaltar que há a possibilidade do suco do sisal ser atóxico para os seres humanos.

Diante do que foi exposto, é preciso ressaltar que apesar da toxicidade do extrato liofilizado da *Agave sisalana* sobre organismos menos desenvolvidos, o extrato é um ótimo candidato para substituir os inseticidas sintéticos existentes no mercado. Sua toxicidade ressalta apenas a sua não seletividade frente ao organismo alvo (*Ae. aegypti*), assim como outros produtos utilizados para o controle do mosquito, como o Pesguard FG161, constituído por piretróides sintéticos (d-tetrametrina e cifenotrina); o Pyriproxyfen, pesticida à base de substância orgânica (piridina) ou até mesmo agentes larvicidas advindas de sementes de plantas, como *Moringa oleífera* (MENDIS; TENNAKOON; JAYASINGHE, 2018; SILVA et al., 2017; TRUONG et al., 2016).

A contaminação de substâncias tóxicas nos ambientes aquáticos podem afetar os organismos testados e se propagar pelos demais componentes dos ecossistemas. Os efeitos deletérios vistos nos experimentos podem provocar modificações: nas características e dinâmica das populações existentes, como a reprodução migração e mortalidade das espécies; na disposição e função das comunidades, afetando a diversidade das espécies ou modificações na relação predador-presa ou atpe mesmo alteração características do ecossistema, como fotossíntese ou fluxo de nutrientes (CONNELL e MILLER, 1984). Logo, tendo em vista a toxicidade para as espécies testadas, especialmente peixes e microcrustáceos, a aplicação do extrato liofilizado da *Agave sisalana* afim de combater as larvas de *Aedes aegypti* deve ser evitada em corpos de água em que existam outras espécies.

7 CONCLUSÃO

Este estudo contribui com informações importantes sobre a toxicidade do extrato de *A. sisalana* em outras espécies de animais que não o mosquito *Ae. aegypti*. Diante dos resultados apresentados no decorrer do estudo, conclui-se que o extrato liofilizado da *Agave sisalana* causa efeitos letais em embriões de peixe-zebra e náuplios de *Artemia salina* mesmo em concentrações muito abaixo da concentração necessária para observar letalidade em mosquitos *Ae. aegypti*. Logo, a aplicação deste extrato afim de combater as larvas de *Aedes aegypti* deve ser evitada em corpos de água em que existam outras espécies, especialmente peixes e microcrustáceos, tendo em vista sua toxicidade para as espécies testadas. Por fim, como perspectivas futuras, novos testes devem ser realizados, tanto em outras fases dos organismos testados, bem como com o isolamento do princípio ativo inseticida do extrato e, assim, novos testes de toxicidade afim de comprovar sua segurança.

REFERÊNCIAS

- ABBASSY, M. A. et al. Adverse biochemical effects of various pesticides on sprayers of cotton fields in El-Behira Governorate, Egypt. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 3, p. 251-256, 2014.
- ABEL, P. D. **Water Pollution Biology**. Chichester: Ellis Horwood Ltd, 1989. 231 p.
- ALBINATI, A. C. L. E. A. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 621-627, June 2009. ISSN 1678-4162.
- ALKOFAHI, A. et al. Search for new pesticides from higher plants. In: ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; MORAND, P. **Insecticides of Plant Origin**. Washington: [s.n.], v. 387, 1989. Cap. 3, p. 25-43.
- ANDRADE, R. M. S. L. D. **Efeitos da exposição de peixe zebra, *Danio rerio*, a um efluente têxtil**. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, p. 100. 2004.
- ARALDI, R. P. et al. Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of *Agave sisalana* Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 873-85, Feb 2018.
- BOEKE, S. J. et al. Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 423-438, 2004.
- BROGDON, W.; MCALLISTER, J. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605-613., 1998.
- BUENO, A. C.; PIOVEZAN, M. **Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia**. IFSC. 2015.
- CAMPOS, S. C. E. A. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Bocatú, v. 18, n. 1, 2016.
- CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 373-382, 2016.
- CARDOSO, M. S. PANORAMA TECNOLÓGICO DE USO DE RESÍDUOS DO SISAL. **SEMIOSSES: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 13-23, Jul/Set 2019.
- CARVALHO, C. et al. CIPÓ-CRAVO (*TYNNANTHUS FASCICULATUS* MIERS – BIGNONIACEAE): ESTUDO FITOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO ENVOLVENDO ARTEMIA SALINA. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, Março 2009. ISSN 1808-0804.
- CAVALCANTE, A. K. **Avaliação da Ecotoxicidade do resveratrol no estágio embriolarvar de peixes de espécie *Danio rerio***. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, p. 110. 2017.
- COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**. 1. ed. London: CRC Press, 1993.
- COLOMBO, M. L. et al. Most commonly plant exposures and intoxications from outdoor toxic plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 7, p. 417-25, 2010.
- CONSOLI, R. A. G. B. et al. Influence of several plant extracts on the oviposition behaviour of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) in the laboratory. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 47-51, 1989.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Mosquitos de importância sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, v. 1, 1994.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. D. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994. 228 p. ISBN 978-857541-290-9.

CORREA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, 2011.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quimi Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, E. et al. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 26, n. 2, p. 173-185, 2004.

COSTA, F. M. D. Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos diflubenzuron contra **Anopheles darlingi** ROOT, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE), em condições de laboratório. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2007.

DOMINGUES, L. F. et al. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of Agave sisalana (sisal) in goats. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** (, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 270-72, oct/dec 2010.

EMBRAPA ALGODÃO. **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Embrapa Algodão - Circular Técnica (INFOTECA-E). Campina Grande, p. 25. 2008. (0100-6460).

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S.,. Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine. **Ecological effects Test Guidelines.**, p. 712-C-96-118, 1996a.

EPA. Methods for Measuring the Acute Atoxicity of Effluentes to Freswater and Marine Organims. **Office od Water**, Cincinnati, n. 5, oct 2002. ISSN EPA-821-R-02-012.

FARJANA, T.; TUNO, N. Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J Med ntomolog**, v. 50, n. 4, p. 838-846, Julho 2013.

FERNANDES, D. A. et al. New Sulphated Flavonoids and Larvicidal Activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae). **MOLECULES**, v. 23, p. 2784, 2018.

FERNANDES, D. A. et al. Insights on the Larvicidal Mechanism of Action of Fractions and Compounds from Aerial Parts of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3015, jul 2020.

FERREIRA, M. et al. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 5, p. 589-590, 2019.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 4, 1973.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, v. 2, 2002.

GAMBARDELLA, C. et al. Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on *Artemia Salina* Larvae: Evaluation of Mortality and Behavioural and Biochemical Responses. **Environ Monit Assess**, v. 187, n. 7, p. 4249-4259, jul 2014.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BATESTI, D. M. B. **Extorparasitas de importância veterinária**. São Paulo: Pleiade, v. 1, 2001.

HARI, I.; MATHEW, N. Larvicidal activity of selected plant extracts and their combination against the mosquito vectors *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Environmental Science and Pollution Research volume**, v. 25, n. 1, p. 9176-9185,

feb 2018.

HNAMTE, S.; KAVIYARASU, K.; SIDDHARDHA, B. Evaluation of Toxicity of Nanoparticles Using Brine Shrimp. In: SIDDHARDHA, B.; DYAVAIHAH, M.; KASINATHAN, K. **Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles**. 1. ed. Singapore: Springer , 2020. Cap. 19, p. 401-416.

HUSSAIN, M. et al. Role of Saponins in Plant Defense Against Specialist Herbivores. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2067, jun 2019.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal:Tabela 5457- área colhida e quantidade produzida de sisal ou agave (fibra). **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/5457#resultado>>. Acesso em: 09 set. 2020.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise? **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 233-249, jan 2020.

JACOBSON, M. **Insecticides from plants: A review of the literature 1954-1971**. Washington DC: Agricultural Research Service, United States Dept. of Agriculture, 1975. 142 p.

JESUS, F. N. et al. Control of the banana burrowing nematode using sisal extract. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 1, p. 783-791, April 2015.

KENDALL, R. J. et al. Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons**. 6. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Professional Publishing, 2001. Cap. 29, p. 1454.

KIMMEL, C. B. W. . K. S. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Development Dynamics**, Julho, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KNIGHT, K. L.; STONE, A. **A catalog of the mosquitoes in the world**. 2^a. ed. [S.l.]: Entomological Society o America, 1977.

KYLE , J. L.; HARRY, E. Global spread and persistence of dengue., California, 62, Outubro 2008. 71-92.

LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará,Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LOPES, R. S. et al. Efficacy of Libidibia ferrea var. ferrea and Agave sisalana Extracts against Dactylopius opuntiae (Hemiptera: Coccoidea). **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 4, p. 13, March 2018. ISSN 1916-9760.

LUCENA, I. V. et al. Atividade adulticida do veneno de Rhinella marina (Anura:Bufonidae) sobre Anopheles darlingi (Diptera:Culicidae). **Revista Fiocruz Rondônia**, Rondônia, v. 1, p. 1, 2011.

MCMENIMAN, C. J. et al. Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito Aedes aegypti. **Science** , v. 323, n. 5910, p. 141-144, Jan 2009.

MENDIS, J. C.; TENNAKOON, T. K.; JAYASINGHE, C. D. Zebrafish Embryo Toxicity of a Binary Mixture of Pyrethroid Insecticides: d-Tetramethrin and Cyphenothrin. **Journal of Toxicology**, v. 2018, n. Article ID 4182694, p. 8pg, 2018.

MENEZES, E. D. L. A. **Inseticidas Botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205. Seropédica, p. 58. 2005. (1517-8498).

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MORAIS, L. A. S. D.; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com Atividade Inseticida. In: EMBRAPA **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. 1. ed. Brasília: Embrapa, v. 1, 2016. Cap. 19, p. 542-594.

MORAIS, S. M. D. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Rev. bras. farmacogn**, João Pessoa, v. 15, p. 2005, June 2005.

MOREIRA, M. F.; FIGUEIRA-MANSUR, E. J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: INCTEM **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. 1. ed. 23: [s.n.], 2012. Cap. 15.

MOSSA, A.-T. H.; MOHAFRASH, S. M. M.; CHANDRASEKARAN, N. Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 17, 2018.

MOTTI, P. R.; PORTO, K. R. D. A.; ROEL, A. R. Toxicidade da formulação obtida a partir do líquido da castanha do caju *Anacardium occidentale* L. em *Artemia salina* Leach. **Antonia Railda Roel Multitemas**, Campo Grande, v. 47, p. 9-19, Jan/jun 2015.

MWALE, M.; MASIKA, P. J. In vivo anthelmintic efficacy of *Aloe ferox*, *Agave sisalana*, and *Gunnera perpensa* in village chickens naturally infected with *Heterakis gallinarum*. **Tropical Animal Health and Production** volume, v. 47, n. 1, p. 131-138, 14 October 2015.

NDAKIDEMI, B.; MTEI, K.; NDAKIDEMI, P. A. Impacts of Synthetic and Botanical Pesticides on Beneficial Insects. **Agricultural Sciences**, v. 7, n. 6, p. 364-372, 2016.

NTUNGWE, E. et al. *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, p. 1-17, 2020.

NUNES, F. C. et al. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. **Parasitology Research**, v. 114, p. 543-549, November 2015.

NUNES, F. D. C. **Estudo da Atividade Larvicida da *Agave sisalana* contra larvas de *Aedes aegypti***. Rede Nordeste de Biotecnologia. João Pessoa, p. 115. 2013.

NUNES, F. D. C. et al. BIOTECNOLOGIA NO CONTROLE DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE ARBOVIROSES: BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA EM MOSQUITOS ADULTOS. In: OLIVEIRA, A. C. D. **As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade 2**. [S.l.]: Atena Editora, v. 2, 2019. Cap. 10, p. 94-102.

NUNES, F. et al. Larvicidal activity of *Agave sisalana* against *Aedes aegypti* mosquito, the dengue vector. **BMC Proceedings**, Florianópolis, v. 9, n. 4, p. 10-14, Novembro 2014.

OECD. **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. [S.l.], p. 22. 2013. (20745761).

OECD. **Fish Acute Toxicity Test**. Organisation for Economic Cooperation and Development OCDE. [S.l.], p. 10. 2019. (9789264069961).

OLIVEIRA, R. D. **Zebrafish early life-stages and adults as a tool for ecotoxicology assessment**. Universidade de Aveiro. Aveiro, p. 157. 2009.

OPAS. ***Aedes aegypti*: Biologia y ecologia**. Organização Pan-Americana da Saúde; Organização Mundial da Saúde. Washington, D.C, p. 62. 1986.

PAULA, K. B. D. S. D.; CRUZ-SILVA, C. T. A. D. Formas de uso medicinal da babosa e camomila pela população urbana de Cascavel, Estado do Paraná. **Acta Science: Health Science**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 169-176, 2010.

PIMENTEL, M. F. et al. O Uso de Artemia SP. Como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, Fortaleza, v. 6, n. 1, 2011.

PRATES, H. T.; SANTOS, J. P. Oleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. In: LORINI, I., et al. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 2002. Cap. 7.3, p. 443-461.

PRICE, K.; JOHNSON, I.; FENWICK, G. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 27-135, sep 1987.

QUEIROZ, D. P. N. D.; LAMANO-FERREIRA, A. P. D. N. Diversidade e Uso de Plantas Cultivadas em Quintais Residenciais Urbanos Localizados na Região da Vila Maria, Zona Norte de São Paulo, SP, Brasil. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 4, p. 299-305, 2014.

RAHMAN, M. S. et al. Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish. **Toxicology Reports**, v. 7, n. 1, p. 317-323, 2020.

RAJASHEKAR, Y. et al. 2, 3-Dimethylmaleic anhydride (3, 4-Dimethyl-2, 5-furandione): A plant derived insecticidal molecule from *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L.) Schott. **Sci Rep.**, v. 6, n. 20546, 2016.

RIBO, J. M. *Environ Toxicol Water Qua*, v. 12, n. 1, p. 283, 1997.

ROBERTS, D. R.; HSI, B. P. A Method of Evaluating Ovipositional Attractants of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae), with Preliminary Results. **Journal of Medical Entomology**, v. 14, n. 1, p. 129-131, august 1977.

ROSA, C. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 19-26, mar 2016.

ROSE, R. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 17-23., 2001.

SANT'ANNA, M. C. B. **Zebrafish (Danio rerio) como modelo para estudo da toxicidade**. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL. Porto Alegre, p. 58. 2009.

SARAH, Q. S.; ANNY, F. C.; MISBAHUDDIN, M. Brine shrimp lethality assay. **Bangladesh J Pharmacol**, v. 12, n. 2, p. 186-189, june 2017.

SIEGWART, M. et al. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. **Front Plant Sci.**, v. 6, p. 381, jun 2015.

SILVA, L. L. D. S. et al. Ecotoxicity of water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Chemosphere**, v. 185, p. 178-182, 2017.

SILVA, O. A. B. N. E. et al. EFEITO DE INSETICIDAS REGULADORES DE CRESCIMENTO SOBRE OVOS, LAGARTAS E ADULTOS DE *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEP.: TORTRICIDAE). **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 420-28, jun 2011.

SILVA, O. R. R. F. et al. A cadeia produtiva do sisal no Nordeste Brasileiro. In: XIMENES, L. F.; SILVA, M. S. L. D.; BRITO, L. T. D. L. **Tecnologias de convivência com o semiárido brasileiro**. Fortaleza : Banco do Nordeste do Brasil, 2019. Cap. 1, p. 913-952.

SONI, I. et al. Perinatal Toxicity of Cyfluthrin in Mice: Developmental and Behavioral Effects. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 8, p. 1096-105, aug 2011.

SOUSA, P. A. P. S. D. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO LIOFILIZADO DE AGAVE SISALANA NO DESENVOLVIMENTO DE UM**

BIOINSETICIDA PARA O Aedes Aegypti. UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA. João Pessoa, p. 42. 2017.

SOUZA, A. R. C. D. et al. **USO DA ARTEMIA SALINA COMO BIOINDICADOR NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FÁRMACO CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINA EM SOLUÇÃO SINTÉTICA TRATADA POR PROCESSO DE ELETROCOAGULAÇÃO.** – Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais. Porto Alegre. 2015.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, jan 2002.

TRUONG, L. et al. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish☆. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1089-93, nov 2016.

UPADHYAY, R. K. Botanicals; its safe use in pest control and environmental management. International Journal of Zoological Investigations. **International Journal of Zoological Investigations**, v. 2, n. 1, p. 58-102, 2016.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos.** 1. ed. Santa Maria: UFSM, v. 1, 2000. Cap. 8, p. 113-128.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, E. M. W.. Inseticidas de origem vegetal. In: CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos.** 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2007. p. 105-120.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **An Introduction to Insecticides.** 4. ed. Willoughby, Ohio: MeisterPro Information Resources, 2004.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective.. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vector resistance to pesticides. **Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control**, v. 88, p. 61-62, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance.** World Health Organization. Geneva, p. 129. 1997.

YEAP, H. et al. Dynamics of the “Popcorn” Wolbachia Infection in Outbred *Aedes aegypti* Informs Prospects for Mosquito Vector Control. **Genetics**, v. 187, n. 2, p. 583-95, Feb 2011.

ZAIDI, K. U.; ALI, A. S.; ALI, S. A. Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. **Enzyme Research**, August 2014.

ZAKRZEWSKI, S. F. **Principles of Environmental Toxicology.** Washington: American Chemical Society, 1994. 320 p.

GLOSSÁRIO

| | |
|--------------------------|--|
| Eclodibilidade | Ato de desenvolvimento do ovo para a fase de larva |
| Fase alada | Fase adulta do mosquito |
| Insetário | Local de criação de insetos invertebrados (mosquitos) |
| Liofilização | Processo de desidratação em que o produto é congelado |
| Mesonoto | Parte dorsal do mesotórax dos insetos |
| Naúplio: | Estágio larvar típico da maioria dos crustáceos aquáticos |
| Oviposição | Ato de expelir os ovos realizado por fêmeas de animais |
| Repasto sanguíneo | Atividade alimentar realizados por insetos hematófago sob vácuo. |