



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPESQ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO**

**André Severino da Silva**

**Avaliação inseticida de extratos orgânicos e compostos  
liquênicos em *Aedes aegypti* e *Sitophilus zeamais***

Recife

2020

**ANDRÉ SEVERINO DA SILVA**

**Avaliação inseticida de extratos orgânicos e compostos  
liquênicos em *Aedes aegypti* e *Sitophilus zeamais***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio), da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro – DQF/UFPE

Coorientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão – CAV/UFPE

Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

Recife

2020

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso  
(CRB4 1728)

Silva, André Severino da  
Avaliação inseticida de extratos orgânicos e compostos liquênicos em *Aedes aegypti* e  
*Sitophilus zeamais* / André Severino da Silva – 2020.

92 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro  
Coorientador: Emerson Peter da Silva Falcão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Inseticidas 2. Líquens 3. Milho I. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz (orient.) II.  
Falcão, Emerson Peter da Silva (coorient.) III. Título

632.951

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-202

**ANDRÉ SEVERINO DA SILVA**

**Avaliação inseticida de extratos orgânicos e compostos  
liquênicos em *Aedes aegypti* e *Sitophilus zeamais***

**Aprovado em: 31/07/2020**

**Banca Examinadora**

---

**1º Examinador:** Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro - UFPE

---

**2º Examinador:** Dra. Teresinha Gonçalves da Silva – UFPE

---

**3º Examinador:** Dra. Eugênia Cristina Pereira – UFPE

---

**4º Examinador:** Dr. Thiago Henrique Napoleão – UFPE

---

**5º Examinador:** Dr. Emmanuel Viana Pontual - UFRPE

Dedico este trabalho à minha mãe Estelita Severina dos Santos,  
ao meu pai Severino Francisco da Silva (*in memoriam*) e  
à minha pequena (filha) Ana Vitória Celerino da Silva.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e proteção. Por maiores que fossem os obstáculos, senti a tua presença me capacitando e fortalecendo a cada dia dessa jornada que não foi nada fácil.

Aos meus Pais, Severino Francisco da Silva (*in memoriam*) e Estelita Severina dos Santos, que sempre acreditaram em mim e pela educação transferida. Verdadeiros exemplos de força e superação. Sempre me guiando na caminhada da vida com muito amor, dedicação e carinho. Que mesmo eu distante de casa devido os estudos sempre me apoiaram e incentivaram-se a não desistir de meus sonhos e objetivos.

A minha princesa, Ana Vitória Celerino da Silva, meu maior presente. Seu sorriso e seus abraços nos dias difíceis de experimentos e estresses foram o combustível para fazer-me seguir em frente. Ser sempre recebido com um beijo seu e um “eu te amo Papai”, não tem alegria maior.

A minha esposa Anadeje Celerino dos Santos Silva, pela compreensão e companheirismo. Pelo cuidado com nossa pequena nos momentos de minha ausência. Não foi fácil, mas com sabedoria você soube segurar o barco muitas vezes e ajudar-me na jornada, obrigado.

À Professora Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, minha orientadora, por todo apoio e acolhida nessa jornada, se não fosse a senhora teria sido muito mais difícil chegar ao final. Sei o quanto foi difícil, mas sua dedicação e disposição em ajudar para que eu chegasse até aqui foram enormes. Muito obrigado por ter acreditado nessa ideia, ter sentado comigo quando necessário e ter ajudado a conduzir-me até a conclusão deste trabalho, a senhora toda minha gratidão e admiração.

Ao Professor Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, pelas palavras de orientação e ensinamentos valiosos para a minha carreira acadêmica, crescimento profissional e pessoal. Por sua confiança depositada em meu trabalho e toda sua paciência e sabedoria para ensinar-me. Seu exemplo de dedicação e equilíbrio levarei para a vida. Muito obrigado por tudo o que o senhor fez por mim durante todos esses anos, não foi apenas um professor, mas um verdadeiro amigo e mestre.

À Professora Dra. Claudia Rohde, faltam-me palavras para agradecer a oportunidade que me deu, muito obrigado por acreditar em mim, por abrir as portas do laboratório pela primeira vez e ter feito eu acreditar que seria possível ser um pesquisador e contribuir para o desenvolvimento da sociedade. Se cheguei até aqui é porque alguém viu em mim uma possibilidade de tornar-me um pesquisador, acreditou, dedicou tempo para me ensinar e cuidou. Serei eternamente grato por tudo o que fez não só por mim, mas pela minha família. Obrigado por seus conselhos, por todo apoio dedicado a mim desde a graduação.

Aos Professores Dr. Nicácio Henrique da Silva, Dra. Mônica Cristina Barroso Martins e Dra. Maria de Lourdes Lacerda Buril, pelas contribuições e auxílio no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Professor Dr. Thiago Henrique Napoleão, por todo apoio e contribuições nos experimentos com *Sitophilus zeamais*.

À minha amiga Érima Maria de Amorim, pelas correrias, sorrisos, momentos de desespero e felicidades. Passamos por tanta coisa, um ajudando o outro e com fé em Deus conseguimos. Há amigos mais achegados que irmãos, assim somos nós. Tuas palavras de incentivo e amizade são muito importantes para mim, principalmente nos dias que pensei em desistir, obrigado.

A Jéssica da Silva Nascimento, por sua dedicação e colaboração durante os experimentos, muito obrigado por todas as suas contribuições e valiosas dicas.

A Fábio Henrique Galdino dos Santos, pela grande parceira neste trabalho, pelos finais de semana e dedicados à pesquisa, durante os experimentos. Foi muito bom ter trabalhado contigo durante todos esses anos.

Ao grupo do Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Maria Aparecida da Conceição de Lira, Tamiris Alves Rocha e Gerlyni Bezerra de Oliveira, pela ajuda na coleta dos materiais e extrações, pelas palavras de apoio e risadas. A Cristiane Maria da Conceição e Dalva Maria, foram muitos momentos de correria, mas a amizade de vocês ajudou a aliviar um pouco o peso e os finais de semana e feriados no laboratório foram maravilhosos.

Aos colegas do laboratório de Ecologia Química, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar, Camila Soledade de Lira e Kamila de Andrade Dutra que não mediram esforços para contribuírem muitas vezes durante os feriados.

Ao meu grande amigo de longas datas, Sérgio Soares da Silva Júnior, por suas palavras de apoio e incentivo ao longo dos anos na academia.

As colegas de turma do Programa de Pós-Graduação Renorbio, Zilmar Meireles Pimenta Barros e Tamires Meira Menezes, pelas palavras de incentivo. Muitas foram as ligações solicitando ajuda, ou até mesmo para conversarmos. Foi muito bom conhecer vocês e como sempre nos ajudando.

A todos os familiares e amigos, que sempre torceram por esse momento.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo suporte financeiro concedido a esta pesquisa e apoio ao crescimento científico de Pernambuco.

Aos docentes do Programa Renorbio, representados pelo Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes e Profa. Dra. Teresinha Gonçalves, pela dedicação e contribuição para a minha vida profissional.

Aos grandes mestres que conheci durante minha trajetória estudantil nas instituições onde estudei: Escolas (Severino André de Luna, Almirante Antônio Heráclio, Presidente João Pessoa, Rita Maria da Conceição) e Universidade Federal de Pernambuco (Centro Acadêmico de Vitória UFPE/CAV). A vocês, meus parabéns e obrigado.

## RESUMO

Substâncias extraídas de líquens podem ser uma alternativa ao controle de pragas agrícolas causadas por insetos e até mesmo no controle a insetos vetores, causadores de importantes doenças em humanos. Reduzindo assim o uso de inseticidas sintéticos. Diante disso, esse trabalho tem como objetivo avaliar ação larvicida e praguicida de compostos extraídos de espécies líquênicas frente ao *Aedes aegypti* e o *Sitophilus zeamais* (praga do grão armazenado). Para verificar os efeitos larvicida e praguicida dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e divaricático, extraídos de *Cladonia verticillaris* e *Ramalina complanata*. Foram utilizados extratos orgânicos obtidos e os compostos majoritários de cada espécie. Foi avaliado também o sal de potássio do ácido Úsnico, (extraído de *Cladonia substelata*). Larvas de *A. aegypti*, em L4 foram expostas aos extratos: etéreo de *R. complanata* e acetônico de *C. verticillaris* e aos compostos isolados ácido divaricático e FUM, respectivamente. E larvas nos estágios: L1, L2, L3 e L4, foram expostas ao sal (usnato de potássio) sintetizado a partir do ácido úsnico. Em relação ao *Sitophilus zeamais*, indivíduos adultos foram expostos ao extrato etéreo de *R. complanata* e ao ácido divaricático para avaliar a toxicidade dos mesmos. As estruturas químicas e a pureza das substâncias foram confirmadas através de análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMNH<sup>1</sup>). Como resultado observamos que: o extrato etéreo de *R. complanata* e o ácido divaricático se mostraram praguicidas frente a *S. zeamais*, sendo a LC<sub>50</sub> em teste de toxicidade por fumigação 312,5 e 625mg/mL, respectivamente; em teste de toxicidade por ingestão tanto o extrato quanto o composto afetaram o desenvolvimento nutricional e os insetos perderam massa corporal. Em relação aos testes larvicidas frente a *A. aegypti*: o usnato de potássio matou larvas em todos os estágios larvários (abaixo de 1ppm); os extratos acetônico de *C. verticillaris* e etéreo de *R. complanata*, e os compostos isolados, ácido FUM e divaricático, respectivamente demonstraram uma ação larvicida frente a larvas L4 de *A. aegypti*, com LC<sub>50</sub> na faixa de 5 e 29ppm. Os resultados obtidos com esse trabalho colaboram na busca por alternativas de bioinseticidas e uma diminuição na utilização de inseticidas sintéticos que poluem o meio ambiente e podem afetar a saúde humana.

**Palavras-chave:** fenóis líquênicos; bioinseticidas; gorgulho-do-milho

## ABSTRACT

Substances extracted from lichens can be an alternative to the control of agricultural pests caused by insects and even to control vector insects, which cause important diseases in humans. Thus reducing the use of synthetic insecticides. Therefore, this work aims to evaluate the larvicidal and pesticide action of compounds extracted from lichenic species against *Aedes aegypti* and *Sitophilus zeamais* (stored grain pest) that causes the larvicidal and pesticide effects of fumarprotocetrárico (FUM) and divaricático acids, extracted from *Cladonia verticillaris* and *Ramalina complanata*, Extracts obtained from organic sources and the major compounds of each species were used. The sodium salt of the Úsnico acid (extracted from *Cladonia substelata*) was also evaluated. Larvae of *A. aegypti*, in L4 were exposed to the extracts: ether of *R. complanata* and acetic of *C. verticillaris* and to the isolated compounds divaricatic acid and FUM, respectively. And larvae in the stages: L1, L2, L3 and L4, were exposed to the salt (potassium usnate) synthesized from the uric acid. In relation to *Sitophilus zeamais*, adult individuals were exposed to the ether extract of *R. complanata* and to divaricatic acid to assess their toxicity. The chemical structures and the purity of the substances were confirmed through analyzes in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (NMRH1). As a result, we observed that: the ether extract of *R. complanata* and divaricatic acid were shown to be pesticides against *S. zeamais*, with the LD<sub>50</sub> being tested for fumigation toxicity 312.5 and 625mg / mL, respectively; in toxicity test by ingestion both the extract and the compound affected the nutritional development and the insects lost body mass. In relation to larvicidal tests against *A. aegypti*: potassium usnate killed larvae in all larval stages (below 1ppm); the acetic extracts of *C. verticillaris* and ethereal of *R. complanata*, and the isolated compounds, FUM and divaricatic acid, respectively, demonstrated a larvicidal action against L4 larvae of *A. aegypti*, with LC<sub>50</sub> in the range of 5 and 29ppm. The results obtained with this work collaborate in the search for bioinsecticide alternatives and a decrease in the use of synthetic insecticides that pollute the environment and can affect human health.

**Keywords:** lichenic phenols; bioinsecticides; corn weevil.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Estrutura geral de um líquen, mostrando a organização em camadas	-----	<b>18</b>
<b>Figura 2</b>	Talo crostoso sobre rocha, <i>Calenia depressa</i> Müll. Arg. (Gomphillaceae, Ostropales).	-----	<b>19</b>
<b>Figura 3</b>	Estrutura geral de um líquen crostoso (Redón 1985, modificado).	-----	<b>19</b>
<b>Figura 4</b>	Talo folioso, <i>Parmotrema falvescens</i> (Autor).	-----	<b>19</b>
<b>Figura 5</b>	Estrutura geral de um líquen folioso (Redón 1985, modificado).	-----	<b>19</b>
<b>Figura 6</b>	Talo fruticoso, <i>Ramalina complanata</i> (Sw.) Ach. (Ramalinaceae, Lecanorales).	-----	<b>19</b>
<b>Figura 7</b>	Estrutura geral de um líquen fruticoso, <b>c</b> = córtex, <b>ea</b> = extrato com algas, <b>m</b> = medula e <b>cc</b> = cilindro central (Redón 1985, mod.).	-----	<b>19</b>
<b>Figura 8</b>	Papel de tornassol, azul e vermelho.	-----	<b>21</b>
<b>Figura 9</b>	Ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> Mosquito adulto (A), ovos (B), larva de 1º estágio (C), larva de 2º estágio (D), larva de 3º estágio (E), larva de 4º estágio (F) e pupa (G).	-----	<b>23</b>
<b>Figura 10</b>	Ovos de <i>A. aegypti</i> vistos ao microscópio esteoscópico (lupa).	-----	<b>24</b>
<b>Figura 11</b>	Mosquito adulto de <i>Aedes aegypti</i>	-----	<b>25</b>

<b>Figura 12</b>	Adulto de <i>Sitophilus zeamais</i>	-----	<b>28</b>
<b>Figura 13</b>	Cromatograma líquido de alta eficiência ácido divaricático	-----	<b>35</b>
<b>Figura 14</b>	Estrutura química do ácido divaricático	-----	<b>36</b>
<b>Figura 15</b>	Cromatograma em CLAE do ácido fumarprotocetrárico	-----	<b>37</b>
<b>Figura 16</b>	Estrutura do ácido fumarprotocetrárico	-----	<b>37</b>
<b>Figura 17</b>	Estrutura do usnato de potássio	-----	<b>38</b>
<b>Figura 18</b>	Efeito do extrato etéreo de <i>Ramalina complanata</i> em parâmetros nutricionais de adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	-----	<b>40</b>
<b>Figura 19</b>	Efeito do ácido divaricático em parâmetros nutricionais de adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	-----	<b>41</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atividade larvicida dos extratos de <i>Ramalina complanata</i> e <i>Cladonia verticillaris</i> ; e os compostos isolados ácido divaricático e FUM, testado contra larvas de <i>A. aegypti</i> em todos os estágios larvários, após 48h de exposição	-----	<b>38</b>
<b>Tabela 2</b>	Atividade larvicida do usnato de potássio, testado contra larvas de <i>A. aegypti</i> em todos os estágios larvários, após 48h de exposição.	-----	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b>	Taxa de mortalidade <i>Sitophilus zeamais</i> expostos ao extrato etéreo de <i>Ramalina complanata</i> e ácido divaricático após teste de fumigação.	-----	<b>42</b>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> -----	14
1.1	Objetivo Geral -----	16
1.2	Objetivos Específicos -----	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> -----	17
2.1	Líquens -----	17
2.1.1	Metabólitos primários e secundários dos líquens -----	20
2.1.2	Importância biológica e econômica dos líquens -----	21
2.2	<i>Aedes aegypti</i> -----	22
2.2.1	<i>Aedes aegypti</i> como vetor de doenças e métodos de controle -----	26
2.2.1.1	Dengue -----	26
2.2.1.2	Zika vírus -----	26
2.2.1.3	Chikungunya -----	27
2.3	<i>Sitophilus zeamais</i> -----	28
2.3.1	<i>Sitophilus zeamais</i> como praga e métodos de controle -----	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	31
3.1	Obtenção do material botânico -----	31
3.2	Extração e isolamento dos compostos liquênicos -----	31
3.3	Análise físico-química dos compostos -----	32
3.4	Síntese de usnato de potássio -----	32
3.5	Avaliação de atividade larvicida -----	32
3.6	Avaliação da atividade inseticida -----	33
3.6.1	Toxicidade por ingestão -----	33
3.6.2	Toxicidade por fumigação -----	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> -----	35
4.1	Análise físico-química dos compostos isolados -----	35
4.1.1	Ácido divaricático -----	35
4.1.1.1	RMN-H <sup>+</sup> -----	35
4.1.2	Ácido Fumarprotocetrárico – FUM -----	36
4.1.2.1	Análise de RMN-H <sup>+</sup> -----	37

4.1.3	Usnato de potássio (sal do ácido isolado de <i>Cladonia substellata</i> ) -----	37
4.2	Avaliação da atividade larvicida -----	38
4.3	Avaliação da atividade praguicida -----	39
4.3.1	Toxicidade por ingestão -----	39
4.3.2	Toxicidade por fumigação -----	41
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> -----	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> -----	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>46</b>
	<b>APENDICES</b> -----	<b>52</b>
	<b>APENDICE A</b>	
	<b>Atividade praguicida do extrato de <i>Ramalina complanata</i> e ácido divaricático contra <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera, Curculionidae)</b>	<b>53</b>
	<b>APENDICE B</b>	
	<b>Atividade larvicida de metabólitos secundários liquênicos contra <i>Aedes aegypti</i></b> -----	<b>70</b>
	<b>ANEXOS</b> -----	<b>82</b>
	<b>ANEXO A – REDAÇÃO DE PATENTE DEPOSITADA:</b> -----	<b>83</b>
	<b>Larvicida e pupicida a base de usnato de potássio</b>	
	<b>ANEXO B – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DA PATENTE:</b> -----	<b>88</b>
	<b>Larvicida e pupicida a base de usnato de potássio</b>	
	<b>ANEXO C – ESPECTRO DE RMN-H<sup>+</sup> DO ÁCIDO DIVARICÁTICO</b> ----	<b>89</b>
	<b>ANEXO D – ESPECTRO DE RMN-H<sup>+</sup> DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO</b> -----	<b>90</b>
	<b>ANEXO D – ESPECTRO DE RMN-H<sup>+</sup> DO USNATO DE POTÁSSIO</b> ---	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional do Brasil aumenta a demanda de alimento e dificulta o controle de doenças. São observadas grandes epidemias de zika, dengue, chikungunha, e pragas que assolam as lavouras. Em todos os casos verifica-se a presença de vetores ou insetos como importantes “partes do problema”. De fato, o controle destes organismos é extremamente necessário. Metabólitos secundários de líquens e seu conhecido potencial biológico com inúmeras propriedades já bem documentadas pode significar muito na dissolução desta questão (BARRETO, 2005; LORINI, 2003; DE BARROS ALVES et al., 2014).

No Brasil, três espécies de mosquitos se destacam como vetores de doenças: o *Anopheles darlingi* como o transmissor mais importante da malária, o *Culex quinquefasciatus* como o principal vetor da filariose bancroftiana e o *Aedes aegypti* como transmissor do dengue e da febre amarela urbana (CONSOLI, 1994). O *Aedes aegypti* já foi considerado erradicado no Brasil, mas a ineficiência das medidas empregadas no controle e a falta de participação dos países vizinhos nos programas de combate proporcionaram a reintrodução do vetor no país (BARRETO, 2005).

O controle do *A. aegypti* tem sido uma constante preocupação das autoridades brasileiras. A FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) vem constatando a resistência ao larvicida temefós (que é utilizado a 1%) desde dezembro de 1999, quando comprovou o fato em nove de 22 municípios dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (FUNASA, 2000). Como alternativa, a FUNASA vem estudando sua substituição pelo *Bacillus thuringiensis israelensis* (FUNASA, 2001), que promove a morte de larvas e pupas pela ação de toxinas produzidas *in situ* (BEN-DOV et al., 2003). Como as toxinas do *Bacillus thuringiensis israelensis* são compostos orgânicos, o desenvolvimento de resistência em longo prazo também poderá se desencadear. Assim, a busca por novas substâncias larvicidas ou outras estratégias de controle desse mosquito torna-se imperativa (FUNASA, 2001).

Outro problema causado por insetos que afeta o brasileiro, em especial o setor agrícola tem sido as infestações a grãos armazenados por *Sitophilus*

*zeamais*. O que tem gerado perdas para o setor e conseqüentemente para o país. O *S. zeamais* ataca os grãos estocados e com isso diminui a sua qualidade. O controle para essa praga tem sido feito com produtos sintéticos os quais muitas vezes afetam o meio ambiente (LORINI, 2003).

Uma vez que inseticidas químicos utilizados tanto no controle de pragas agrícolas quanto no controle de vetores de doenças humanas, causam importante impacto nos ecossistemas e na saúde humana a busca por alternativas biologicamente mais seguras é imperativa. Neste sentido os metabólitos liquênicos são moléculas extremamente promissoras como bioinseticidas (LORINI, 2003; BENHALIMA et al., 2004).

Os líquens são organismos oriundos de uma associação simbiótica entre um fungo (micobionte) e uma alga e/ou cianobactéria (fotobionte) (KAASALAINEN et al., 2012). Os seres fotobiontes têm um importante papel nessa simbiose, uma vez que sintetizam açúcares que posteriormente serão aproveitados pelos fungos. Segundo relatos da literatura cerca de 46% das espécies de ascomicetos conhecidas são liquenizadas, o que torna esse grupo maioria no que diz respeito a fungos liquenizados, mas existem outros grupos formadores de líquens, como basidiomicetos e deuteromicetos. A liquenização tem sido uma das mais importantes fontes de nutrição para os ascomicetos. Os fotobiontes presentes nessa associação são seres unicelulares ou filamentosos de algas verdes ou cianobactérias (XAVIER FILHO et al., 2006). Durante essa simbiose são produzidos aproximadamente 1000 compostos secundários (Stocker-Worgotter, 2008). Sendo que cada espécie de líquen pode apresentar até cinco compostos simultaneamente (Tigre e Rodrigues, 2012).

Os líquens produzem metabólitos secundários com relevantes propriedades biológicas amplamente descritas. Por exemplo, os ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e lecanórico (LEC). O FUM apresentou atividade expectorante e antioxidante comprovadas em ratos (DE BARROS ALVES et al., 2014). Já o LEC, além de se comportar como antioxidante, também demonstrou ação contra bactérias Gram-positivas (GAIKWAD et al., 2014; DE AZEVEDO NÓBREGA et al., 2012). Extratos dos líquens *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina*

e *Peltigera rufescens*, apresentaram atividade inseticida frente a adultos de *Sitophilus granarius* (EMSEN, 2015).

Os metabólitos secundários conferem aos líquens uma proteção contra determinados tipos de insetos. O que pode tornar esses compostos interessante alternativa como bioinseticidas contra pragas como o *Sitophilus zeamais* e larvicida para o combate ao *A. aegypti* (EMSEN, 2015; BOMFIM et al., 2009).

### 1.1 Objetivo Geral

Avaliar a possível atividade larvicida e praguicida exercidas por metabólitos secundários liquênicos em larvas de *Aedes aegypti* e indivíduos adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae).

### 1.2 Objetivo Específicos

- Sintetizar o sal de potássio do ácido úsnico isolado de *Cladonia substellata*;
- Avaliar a atividade larvicida do sal de potássio do ácido úsnico frente a todos os estágios larvários de *Aedes aegypti* e no estágio de pupa;
- Determinar a atividade inseticida o extrato etéreo de *Ramalina complanata* e o ácido divaricático em adultos de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Líquens

O termo líquen vem da palavra grega “*leichén*” e tem sua origem por volta do ano 300 a.C. (MARCELLI, 1995). No ano de 1868, o botânico suíço, Simon Schwendener, definiu como sendo os líquens uma verdadeira simbiose complexa entre fungo (micobionte) e alga (fotobionte) (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976).

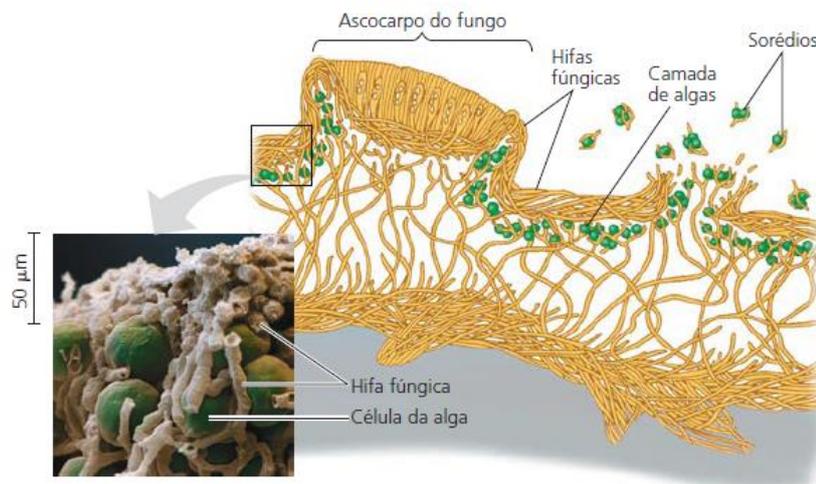
Porém, essa “nova” teoria não foi bem aceita por todos os cientistas à época, muitos acreditavam na existência de uma relação do tipo parasitismo, no qual a alga era parasitada pelo fungo que dela retirava seu alimento (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976). Para alguns, esse é um parasitismo controlado, uma vez que o fungo parece ser mais beneficiado que a alga (PURVIS, 2000). No entanto, outros pesquisadores defendem que na verdade existe um parasitismo obrigatório por parte do fungo, pois esse depende dos produtos resultantes da fotossíntese do fotobionte que tem seu ciclo de desenvolvimento reduzido (XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976).

Diante de tanta controvérsia a melhor definição do que seja um líquen segundo Xavier Filho et al. (2006) é a de um fungo que cultiva determinado fotobionte entre as hifas de seu micélio. Ou seja, é uma simbiose, mas não se sabe o tipo, pode ser tanto mutualística estrita como parasitária a depender das espécies de micobiontes e fotobiontes envolvidas.

A maior parte dos fungos presentes na constituição dos líquens pertence ao filo Ascomycota e em menor proporção temos os dos filios Basidiomycota e Deuteromycota (HAWKSWORTH, 1984). As algas encontradas nos líquens pertencem aos grupos unicelulares ou filamentosos das clorófitas (algas verdes). Sendo mais comuns, espécies unicelulares pertencentes aos gêneros *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*. E em líquens tropicais algas filamentosas pertencentes ao gênero *Trentepohlia*. Já se tratando de cianobactérias, as mais frequentes pertencem aos gêneros *Nostoc* e *Scytonema*. Nessa associação uma espécie de fungo só se liga a uma determinada espécie de alga, no entanto podemos encontrar uma alga em várias espécies de fungos diferentes. Durante

essa simbiose a alga não se reproduz sexuadamente além de sofrer mudanças na forma, tamanho e estrutura de suas células (XAIER FILHO et al., 2006).

O corpo de um líquen formado pelo conjunto de fungo e alga recebe o nome de talo liquênico conforme mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura geral de um líquen, mostrando a organização em camadas (Reece et al., 2015).

Quanto às características morfológicas e anatômicas do talo, os líquens estão classificados em: **crostosos** ou **crustáceos**, são aqueles que não apresentam córtex inferior e ligam-se intimamente ao substrato (FiguraFiguras 2 e 3) pela medula (CARLILE et al., 2001). **Foliosos** ou **foliáceos** (Figuras 4 e 5), esse tipo de caule apresenta uma estrutura laminar e com duas partes (uma superior e outra inferior), o córtex superior serve como proteção à estrutura do líquen, um córtex inferior com estruturas de fixação, responsáveis pela adesão ao substrato, apresenta ainda uma camada do fotobionte e a medula com algumas algas espalhadas e hifas frouxamente organizadas (HALE, 1979), não está preso ao substrato pela medula, o que ajuda na sua remoção. **Fruticosos** (Figuras 6 e 7), têm aparência de pequenos arbustos que podem crescer eretos, perpendiculares ao substrato ou pendurados em rochas, troncos e galhos de árvores, muitos crescem ao substrato apenas enroscando-se a ele (XAVIER FILHO et al., 2006). O fungo é o responsável pela aparência inicial do talo, mas, só se estabelece após a simbiose (ALMBORN, 1965).



Figura 2. Talo crostoso sobre rocha, *Calenia depressa* Müll. Arg. (Gomphillaceae, Ostropales).  
Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 14/03/2019

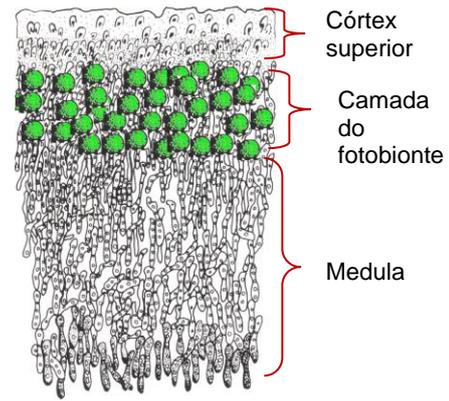


Figura 3. Estrutura geral de um líquen crostoso (Redón 1985, modificado).



Figura 4. Talo folioso, *Parmotrema falvescens* (Autor).

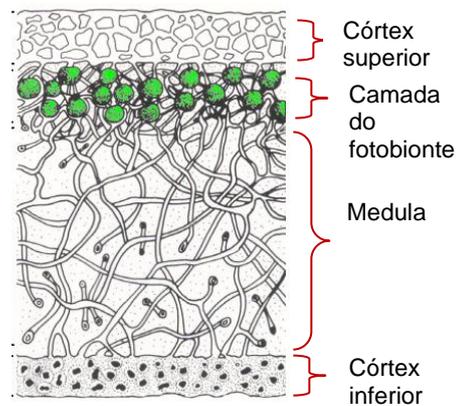


Figura 5. Estrutura geral de um líquen folioso (Redón 1985, modificado).



Figura 6. Talo fruticoso, *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (Ramalinaceae, Lecanorales).  
Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 14/03/2019

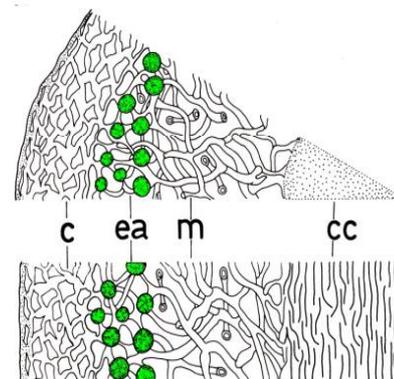


Figura 7. Estrutura geral de um líquen fruticoso, **c** = córtex, **ea** = extrato com algas, **m** = medula e **cc** = cilindro central (Redón 1985, mod.).

Atualmente são conhecidas mais de 19.387 espécies de líquens, distribuídas em 995 gêneros, 115 famílias, 39 ordens e 8 classes (LÜCKING, 2017), distribuídas em várias regiões do planeta. Eles estão presentes em todos os substratos, climas, altitudes, latitudes e até mesmo em regiões desafiadoras para a vida como na Antártida. Sendo encontrados em cascas de árvores e em rochas (XAVIER FILHO et al., 2006).

Além disso, os líquens são importantes no monitoramento de poluição do ar, uma vez que, devido a sua sensibilidade, algumas espécies, estão ausentes em regiões com ar poluído e em florestas fechadas sem iluminação ou extremamente úmidas (XAVIER FILHO et al., 2006). Outras características que contribuem para que os líquens sejam utilizados como bioindicadores são: ausência de camada protetora; a anatomia externa não tem muita mudança durante o ano; realizam fotossíntese e se desenvolvem o ano todo; usam o substrato apenas para fixação e capazes de ter uma ampla distribuição geográfica (PUCKETT, 1988; NIMIS, 1990).

Apresentam uma excelente capacidade em alterar seu estado de atividade e inatividade metabólica. Esse estado ativo e inativo pode variar de acordo com as condições ambientais disponíveis, como temperatura, radiação ou disponibilidade hídrica (XAVIER FILHO et al., 2006).

### **2.1.1 Os metabólitos primários e secundários dos líquens**

Os metabólitos primários encontrados nos líquens, produzidos tanto pelo micobionte quanto pelo fotobionte, são carboidratos, aminoácidos, proteínas, enzimas e glicolipídeos (HONDA e VILEGAS, 1999), presentes também em plantas e atuam nos líquens no metabolismo celular e nas funções estruturais (PODTEROB, 2008).

Os metabólitos secundários, produzidos pelo micobionte, estão presentes na medula ou no córtex, são denominados ácidos ou fenóis liquênicos como, ácidos úsnicos, depisídeos, depisidonas, dibenzofuranos, lactonas e antraquinonas (NASH III, 2008).

O fotobionte, provê compostos orgânicos através da fotossíntese, tanto para o micobionte, quanto para seu próprio alimento (SCHNEIDER, 1904).

### 2.1.2 Importância biológica e econômica dos líquens

Os líquens e suas notáveis moléculas têm sido fonte para numerosos estudos devido às diversas potencialidades biológicas. São descritas, atividade anti-inflamatória (OETTL et al., 2013), antimicrobiana, antineoplásica, analgésica, entre outras. (OETTL et al., 2013).

Outro trabalho mostra as ações citotóxica, antibacteriana e antifúngica apresentadas por compostos derivados do ácido úsnico isolado de *Usnea logissima*, conforme relatos da literatura (YU, et al., 2016).

Martins e colaboradores (2017), demonstraram que o extrato etéreo e o composto ácido barbático, do líquen *Cladia aggregata*, aprearam ação moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e schistossomicida frente a cercarias de *S. mansoni*.

Os líquens são utilizados também na fabricação de corantes como é o caso da orceína ou azul de tornassol (Figura 8), que têm utilidade na microscopia e como indicador químico e bioquímico, a exemplo o papel indicador que originou o teste “litmos”. Para a produção desse corante são usadas várias espécies do líquen *Rocella*, acredita-se que os Países Baixos utilizam de 0,7 a 1,4 t de espécies desse líquen por ano na produção de orceína (MOXHAM, 1982).



**Figura 8.** Papel de tornassol, azul e vermelho.

Fonte: [www.metaquimica.com](http://www.metaquimica.com). Acesso em 18/03/2019.

Há relatos que mencionam que na Índia líquens do gênero *Parmelia* foram utilizados para tratamento de doenças do trato digestório, febre, vômito e diarreia (KUMAR e UPRETY, 2001). Já extratos acetônico, clorofômico e metanólico de

*Parmotrema tinctorum* apresentaram uma ação antifúngica frente aos fungos patogênicos (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Fusarium roseum*, *Penicillium citrinum* e *Ustilago spp.*) (TIWARI et al., 2011).

Outros líquens são usados na indústria farmacêutica, a exemplo temos os antibióticos Riminofenazinas em especial Clofazimina que tem atividade antileprótica frente ao *Mycobacterium leprae* e antituberculose frente ao *Mycobacterium tuberculosis* (REDDY, 1999).

Algumas espécies de líquens são utilizadas na perfumaria, como por exemplo, *Evernia prunastri* e *Pseudevernia furfuracea* que são responsáveis pela maior parte dos fixadores utilizados no mundo, além de *Parmotrema nilgherrensis* (Nyl.) Hale e algumas espécies de *Ramalina*. Essa utilização vai desde fixadores que permitem uma maior duração do perfume, a fragrâncias naturais a partir de extratos liquênicos. E ainda por possuírem atividade antimicrobiana algumas espécies de líquens são utilizadas na indústria de cosméticos, o líquen *Cetraria islandica* é utilizado na produção de desodorantes, pós-barba, esfoliantes, creme dental, shampoos e condicionadores (ILLANA-ESTEBAN, 2016).

Outra atividade biológica dos líquens é a utilização de extratos liquênicos como inseticidas. A exposição de *Sitophilus granarius* adultos ao extrato de *Usnea longissima*, causou uma mortalidade superior a 98% dos indivíduos tratados após um período de 96h (YILDIRIM et al., 2012).

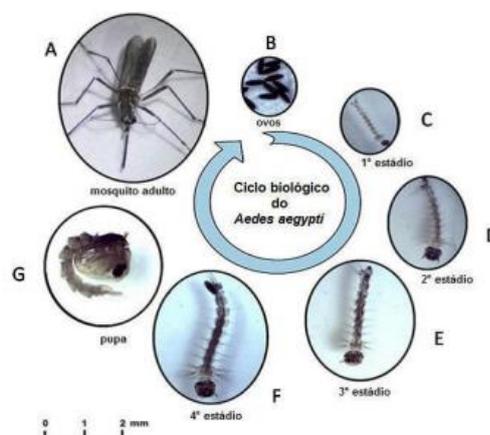
## **2.2 *Aedes aegypti***

O nome *Aedes aegypti* significa “o indesejável do Egito”, e é um mosquito originário do Egito no continente Africano. Acredita-se que tenha migrado para as Américas e outras partes do mundo durante o período das grandes navegações (SILVA et al., 2008). No Brasil existem relatos que ele tenha chegado em meados do século XIX começo do século XX, através dos navios negreiros utilizados para o transporte de escravos (FIOCRUZ, 2016).

O mosquito *A. aegypti* tem uma enorme capacidade de adaptação a diversos locais do globo, o que confere a essa espécie uma ampla distribuição geográfica, sendo então considerada como cosmopolita. Habita desde de regiões com climas tropicais, subtropicais e temperadas. Isso tem facilitado seu desenvolvimento sobretudo em ambientes urbanos e sua expansão mundial. Outro fator que contribui para essa expansão em ambientes urbanos é a facilidade em encontrar locais com água parada, propícios criadouros para a espécie (GLASSER e GOMES, 2002; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) tem sua classificação taxonômica como um animal pertencente ao filo *arthropoda*, por possuir pés articulados, subfilo (ou Superclasse) *hexapoda*, devido à presença de três pares de pernas, classe *Insecta* (invertebrados com exoesqueleto quitinoso e corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen), ordem díptera (pois possuem dois pares de asas, sendo o anterior usado para o voo e o posterior transformado em halteres), pertence à Família *Culicidae*, Subfamília *Culicinae* e Gênero *Aedes* (NATAL, 2002).

Em relação ao desenvolvimento, o *A. aegypti* apresenta metamorfose completa (holometábolo), pois seu ciclo de vida compreende quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. Seu ciclo (Figura 9) dura cerca de 10 dias, podendo ser alterado no desenvolvimento de ovo até adulto devido a temperatura, competição entre larvas no mesmo criadouro ou ainda disponibilidade de alimento (BERMUDI et al., 2017).



**Figura 9.** Ciclo de vida de *Aedes aegypti* Mosquito adulto (A), ovos (B), larva de 1º estágio (C), larva de 2º estágio (D), larva de 3º estágio (E), larva de 4º estágio (F) e pupa (G).

Fonte: GERIS et al., 2012.

Os ovos (Figura 10) têm aproximadamente 1mm de comprimento, apresentam formato elíptico e alongado. Após a postura na coluna d'água os ovos apresentam uma membrana externa com aspecto claro e de consistência flexível que vai escurecendo e enrijecendo ao entrar em contato com o oxigênio, à medida em que escurece também adquire resistência contra perda de água, devido ao revestimento de quitina (FORATTINI, 2002). Esses ovos podem suportar até 450 dias em locais secos e durante esse período basta uma gota de água para que ocorra a eclosão (FUNASA, 2001).



**Figura 10.** Ovos de *Aedes aegypti* vistos ao microscópio estereoscópico (lupa) Fonte: Autor

A fase de larva que, é o segundo estágio de desenvolvimento, apresenta quatro instares: L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> (SILVA et al., 2008). As larvas diferentemente dos ovos não resistem a longos períodos de seca, pois são aquáticas e não suportam viver muitos dias sem alimentação, a matéria orgânica depositada nas paredes e no fundo dos criadouros lhes serve de alimento. E seu desenvolvimento varia de acordo com as condições como temperatura, alimento disponível, mas, em média de L<sub>1</sub> a L<sub>4</sub> não se passam mais que cinco dias (BRASIL, 2015).

As larvas não possuem pernas (ápodas). Na pequena cabeça, que é parcialmente ligada ao tórax, existe um par de antenas, um aparelho bucal mastigador-raspador, no oitavo segmento apresentam o sifão respiratório e no décimo segmento o lobo anal (FORATTINI, 2002).

A pupa é o estágio de transição entre a fase de larva e a fase adulta, dura de dois a três dias e nessa fase as larvas não se alimentam (BRASIL, 2015). Elas têm o corpo em forma de vírgula e está dividido em cefalotórax (cabeça

fundida com tórax) e abdômen, além disso no último segmento abdominal existe um par de paletas natatórias, o que permite as pupas se movimentarem (FORATTINI, 2002).

Na fase adulta (Figura 11), os mosquitos podem chegar a medir 6mm de comprimento. Apresentam uma coloração preta, com listras brancas no corpo e nas pernas. Os machos são menores que as fêmeas. O mosquito adulto vive em ambiente terrestre e tem capacidade para o voo, apresenta os três segmentos corporais: cabeça, tórax e abdômen (FUNASA, 2001).



**Figura 11.** Mosquito adulto de *Aedes aegypti*.

Fonte: <https://noticias.r7.com/dia-d-de-combate-ao-aedes-aegypti>. Acesso: 19/03/2019.

Em relação à alimentação, machos e fêmeas se alimentam de substâncias que contêm açúcar, como néctar e seiva. No entanto, apenas as fêmeas se alimentam de sangue (hematófagas), devido a necessidade de proteínas presentes no sangue que auxiliarão na maturação dos ovos, por isso apenas as fêmeas picam os seres humanos (FIOCRUZ, 2016).

As fêmeas, durante o período gonotrófico (que vai de uma oviposição a outra), têm a capacidade de colocar em média 100 ovos por oviposição. E como nesse período necessitam de sangue em sua alimentação, conseguem picar até mais de uma pessoa durante um único período gonotrófico (FIOCRUZ, 2016; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

### **2.2.1 *Aedes aegypti* como vetor de doenças e métodos de controle**

O mosquito *A. aegypti* é o vetor dos vírus que causam as arboviroses (doenças causadas por artrópodes): da dengue, zika e chikungunya, doenças que acometem os seres humanos, com grande nível de mortalidade e morbidade, especialmente em países e regiões de clima tropical (BRASIL, 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em média 50 milhões de casos de dengue devem ocorrer anualmente no mundo. Essas doenças são adquiridas durante a picada da fêmea contaminada com o vírus, em busca de sangue, necessário para a maturação de seus ovos (BRASIL, 2016).

#### 2.2.1.1 Dengue

No Brasil são encontrados 4 sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, qualquer um dos quatro tipos pode causar a forma mais leve da doença ou a mais grave, como a dengue hemorrágica. O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e ainda não existe vacina para o vírus. Qualquer pessoa pode contrair um dos 4 tipos ou os quatro, sendo um de cada vez. Ao contrair um tipo do vírus a pessoa fica imune a ele, ou seja, não terá mais a doença. Sua transmissão é através da picada do *A. aegypti*, não há histórico de contágio de pessoa para pessoa. (FIOCRUZ, 2019; BRASIL, 2019). Segundo dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde até o início de fevereiro de 2020 já foram notificados 94.149 casos de dengue no Brasil (BRASIL, 2020).

#### 2.2.1.2 Zika vírus

Da mesma família do vírus da dengue, o zika vírus (ZIKV), pertence também ao gênero *Flavivirus*, causador da doença conhecida como zika, causa febre baixa geralmente, dores no corpo e articulações e manchas vermelhas no corpo. É um vírus recém chegado ao Brasil, seus primeiros registros foram em 2015. Diferentemente da dengue, febre amarela e chikunginha, o vírus da zika pode afetar o sistema nervoso e ocasionar enfermidades neurológicas como encefalite ou até mesmo a Síndrome de Guillain Barré. A maior preocupação é

em relação a mulheres grávidas, uma vez que estudos relatam a relação entre o zika vírus e a microcefalia (FOICRUZ, 2016; BRASIL, 2019). Até o início de fevereiro, o Brasil registrou 242 casos de infectados pelo zika vírus (BRASIL, 2020).

### 2.2.1.3 Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) apesar de ser um arbovírus, pertence a família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* (FERREIRA et al., 2019). Os sintomas se apresentam como febre, dor de cabeça, além de manchas vermelhas no corpo, dor nas articulações e coceira pelo corpo. O período de incubação pode durar até 12 dias (BRASIL, 2019). Nos primeiros 2 meses de 2020 já são 3.439 casos registrados no Brasil (BRASIL, 2020). Estudos comprovaram a eficácia do medicamento sofosbuvir inibindo a replicação do vírus e prevenção de edema de pata induzido pelo CHIKV, em camundongos infectados com o vírus (FERREIRA et al., 2019).

Uma das formas de se evitar estas doenças ainda se faz através da eliminação do vetor. Alguns métodos de controle do *A. aegypti* são: **mecânico**, que inclui a eliminação de focos de criadouros do mosquito (ZARA et al., 2016) e **químico**. Este último teve início com a utilização do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) um inseticida químico altamente perigoso por se acumular no organismo e causar sérios danos à saúde e ao meio ambiente, após aplicado ainda permanece por longo período em atividade (ROZENDAAL, 1997). Outro composto químico utilizado e que é recomendado pela OMS, é o temefós (BRAGA e VALLE, 2007) mas, atualmente vem sendo substituído por outros devido ao surgimento de resistência por parte dos insetos. O piriproxifeno é usado atualmente no Brasil contra o vetor, mas há casos de reincidência de *A. aegypti* após a aplicação desse, além de danos ambientais causados por inseticidas químicos. E diante dessas barreiras surge a possibilidade de métodos biológicos no combate a esse vetor, um desses é a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelenses* (Bti), no entanto sua utilização repetida causou a

seleção de populações de *A. aegypti* mais resistentes (BELINATO e VALLE, 2015).

O uso indiscriminado de inseticidas químicos leva a degradação ao meio ambiente ocasionando sérios danos à população. Como alternativa surge a necessidade de se investigar compostos mais seguros com o caso os de origem natural, extraídos de plantas (NEVES et al., 2017) ou líquens.

### 2.3 *Sitophilus zeamais*

O *sitophilus zeamais* Mothschulsky (Figura 12), retratado inicialmente em 1855, é classificado taxonomicamente como um animal pertencente ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Coleoptera (o par de asas anterior tem função de proteção funcionando como capa rígida e o par posterior é membranoso e serve para voar), Família Curculinidae, Gênero *Sitophilus*. É conhecido como gorgulho-do-milho, um inseto cosmopolita que ataca o milho causando prejuízos sérios por afetar a qualidade e aparência deste (LORINI, 2003).



**Figura 12.** Adulto de *Sitophilus zeamais*.

Fonte: [https://www.agrolink.com.br/problemas/gorgulho\\_1902.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/gorgulho_1902.html). Acesso em 19/03/2019.

O *S. zeamais* é cosmopolita devido sua capacidade de sobreviver em vários ambientes. Tem a capacidade de realizar infestação cruzada, ou seja, ataca o grão tanto no campo como no armazém, penetrando na massa o que causa grandes prejuízos para agricultores (LORINI, 2008).

Os adultos medem cerca de 2,5 a 4mm de comprimento, têm uma coloração castanho-escuro, com manchas avermelhadas nas asas anteriores (chamadas de élitros). Seu aparelho bucal é modificado em forma de um rostro cruzado com mandíbulas mastigadoras, o que facilita na perfuração dos grãos. O rostro nos machos é mais curto e grosso e nas fêmeas mais fino e alongado (ANTUNES e DIONELLO, 2010).

As fêmeas depositam os ovos individualmente nos grãos, para isso utilizam orifícios que cavam com a mandíbula, após a oviposição utilizam uma secreção gelatinosa produzida e secretada pelas glândulas associadas ao aparelho ovipositor. Essa secreção serve para fechar o grão e assim outra fêmea saberá que naquele grão já tem ovo. Mesmo colocando mais de um ovo por grão apenas um adulto irá emergir, a larva mais forte sobreviverá e após os quatro estágios larvários alcançará o estágio de pupa onde não se alimenta e permanece dentro do grão até a eclosão do indivíduo adulto (ANTUNES e DIONELLO, 2010).

Apresenta um ciclo de vida desde a fase de ovo até adulto de 34 dias em média, dependendo das condições favoráveis como temperatura média de 28°C, umidade relativa do ar em 60% e tendo o milho como hospedeiro. Apresenta um período de pré-oviposição que dura em média 6 dias, as fêmeas passam 104 dias em período de oviposição e colocam em média 280 ovos, destes apenas 26,9% se desenvolvem até a fase adulta. Os machos apresentam uma longevidade de 142 dias, já as fêmeas vivem em média 140 dias (ROSSETO, 1972).

### **2.3.1 *Sitophilus zeamais* como praga e métodos de controle**

Devido a tantos problemas para agricultores, acarretando perdas na qualidade dos grãos contaminados por essa praga, no Brasil cerca de 20% da produção é perdida em decorrência de infestação por *Sitophilus* (RIBEIRO, 2003). Diversos métodos são utilizados para seu controle, entre esses temos a utilização de inseticidas sintéticos como piretroides, organofosforados e fumigantes (fosfeto de alumínio e magnésio). Esse tipo de controle tem apresentado riscos ao meio ambiente e aos aplicadores, podendo causar

intoxicações, além de se acumularem e deixarem resíduos nos grãos (LORINI, 2003). Em adição, o uso indiscriminado de pesticidas causa uma resistência em populações do inseto a algumas moléculas químicas (RIBEIRO et al., 2007).

Para evitar danos ao meio ambiente e a saúde humana em decorrência do uso desses inseticidas químicos, têm sido realizados vários estudos e testes com produtos naturais. Napoleão e colaboradores (2013) demonstraram que o extrato de folhas da planta *Myracrodruon urundeuva*, quando acrescentado a dieta de *S. zeamais*, apresentou uma perda na biomassa dos insetos e conseqüentemente sua morte.

Extratos do líquen *Usnea longíssima* e metabólitos secundários (ácido difractárico e ácido úsnico) apresentaram efeitos inseticidas em adultos de *S. zeamais*, chegando a apresentarem mortalidade elevada após 96h de exposição, sendo o ácido úsnico o que apresentou uma mortalidade de 76% nos indivíduos adultos de *S. zeamais* expostos (YILDIRIM et al., 2012).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do material botânico

Os líquens foram coletados na região Nordeste do Brasil, sendo:

- *Ramalina complanata* coletado, no município de Saloá, Pernambuco, PE, Latitude S 09° 01.399', Longitude W 36°47.565', a uma altitude de 1052 metros, no período do inverno do Hemisfério Sul (Junho 2008), voucher nº 54299.
- *Cladonia verticillaris* coletado em Alhandra-PB e o registro no herbário é nº 361638.

Os talos de ambas as espécies foram identificados de acordo com características morfológicas e uma amostra de cada espécie foi depositada no Herbário Geraldo Mariz, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

#### 3.2 Extração e isolamento dos compostos liquênicos

A extração e o isolamento dos compostos foram realizados com aparelho de Soxhlet, sob temperatura de refluxo em (40°C), o processo foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD) para acompanhar, conforme descrição abaixo:

- Para o extrato etéreo de *R. complanata*, foram utilizados 10g do material liquênico seco, com 100 mL de éter dietílico a uma temperatura de 40 °C. Logo após, o solvente foi eliminado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e armazenado em dessecador até peso constante. E o isolamento do ácido divaricático foi realizada com o extrato de *R. complanata* dissolvido em etanol absoluto e refluxado em banho maria, a 40 °C por 20 min e em seguida armazenado em dessecador.
- Para o extrato de acetônico de *C. verticillaris*, foi utilizado 10g do material liquen com 100mL de acetona a uma temperatura de 40°C. Posteriormente utilizamos rotaevaporador para eliminação do

solvente e armazenamos em dessecador. O isolamento do ácido FUM se deu de acordo com Asahina e Shibata (1954).

### 3.3 Análise físico-química dos compostos

Para verificar a pureza dos ácidos divaricático e FUM, utilizamos a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um cromatógrafo Hitachi modelo 655-11, acoplado a um detector de UV da marca CG de modelo 437 a 254 nm. A coluna utilizada foi RP18, a fase móvel constituiu-se de metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v), em sistema isocrático, volume de injeção de 20µL. As amostras (0,1 mg/mL) foram dissolvidas em éter. A identificação dos compostos se deu por comparação dos tempos de retenção na coluna (TR) das substâncias e as áreas dos picos, respectivamente (Hunneck e Yoshimura, 1996).

A estrutura molecular de ambos os compostos foi confirmada por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- $^1\text{H}$ ), em espectrofotômetro Varian Unity Plus a 400 MHz, utilizando  $\text{CDCl}_3$ .

### 3.4 Síntese do Usnato de potássio

O ácido úsnico purificado foi homogeneizado em água destilada. À mistura foi adicionada, solução de KOH 10% até total dissolução do ácido úsnico, com  $\text{pH}=11$ . O produto foi armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  e em seguida liofilizado para obtenção do sal (usnato de potássio), conforme metodologia descrita por Martins et al. (2014). E a estrutura foi confirmada por RMN- $^1\text{H}$ .

### 3.5 Avaliação da Atividade larvicida

Os extratos e compostos puros foram diluídos em água destilada para preparação de diferentes concentrações. Utilizamos Tween 80 como co-solvente para uma melhor homogeneização. Larvas de *A. aegypti* nos diferentes estágios larvários foram expostas ao tratamento em béqueres de 50 mL contendo 20 mL da solução teste e 20 larvas. Cada teste foi realizado com 3 réplicas. Um grupo controle foi avaliado apenas com água destilada. A mortalidade das larvas expostas aos tratamentos foi avaliada após 24 e 48 horas, e a quantidade de larvas mortas foi registrada em ficha para observação e cálculo de  $\text{CL}_{50}$ . Foram

consideradas mortas, as larvas que não apresentaram atividade motora, após 48 h do início do bioensaio. O cálculo de  $CL_{50}$  para os compostos testados foi realizado pelo programa PROBIT do software StatusPlus2006 (SRIVASTAVA, 2008; NEVES FILHO et al., 2009).

### 3.6 Avaliação da Atividade inseticida

Foram realizados dois testes em adultos de *S. zeamais* expostos ao extrato etéreo de *R. complanata* e ao ácido divaricático:

#### 3.6.1 Toxicidade por ingestão

Realizado de acordo com uma adaptação do método de Xie et al. (1996) descrita por Napoleão et al. (2013). Consiste na preparação de uma dieta artificial com 1,0 g de farinha de trigo autoclavada (Dona Benta®, Bunge Alimentos S.A., Benevides, Brasil) misturada com o extrato ou o ácido divaricático. O material foi solubilizado em acetona destilada formando uma mistura homogenia de 2,0 mL. Foram testadas as concentrações: 4, 8 e 12 mg/g. Para uma maior segurança aos resultados foi estabelecido um controle negativo, solubilizando a farinha de trigo apenas com o solvente (acetona destilada). Após a homogeneização, alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de petri estéreis (90 × 100 × 15 mm) para formar discos (cinco discos por placa) em seguida as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após a incubação, 10 insetos adultos foram expostos em cada placa. Os bioensaios foram realizados em quadruplicata. A massa dos discos de farinha e dos insetos, bem como a mortalidade foram registrados no 7º dia após o início do experimento. Também foram avaliados os índices de deterrência alimentar e parâmetros nutricionais ao final dos 7 dias de exposição. O índice de deterrência alimentar (IDA) foi calculado da seguinte forma:

$$IDA(\%) = 100X\left[\frac{A - B}{A}\right]$$

Na equação, A é a massa ingerida pelos insetos no grupo controle e B é a massa ingerida pelos insetos nos tratamentos com o extrato ou com o ácido divaricático (Isman et al., 1990). De acordo com os dados do IDA, os tratamentos foram classificados como não-deterrente ( $IDA < 20\%$ ), fraco deterrente ( $50\% > IDA \geq 20\%$ ), deterrente moderado ( $70\% > IDA \geq 50\%$ ) ou forte deterrente ( $IDA \geq 70\%$ ) (Liu et al., 2007).

Também foi calculada a taxa de consumo relativo:

$$TCR = \frac{C}{(D * dias)}$$

Em que C é a massa (mg) ingerida e D é a biomassa (mg) inicial dos insetos.

Calculamos a taxa relativa de ganho de biomassa:

$$TGB = \frac{E}{(D * dias)}$$

Nessa equação, E é a biomassa (mg) adquirida ou perdida pelos insetos.

E por fim calculamos a eficiência na conversão do alimento ingerido, da seguinte forma:

$$ECAI = \frac{E}{(C * 100)}$$

Em que E é a biomassa (mg) adquirida ou perdida pelos insetos, C é a massa (mg) ingerida (Xie et al., 1996).

### 3.6.2 Toxicidade por fumigação

Foram utilizados 20 insetos adultos que foram expostos ao extrato etéreo de *R. complanata* ou composto isolado ácido divaricático nas concentrações 78; 156,25; 312,5; 625 e 1250 mg/mL. Potes de plástico (2,5 cm de largura e 5,5 cm de comprimento e 24 mL de volume) foram utilizados e suas tampas cobertas na parte inferior com papel filtro previamente embebido em 20

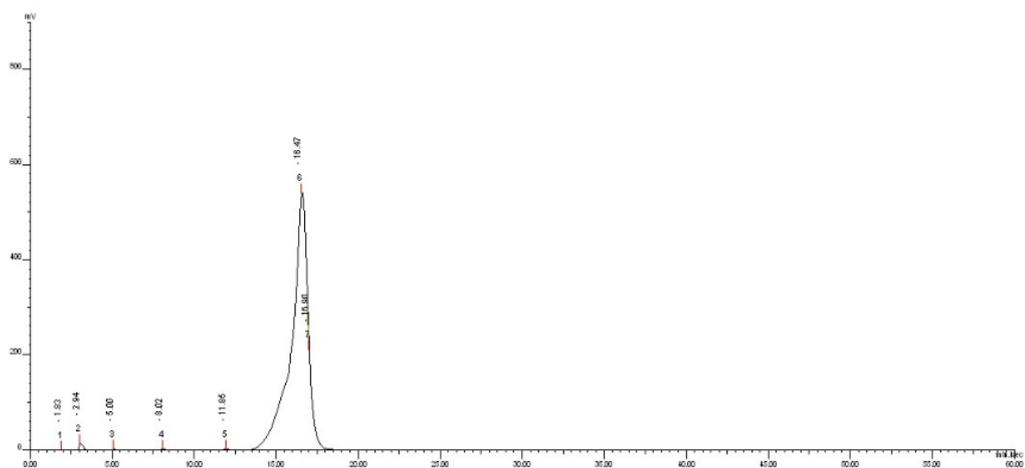
$\mu\text{L}$  das soluções do extrato de *R. complanata* e a do ácido divaricático, ambos diluídos em acetona, já no grupo controle foi utilizado apenas o solvente. Após a evaporação do solvente os insetos foram expostos e o pote fechado, formando assim uma câmara selada. A taxa de mortalidade foi avaliada após 8 dias de exposição. Os ensaios foram realizados em quadruplicata (Chu et al., 2010).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise físico-química dos compostos isolados

#### 4.1.1 Ácido divaricático

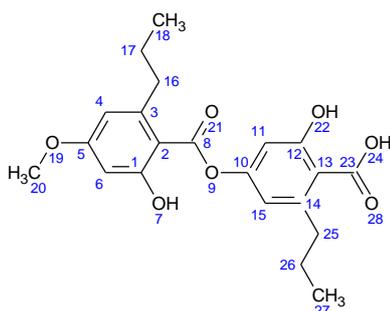
A análise em cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato etéreo de *R. complanata* confirmou a presença do composto com alta concentração e  $R_f = 0,56$ , rendimento de 2,5%. Estes dados corroboram aqueles obtidos por (HUNECK; YOSHIMURA, 1996) que descreve este componente para *R. complanata*. A pureza após isolamento do ácido divaricático, foi confirmada por HPLC com pureza de 99% e um tempo de retenção de 16,47min. (Figura 13).



**Figura 13. Cromatograma líquido de alta eficiência.** Ácido divaricático purificado de *R. complanata* (Rt– 16.47).

#### 4.1.1.1 RMH-H<sup>1</sup>

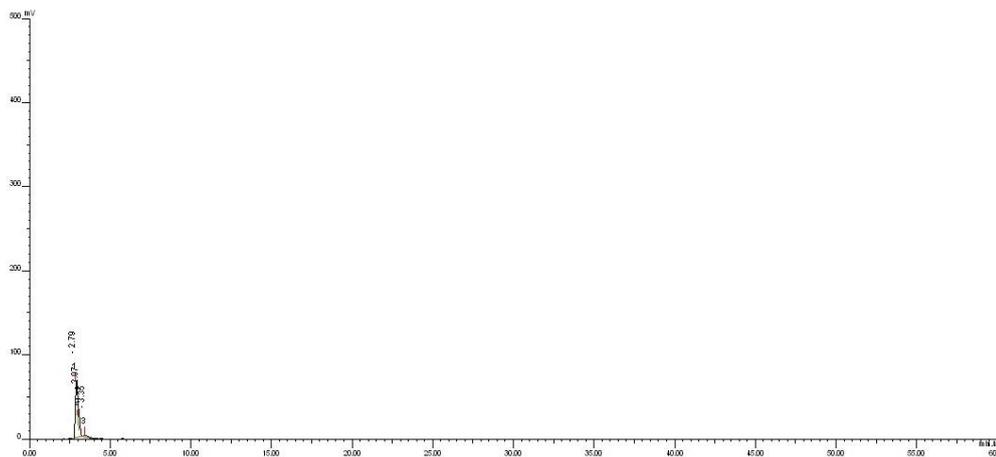
A análise de RMN- $H^1$  do ácido divaricático (Figura 14) mostrou como resultado:  $^1H$  RMN ( $CdCl_3$ , 400MHz):  $\delta_H$  6,759 (1H, *d*,  $J=0,006Hz$ , H6); 6,645 (1H, *d*,  $J=0,006Hz$ , H15); 6,387 (1H, *m*, H4); 3,844 (3H, *s*,  $OCH_3$ -20); 2,996 (4H, *m*,  $CH_2$ -25,26); 1,6878 (4H, *dd*,  $J=0,018Hz$ ); 0,987 (6H, *m*,  $2CH_3$ -18,27), confirmando assim a estrutura do ácido divaricático conforme Huneck e Yoshimura (1996).



**Figura 14 – Estrutura química do ácido divaricático**

#### 4.1.2 Ácido fumarprotocetrário – FUM

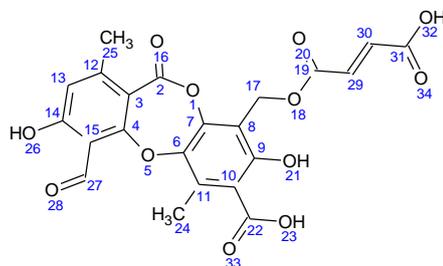
A análise em CCD mostrou o FUM com um  $R_f=0,18$ , presente no extrato acetônico de *C. verticillaris*. E a análise em HPLC mostrou o FUM com um tempo retenção de 2,79min. e 93,79% de pureza conforme figura 15.



**Figura 15. Cromatograma em CLAE do Ácido Fumarprotocetrário (FUM). Rt 2,79 e 93,79% de pureza.**

#### 4.1.2.1 Análise de RMN- $H^1$

A estrutura química foi confirmada por RMN $H^1$  (Figura 16) confirmou a presença da estrutura: RMN- $H^1$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  (H; *m*; int.): 2,38 (3H; s; CH<sub>3</sub>-9), 2,41 (3H; s; CH<sub>3</sub>-9'). 5,26 (2H; s; CH<sub>2</sub>-8'), 6,60 (2H; s; CH-2'; CH-3'), 6,80 (1H; s; CH-5), 10,53 (1H; s; CH-8), 11,93 (1H; s; C-4-OH ou C-2'-OH).

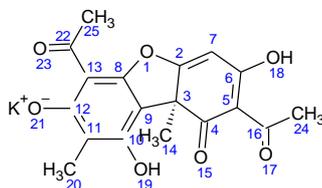


**Figura 16- Estrutura do Ácido fumarprotocetrário.**

#### 4.1.3 Usnato de Potássio (sal do ácido úsnico isolado de *C. substellata*)

A estrutura química foi confirmada por RMN- $H^1$  (Figura 17) confirmou a presença da estrutura: RMN- $H^1$  ( $CdCl_2$ , 400MHz)  $\delta_H$ : 1,76 (3H; s.; CH<sub>3</sub>-14): 2,11

(3H; s; CH<sub>3</sub>-20), 2,66 (3H; s; CH<sub>3</sub>-24). 2,68 (3H; s; CH<sub>3</sub>-25), 5,98 (1H; s; H-7), 11,01 (1H; s; O-H-18), 13,30 (1H; s; OH-19),



**Figura 17 - Estrutura do Usnato de potássio**

#### 4.2 Avaliação da atividade Larvicida

Larvas no início do estágio larval L4, foram expostas ao extrato etéreo de *R. complanata*, ácido divaricático, extrato acetônico de *C. verticillaris* e FUM para verificar a toxicidade com 48h de exposição. Após o experimento foi determinada a CL<sub>50</sub> nas concentrações (ppm) conforme dados apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Atividade larvicida dos extratos de *Ramalina complanata* e *Cladonia verticillaris*; e os compostos isolados ácido divaricático e FUM, testado contra larvas de *Aedes aegypti* em todos os estágios larvários, após 48 horas de exposição.

Material liquênico	Atividade larvicida	
	LC <sub>50</sub>	Desvio padrão
Extrato etéreo de <i>Ramalina Complanata</i>	5,95 ppm	±1,54
Ácido divaricático	29 ppm	±1,62
Extrato acetônico de <i>Cladonia verticillaris</i>	17,40 ppm	±0,99
Ácido Fumarprotocetrárico	13,63 ppm	±10,5

Para o usnato de potássio sintetizado a partir do ácido úsnico isolado de *C. substellata*, foram realizados testes em todos os estágios larvários: L1, L2, L3 e L4. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Atividade larvicida do usnato de potássio, testado contra larvas de *Aedes aegypti* em todos os estágios larvários, após 48 horas de exposição.

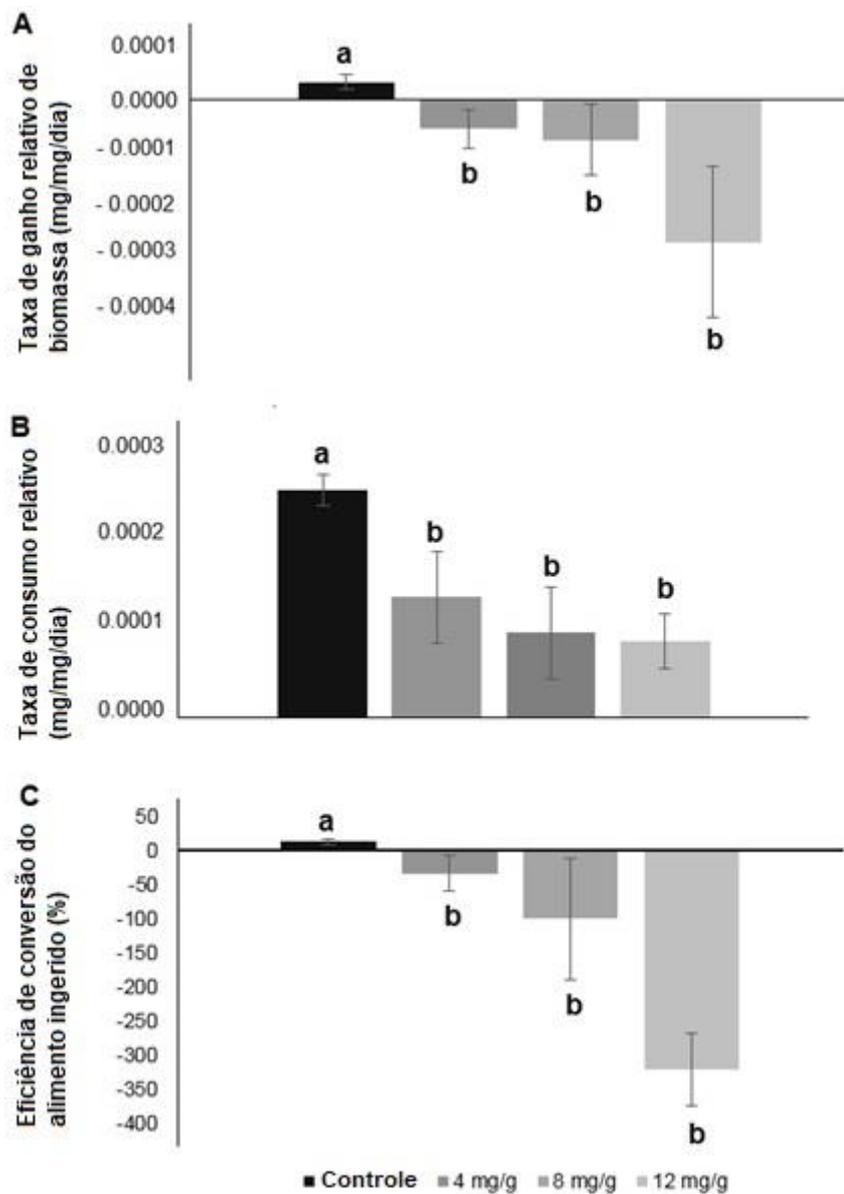
Estágios larvários	Atividade larvicida	
	LC <sub>50</sub>	Desvio padrão
L <sub>1</sub>	0,001 ppm	±0,0001
L <sub>2</sub>	0,19 ppm	±0,01
L <sub>3</sub>	0,18 ppm	±0,02
L <sub>4</sub>	0,36 ppm	±0,01

### 4.3 Avaliação da Atividade praguicida

#### 4.3.1 Toxicidade por ingestão

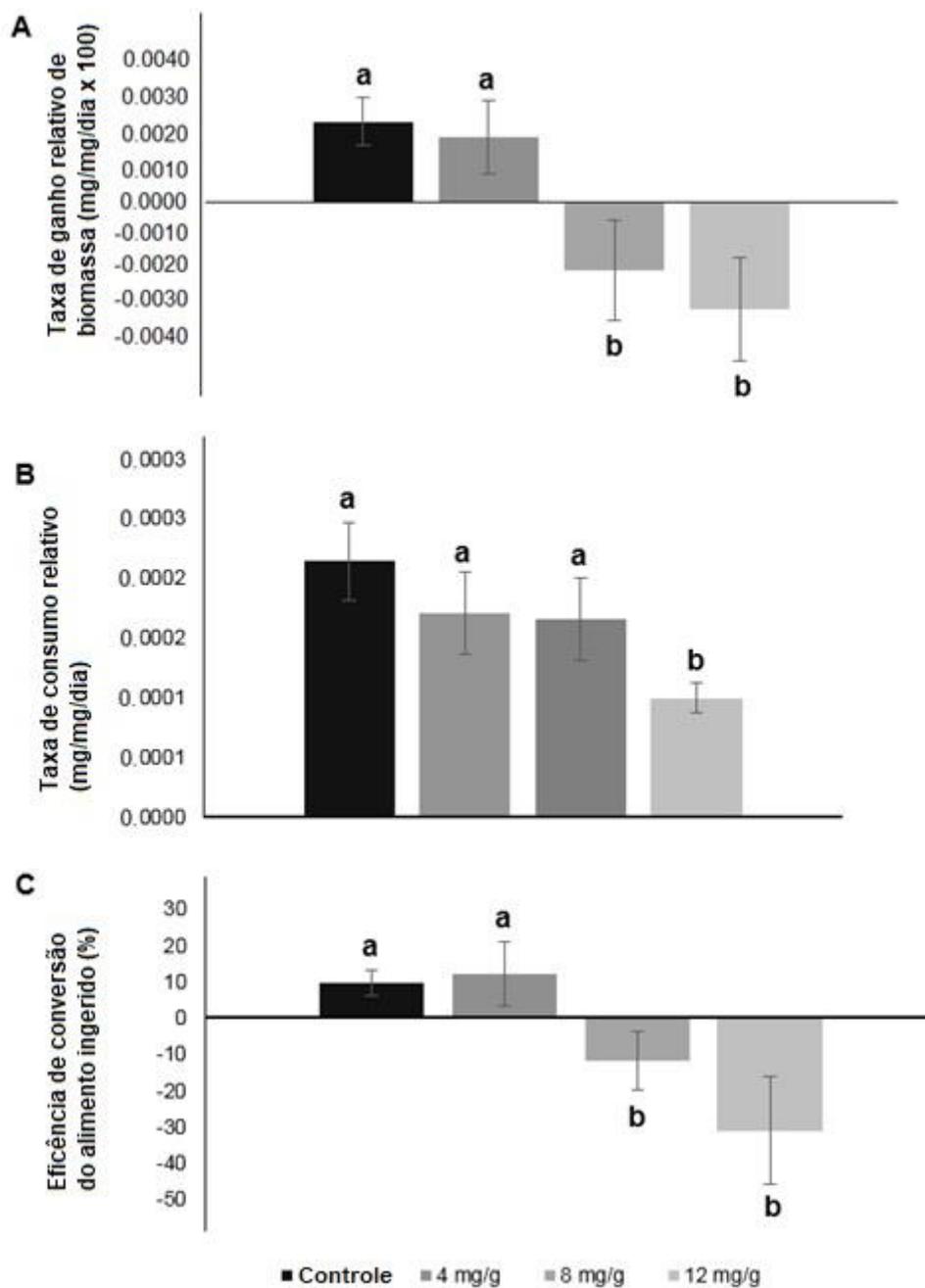
Após 7 dias de exposição, o extrato etéreo *R. complanata* apresentou toxicidade de 5%, 22,5% e 33,33% e o ácido divaricático de 0%, 35 e 52,5% nos tratamentos de 4, 8 e 12 mg/g respectivamente.

Foram observados também parâmetros nutricionais do extrato etéreo, apresentados na figura 18.



**Figura 18. Efeito do extrato etéreo de *Ramalina complanata* em parâmetros nutricionais de adultos de *Sitophilus zeamais*. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa (B) Taxa de consumo relativo. (C) Eficiência de conversão do alimento ingerido. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.**

Tivemos também a avaliação nutricional do inseto com o ácido divaricático (Figura 19).



**Figura 19. Efeito do ácido divaricático em parâmetros nutricionais de adultos de *Sitophilus zeamais*.** (A) Taxa de ganho relativo de biomassa (B) Taxa de consumo relativo. (C) Eficiência de conversão do alimento ingerido. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

#### 4.3.2 Toxicidade por fumigação

O teste de fumigação do extrato etéreo e do ácido divaricático estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4.** Taxa de mortalidade de indivíduos adultos de *Sitophilus zeamais* submetidos ao extrato etéreo de *Ramalina complanata* e o composto isolado ácido divaricático após teste de fumigação.

Contrações (mg/ml)	Taxa de mortalidade (%)	
	<i>R. complanata</i>	Ácido divaricático
Controle	0,00 ± 0,00	6,67 ± 5,77
78	46,67 ± 11,55	33,33 ± 5,77
156,25	50,00 ± 10,00	43,33 ± 5,77
312,5	56,67 ± 15,28	46,67 ± 5,77
625	66,67 ± 15,28	56,67 ± 5,77
1250	63,33 ± 5,77	63,33 ± 5,77

Média ± Desvio padrão das três réplicas de 30 adultos expostos por 7 dias de tratamento e do grupo controle negativo (acetona destilada).

## 5. DISCUSSÃO

O *Aedes aegypti* é hoje um problema de saúde pública, não só no Brasil, mas em vários países do mundo, principalmente os países tropicais. Uma vez que, o *Aedes aegypti* é o vetor do vírus da dengue. A dengue é uma doença causada por um arbovírus do gênero *Falvivirus*, da família Flaviviridae e possui quatro tipos conhecidos e identificados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Focos de proliferação dessa espécie de mosquito têm sido eliminados para evitar a contaminação a seres humanos. O grande problema encontrado na eliminação desse vetor é sua resistência a inseticidas como organofosforados e piretróides. A busca por bioinseticidas tem sido de grande importância para a comunidade científica atual. Para eliminar o mosquito ainda na fase larval, evitando sua proliferação (BARRETO, 2005; SANTOS et al., 2014; VALOTTO et al., 2014).

Uma vez que inseticidas químicos utilizados na eliminação do mosquito transmissor da dengue, acabam eliminando também outros insetos extremamente importantes sob o aspecto ecológico, bioinseticidas podem representar uma alternativa segura para evitar danos ao meio ambiente.

Outros insetos como *Sitophilus zeamais* (praga do milho armazenado) vêm causando grandes prejuízos a produtores agrícolas. As alternativas agroquímicas para a eliminação desta praga atualmente em uso causam desde intoxicações aos aplicadores, além de levar a resistência por parte dos insetos alvo, além de impactos ambientais relevantes ao eliminar outros insetos. Neste cenário a busca por novas alternativas têm sido bastante importantes (LORINI, 2003; BENHALIMA et al., 2004).

Os metabolitos secundários apresentam propriedades biológicas comprovadas, a exemplo do ácido fumarprotocetrárico (FUM) que apresenta atividade expectorante e antioxidante (DE BARROS ALVES et al., 2014), e do ácido lecanórico além de se comportar como antioxidante, também demonstrou ação contra bactérias Gram-positivas quando testada sua avaliação antimicrobiana (GAIKWAD et al., 2014; DE AZEVEDO NÓBREGA et al., 2012).

Os ácidos úsnico, barbático e FUM apresentaram ainda ação praguicida na sobrevivência de cupins, demonstrando assim a capacidade dessas substâncias em atuarem no combate e controle a pragas urbanas (Martins et al., 2018). Extratos de três espécies líquênicas, *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina*

e *Peltigera rufescens*, apresentaram toxicidade por ingestão quando testados frente a *S. granarius* (Emsen et al., 2015). Nossos resultados mostraram que o ácido divaricático e o extrato etéreo do líquen *R. complanata*, apresentaram toxicidade frente a *S. zeamais* e alteração nos parâmetros nutricionais dos indivíduos adultos expostos ao tratamento.

Outra importante atividade biológica dos líquens é sua ação larvicida, o que contribui para ajudar a população no combate a insetos vetores. Cetin e colaboradores (2008) destacam a atividade larvicida do ácido úsnico frente a larvas de *Culex pipiens*, em que após 24 horas de exposição a letalidade chegou a 100% das larvas expostas em 10ppm. Em um estudo mais recente o ácido úsnico também se mostrou efeito larvicida frente a *A. aegypti* (Moreira et al., 2016). Esses dados corroboram com os nossos nos quais larvas em estágio larvário L3 expostas ao extrato etéreo de *R. complanata*, acetônico de *C. verticillaris*, aos ácidos divaricático e fumarprotocetrárico apresentaram uma  $CL_{50}$  abaixo de 30ppm. Verificou-se ainda que o sal usnato de potássio, melhorou a ação larvicida do ácido úsnico (Moreira et al., 2016), visto que em todos os estágios larvários testados em nosso trabalho (L1, L2, L3 e L4) a  $LC_{50}$  foi abaixo de 1ppm.

## 6. CONCLUSÃO

Os compostos de origem liquênica: extrato etéreo de *R. complanata* e acetônico de *C. verticillaris*, bem como seus compostos majoritários, ácidos DIV e FUM, respectivamente mostraram-se como novas alternativas para o controle do *A. aegypti*, visto que afetaram o desenvolvimento desse vetor, ao interromper seu ciclo de vida matando larvas em terceiro estágio e assim impedir a proliferação. E o usnato de potássio, sintetizado a partir do ácido úsnico isolado de *C. substellata*, foi capaz de matar as larvas de *A. aegypti*, em todos os quatro estágios larvários (L1, L2, L3 e L4) em concentrações abaixo de 1ppm, o que torna o usnato uma alternativa rápida e de custo baixo, uma interessante ferramenta contra esse vetor.

Nas condições experimentais o extrato etéreo de *R. complanata* e o composto isolado ácido divaricático apresentaram ação praguicida frente a *S. zeamais* adultos, alterando os parâmetros nutricionais dos insetos expostos. Os insetos tendo ingerido os compostos acabaram morrendo, por não conseguirem metabolizar a biomassa. Houve também a inalação dos compostos como no caso do ácido divaricático que se mostrou tóxico em teste de fumigação.

Desta forma estes fenóis liquênicos se mostraram promissoras alternativas praguicidas. Podendo ser importantes ferramentas, evitando perdas econômicas significativas aos agricultores em decorrência da infestação de *S. zeamais*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMBORN, O. **The species concept in lichen taxonomy**. Säntryck ur Botaniska Notiser, v4, p. 454-457, 1965.

ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. **Bioecologia de *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1885 (Coleoptera: Curculionidae)**, 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em:<[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/Sitophilus/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Sitophilus/index.htm)>.

BELINATO, T.A. e VALLE, D. The Impact of Selection with Diflubenzuron, a Chitin Synthesis Inhibitor, on the Fitness of Two Brazilian *Aedes aegypti* Field Populations. **Plos One**, v.10, n.6, p.e0130719, 2015.

BEN-DOV, E.; et al., Ingested Particles Reduce Susceptibility of Insect Larvae to *Bacillus thuringiensis*, **Journal of Applied Entomology**, v.127, n.3, p.146-152, 2003.

BENHALIMA, H.; CHAUDHRY, M.Q.; MILLS, K.A.; PRICE, N.R. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Marocco. **Journal of Stored Products Research**, v.40, p.241-249, 2004.

BERMUDI, P. M. M.; KOWALSKI, F.; MENZATO, M. M.; FERREIRA, M. DA C.; DOS PASSOS, W. B. S.; OKU, V. J, A.; KUMOW, A.; LUCIO, T. V. F. M.; LIMA-CAMARA, T. N.; URBINATTI, P. R.; NETO, F. C. *Aedes aegypti* breeding site in na underground rainwater reservoir: a warning. **Revista de Saúde Pública**, v.51, n.122, p.1-5, 2017.

BRAGA I.M., VALLE D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.2, p.113-118, 2007.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico. Vol. 51 Nº 7 - Monitoramento da dengue, chikungunya e Zika, SE 01 a 05; síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika até a SE 05 e mobilização nacional para enfrentamento da hanseníase**. Ministério da Saúde. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2020.

BRASIL. **Dengue: causa, sintoma, tratamento e prevenção.** Ministério da Saúde. 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2020.

BRASIL, **Zika vírus: causas, sintomas, tratamento e prevenção.** Ministério da Saúde. 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>. Acesso em: fevereiro de 2020.

BRASIL. Arboviroses em Sergipe: monitoramento e avaliação bimensal. Sergipe: Secretaria de Estado da Saúde. Ano II, nº II, 2016.

BRASIL. Dengue – Orientações técnicas para pessoal de campo. Santa Catarina: Secretaria de Estado da Saúde, 2015.

BOMFIM, Rangel R. et al. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 580-584, 2009.

CARLILE, M.J., WATKINSON, C.S., GOODAY, G.W. **The fungi.** 2ª edição. Academs press, 2001.

CONSOLI, R.A.G.B.; DE OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **SciELO-Editora, FIOCRUZ**, 1994.

DE AZEVEDO NÓBREGA, NADEJDA et al. Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana<sup>1</sup>. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.1, p.101-107, 2012.

DE BARROS ALVES, GLÍCIA MARIA et al. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v.27, n.2, p.139-143, 2014.

EMSEN, Bugrahan; YILDIRIM, Erol; ASLAN, Ali. Insecticidal activities of extracts of three lichen species on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Plant Protection Science**, v.51, n.3, p.155-161, 2015.

FERREIRA, A. C., REIS, P. A., de FREITAS, C. S., SACRAMENTO, C. Q., HOELZ, L. V. B., BASTOS, M. M., ... & SOUZA, L. R. Q. Beyond members of the

Flaviviridae family, sofosbuvir also inhibits chikungunya virus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(2), e01389-18. 2019.

FIOCRUZ. **Dengue: Vírus e Vetor.** Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>. Acesso em: 19 de março 2019.

FOICRUZ, **Zika vírus: perguntas e respostas.** Ministério da Saúde. 2016. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/o-que-e-zika>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2020.

FORATTINI O.P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia.** v.2. São Paulo: EDUSP; p. 846, 2002.

FUNASA - Ministério da Saúde - **Monitoramento da resistência das populações do *Aedes aegypti* no país**, Relatório: documento mimeografiado, Brasília, 2000.

FUNASA. **Dengue: Manual de Normas Técnicas**, 3. ed., 2001.

GAIKWAD, SUBHASH et al. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. *Journal of food science and technology*, v.51, n.10, p.2624-2631, 2014.

GERIS, R.; RIBEIRO, P. R.; BRANDÃO, M. S.; DA SILVA, H. H. G.; DA SILVA, I. G. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *Bioactive Natural Products*, v.37, p.277-376, 2012.

HALE, M. E. How to Know the Lichens. 2nd. **Edition. Wm. C. Brown Co., Dubuque, Iowa**, v.246, 1979.

HAWKSWORTH, David Leslie; HILL, David J. **The lichen-forming fungi.** Blackie Academic and Professional, 1984.

HONDA, NELI KIKI; VILEGAS, WAGNER. A química dos líquens. 1999.

ILLANA-ESTEBAN, C. Líquenes usados en perfumería. *Boletín de La Sociedad Micológica de Madrid*, v.40, p.217-223, 2016.

KAASALAINEN, Ulla et al. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.15, p.5886-5891, 2012.

KUMAR K, UPRETI D K. *Parmelia sp.* (lichens) in ancient medicinal plant lore of India. **Economic Botany**. v.55, n.3, p.458-459, 2001.

LORINI, I. **Manual Técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados. Embrapa Trigo**. 2ª impressão, p.80, Passo Fundo-RS, 2003.

LORINI, I. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p.72, 2008.

LÜCKING, Robert; HODKINSON, Brendan P.; LEAVITT, Steven D. The 2016 classification of lichenized fungi in the *Ascomycota* and *Basidiomycota*—Approaching one thousand genera. **The Bryologist**, v.119, n.4, p.361-416, 2017.

MARCELLI, M.P. **Fungos Liqueenizados: Taxonomia e Características de Importância Taxonômica**. São Paulo: Dep. de Botânica/USP, 1995.

MARTINS, MÔNICA et al. Barbatic acid offers a new possibility for control of *Biomphalaria glabrata* and *Schistosomiasis*. **Molecules**, v.22, n.4, p.568, 2017.

MOXHAM, T. H. Lichens and litmus. **Bulletin Lichen Society**, v.50, p.1-3, 1982.

NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE et al. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of stored products research**, v.54, p. 26-33, 2013.

NASH III, T.H. **Lichen Biology**. Ed.; Cambridge University Press, Cambridge. 2008.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. Ver. Biol. v.64, p.205-207, 2002.

NEVES, I. A.; REZENDE, S. R. F.; KIRK, J. M.; PONTES, E. G.; de CARVALHO, M. Composition and Larvicidal Activity of Essential Oil of *Eugenia Candolleana* DC. (MYRTACEAE) against *Aedes Aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.6, p.2305-2315, 2017.

NIMIS, P. L.; CASTELLO, M.; PERROTTI, M. Lichens as biomonitors of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy). **Lichenologist**, v.22, p.333-344. 1990.

OETTL, SARAH K. et al. Imbricarinic acid and perlatolic acid: Multi-targeting anti-inflammatory depsides from *Cetrelia monachorum*. **PLoS One**, v.8, n.10, p.e76929, 2013.

PODTEROB, A.P. Medicinal plants chemical composition of lichens and their medicinal applications. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v.42, n.10, p.582-588, 2008.

PUCKETT, K. J. Bryophytes and lichens as biomonitors of metal deposition. **Bibl. Lichenology**, v.30, p.231-268, 1988.

PURVIS, O.W. Lichens. London, The Natural History Museum, 2000.

REDDY, VENKATA M.; O'SULLIVAN, JOHN F.; GANGADHARAM, PATTISAPU R.J. Antimycobacterial activities of riminophenazines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, n.5, p.615-623, 1999.

REDÓN, J. Líquenes Antárticos. Instituto Antártico Chileno (INACH). **Santiago de Chile**, p.123, 1985.

REECE, J.B.; URRY, L.A.; CAIN, M.L.; WASSERMAN, S.A.; MINORSKY, P.V.; JACKSON, R.B.; **Biologia de Campbell. 10ª Edição**, Porto Alegre, Artmed, p1442, 2015.

RIBEIRO, B.M.; GUEDES R.N.C., OLIVEIRA, E.E.; SANTOS, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamays* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**. v.39, p. 21-31, 2003.

RIBEIRO, L.P.; RIGO, D.S.; PEREIRA, E.; COSTA, E.C. Pós inertes alternativos no controle do gorgulho do milho *Sitophilus Zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, p.719-722, 2007.

ROSSETO, C.J. **Resistência do milho às pragas da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddii), *Sitophilus zeamais* (Mots.) e *Sitotroga cerealella* (Olivier)**. Tese (Doutorado), ESALQ, Piracicaba, 11p., 1972.

ROZENDAAL J.A. Vector control methods for use by individuals and communities. **World Health Organization**, Geneve, 1997.

SILVA, J. S.; MARIANO Z.F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia**, v.3, p163-175, 2008.

TIWARI, PRITI et al. Antifungal activity of a common Himalayan foliose lichen *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale. **Nature and science**, v.9, n.9, p. 167-171, 2011.

XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M.E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E.C. **Biologia de liquens**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p.624, 2006.

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C.T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 431 p., 1976.

YILDIRIM, E. et al. Insecticidal Activity of Lichens against the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 22, n.2, p.151-156, 2012.

\_\_\_\_\_. Insecticidal effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Agriculture and Biology**, v.14, n.2, 2012.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of lichen substances**. p.1-504, 1996.

YU, XUELONG et al. Usnic acid derivatives with cytotoxic and antifungal activities from the lichen *Usnea longissima*. **Journal of natural products**, v.79, n.5, p.1373-1380, 2016.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M.; OLIVEIRA, E. S. F.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.25, n.2, p.391-404, 2016.

# APÊNDICES

## Apêndice A

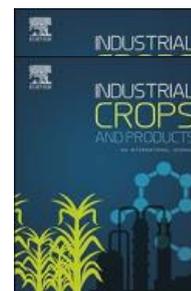
### Artigo 1

Trabalho a ser submetido para – **Industrial Crops**

Fator de Impacto – **3,849**

Qualis – **B1 (Biotecnologia)**

ISSN: **0926-6690**



### **Atividade inseticida do extrato de *Ramalina complanata* e ácido divaricático contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae)**

André Severino da Silva<sup>1,3\*</sup>, Camila Soledade de Lira<sup>1</sup>, Hallysson Douglas Andrade de Araújo<sup>4</sup>, Fábio Henrique Galdino dos Santos<sup>3</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>4</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>4</sup>, Nicácio Henrique da Silva<sup>4</sup>, Eugênia Cristina Gonçalves Pereira<sup>5</sup>, Mônica Cristina Barroso Martins<sup>4</sup>, Emerson Peter Silva Falcão<sup>2</sup>, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

\*Autor para correspondência: E-mail: andresilvaa31@gmail.com

## Resumo

O *Sitophilus zeamais* é uma praga que ataca grãos, causando a perda de nutrientes e a baixa lucratividade para os produtores. Por isso, estudos voltados para o controle dessa praga têm sido de grande importância atualmente. Uma das alternativas são os inseticidas artificiais. No entanto, esses compostos causam resistência por parte dos insetos e danos ambientais. Para resolver essa situação existem estudos com produtos de origem natural. Os metabólitos secundários de origem liquênica têm apresentado atividades biológicas importantes, como, termicida contra *Nasutitermes corniger*. Nesse estudo tivemos como objetivo avaliar a atividade praguicida do extrato etéreo do líquen *Ramalina complanta* e de seu metabólito secundário, ácido divaricático frente a *Sitophilus zeamais*, através dos testes de toxicidade por ingestão e fumigação. Para o teste de fumigação os insetos expostos às concentrações 1,562 e 3,125 mg/L de ar apresentaram uma toxicidade acima de 50%, tanto ao extrato etéreo de *R. complanata* quanto ao ácido divaricático. Na toxicidade por ingestão, os insetos expostos ao extrato na concentração 12mg/g apresentaram uma forte deterrência alimentar, e na concentração 8mg/g, apesar de ingerirem o extrato, não houve conversão em biomassa. Os insetos expostos ao composto isolado, ácido divaricático apesar de terem apresentado baixa deterrência alimentar na concentração 12mg/g, não conseguiram converter o alimento ingerido em biomassa e acabaram morrendo. O extrato etéreo de *R. complanta* e o ácido divaricático têm forte potencial para serem utilizados como alternativa no controle ao *S. zeamais*.

**Palavras-chave:** bioinseticida; gorgulho-do-milho; metabólito liquênico.

**ABSTRACT**

*Sitophilus zeamais* is a pest that attacks grains, causing loss of nutritional value and reducing profitability for producers. The control of this pest is done using synthetic insecticides, however, these have been associated with the emergence of resistant populations and environmental damage. In this study, we evaluated the insecticidal activity of ether extract of lichen *Ramalina complanata* and of an isolated metabolite, divaricatic acid, against *S. zeamais*. Toxicity tests were performed by ingestion and fumigation. In the ingestion toxicity test, the extract promoted a maximum mortality of 33.33% (12 mg / g) and presented a food deterrent effect at all concentrations. There was no conversion of the ingested food into biomass in the treatments with the extract. Insects exposed to divaricatic acid showed a mortality of up to 52.50% (12 mg / g) and also failed to convert the food into biomass. A weak deterrent effect was detected at the concentration of 12 mg / g. In the fumigation test, mortality of 46.67–63.33% and 33.33-63.33% was observed in the treatments with extract and divaricatic acid (0.195–3.125 mg / L of air), respectively. In conclusion, the ether extract of *R. complanata* and divaricatic acid have the potential to be used as an alternative to control *S. zeamais*.

**Keywords:** bioinsecticide; corn weevil; lichen metabolite.

## INTRODUÇÃO

O *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) é considerado a principal praga de grão de milho armazenado, causando danos que podem alcançar perdas numericamente significativas para a produção mundial, uma vez que esta praga inviabiliza o milho para o consumo. Este problema é particularmente importante em países tropicais como o Brasil, onde o clima favorece o desenvolvimento deste inseto (Rees, D.P., 1996).

A fosfina é o fumigante mais usado para combater pragas de grãos armazenados. Porém, já é descrita resistência de insetos a este produto sintético e seu uso está atrelado a preocupações com o meio ambiente e a saúde humana (Pimentel et al., 2009). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias capazes de controlar esses organismos. Muitas substâncias vegetais que demonstram efeito inseticida em pragas de produtos armazenados vêm sendo estudados como alternativas promissoras aos inseticidas sintéticos (Braga, 2019).

Diversos óleos essenciais têm se mostrado eficientes no controle de *S. zeamais*, com atividade repelente e toxicidade por contato e fumigação, tais como os óleos obtidos de *Alpinia purpurata*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana*, *Foeniculum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum* e *Piper hispidinervum* (Estrela et al., 2006; Nerio et al., 2010; Lira et al., 2015; Araújo et al., 2019). O óleo essencial de *Mentha piperita* (Hortelã-pimenta) estudado em teste de fumigação contra duas pragas mundiais de produtos armazenados, *Sitophilus oryzae* e *Tribolium castaneum*, apresentou uma mortalidade de 100% nos indivíduos adultos expostos após 24h de tratamento nas concentrações de 75,0 µL/L de ar e 100,0 µL/L de ar (Rajkumar et al., 2019).

Estudos realizados com o extrato metanólico da folha de *Agave americana* contra *S. oryzae* demonstraram ação repelente e toxicidade por contato (Maazoum, 2019). Extratos obtidos de plantas como *Myracrodruon urundeuva*, *Schinus terebinthifolia*, *Zingiber officinales* e *Plumbago zeylanica* têm apresentado atividades fagodeterrente e tóxica para *S. zeamais* (Napoleão et al., 2013; Camaroti et al., 2018; Akinneye, 2019).

Existem ainda alguns estudos com atividade inseticida de compostos derivados de líquens. O composto ácido divaricático apresentou atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, ocasionando a morte de todos os indivíduos adultos na concentração 5 µg/mL e de embriões em 20 µg/mL. Ainda nesse estudo, o ácido divaricático se mostrou como um antiparasitário, uma vez que causou uma mortalidade de 100% dos indivíduos de *Schistosoma mansoni* expostos à concentração de 10 µg/mL, demonstrando assim sua capacidade de combater determinados organismos (Silva et al., 2018).

Extratos dos líquens de *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina* e *Peltigera rufescens* foram tóxicos por ingestão para adultos de *Sitophilus granarius* (L.) (Emsen, 2015). Martins e colaboradores (2018) verificaram um efeito termicida nos compostos ácidos úsnico, fumarprotocetrárico e barbático, isolados dos líquens *Cladonia substellata*, *C. verticillaris* e *Cladia aggregata*, respectivamente, contra o cupim *Nasutitermes corniger*.

No presente trabalho foi avaliada a toxicidade por fumigação e ingestão de extrato etéreo de *Ramalina complanata* e do ácido divaricático, composto isolado desse extrato. Este é o primeiro trabalho avaliando a atividade inseticida de extrato de líquen contra *S. zeamais*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do material liquênico**

O líquen *Ramalina complanata* foi coletado na região Nordeste do Brasil, no município de Saloá, Pernambuco, Brasil (09° 01.399' S, 36°47.565' W), a uma altitude de 1052 metros, no período do inverno (mês de junho). O talo foi identificado de acordo com características morfológicas e um voucher (n° 54299) foi depositado no Herbário Geraldo Mariz do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### **Preparação de extrato etéreo de *Ramalina complanata* e isolamento do ácido divaricático**

O material liquênico seco (30 g) foi submetido à extração em aparelho de Soxhlet, com 100 mL de éter dietílico a uma temperatura de 40 °C. Logo após, o solvente foi eliminado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e armazenado em dessecador até peso constante. O isolamento do ácido divaricático seguiu a metodologia descrita por Asahina e Shibata (1954), na qual o extrato de *R. complanata* foi dissolvido em etanol absoluto e refluxado em banho maria a 40 °C por 20 min e em seguida armazenado em dessecador.

### **Análise físico-química do ácido divaricático**

O ácido divaricático foi submetido à cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica gel Merck® F<sub>254nm</sub> (Culberson, 1969). O sistema de eluição utilizado foi tolueno/dioxano/ácido acético (45:12,5:2 v/v/v), revelado em ácido sulfúrico a 10%. A visualização das bandas resultantes do processo ocorreu por meio de luz UV, a 254/312 nm.

Para verificar a pureza do ácido divaricático, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um cromatógrafo Hitachi modelo 655-11,

acoplado a um detector UV (254 nm) da marca CG, modelo 437. A coluna utilizada foi RP18, a fase móvel constituiu-se de metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v), em sistema isocrático, volume de injeção de 20 µL. Utilizou-se como padrão o ácido divaricático cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica – UFPE. As amostras (0,1 mg/mL) foram dissolvidas em éter. A identificação do composto se deu por comparação dos tempos de retenção na coluna (TR) e a área do pico com o perfil obtido para o padrão.

A estrutura molecular foi confirmada por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-<sup>1</sup>H), em espectrofotômetro Varian Unity Plus a 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub>.

## **Insetos**

A criação de *S. zeamais* utilizada é mantida no Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Pernambuco, com autorização (nº. 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Os insetos foram criados em potes de vidro contendo grãos de milho livres de agrotóxicos, mantidos em BOD a 25°C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo 12:12. Para os ensaios foram utilizados insetos de 30 a 40 dias de idade.

## **Avaliação da toxicidade por ingestão**

A avaliação da toxicidade por ingestão do extrato etéreo de *R. complanata* e do ácido divaricático para *S. zeamais* foi realizada de acordo com uma adaptação do método de Xie et al. (1996) descrita por Napoleão et al. (2013). Para cada bioensaio foi preparada uma dieta artificial misturando-se 1,0 g de farinha de trigo autoclavada (Dona Benta®, Bunge Alimentos S.A., Benevides, Brasil) com extrato ou composto, diluídos em 2,0 mL (acetona destilada) formando uma solução das amostras para obter as concentrações finais de 4, 8 e 12 mg/g (mg de extrato/composto puro por g de farinha de trigo). Foi estabelecido um grupo controle, misturando a farinha de trigo apenas em acetona. Após homogeneização, alíquotas de 100 µL da suspensão foram transferidas para placas de Petri estéreis (90 × 100 mm) para formar discos (cinco discos por placa) após incubação por 24 h a 37 °C. As placas, contendo os discos secos foram pesadas. Em seguida, 10 insetos foram pesados em potes de plástico e então transferidos para as placas de Petri contendo os discos. Os bioensaios foram realizados em quadruplicata. A massa dos discos de farinha e dos insetos foram registradas novamente no sétimo dia após o início do experimento, bem como a taxa de mortalidade. Os insetos foram considerados mortos quando seus apêndices abdominais não se movimentavam e nenhuma outra reação era observada quando tocados com pinças.

A partir dos dados obtidos foram calculados os índices de deterrência alimentar e os parâmetros nutricionais. O índice de deterrência alimentar (IDA) foi calculado da seguinte forma:  $IDA (\%) = 100 \times [(A-B)/(A)]$ , onde A é a massa ingerida pelos insetos no grupo controle e B é a massa ingerida pelos insetos no teste (Isman et al., 1990). De acordo com os dados do IDA, os tratamentos foram classificados como não-deterrente ( $IDA < 20\%$ ), deterrente fraco ( $50\% > IDA \geq 20\%$ ), deterrente moderado ( $70\% > IDA \geq 50\%$ ) ou deterrente forte ( $IDA \geq 70\%$ ) (Liu et al., 2007). De acordo com Xie et al. (1996) foram calculados os seguintes índices nutricionais: taxa de consumo relativo (TCR) =  $C/(D \times \text{dias})$ , onde C é a massa (mg) ingerida e D é a biomassa (mg) inicial dos insetos. A taxa relativa de ganho de biomassa (TGB) =  $E/(D \times \text{dias})$  onde, E é a biomassa (mg) adquirida ou perdida pelos insetos; e a eficiência na conversão do alimento ingerido (ECAI) =  $E/(C \times 100)$ .

### **Avaliação da toxicidade por fumigação**

O teste de toxicidade por fumigação foi realizado segundo Chu et al. (2010) em recipientes de plástico (2,5 cm de largura x 5,5 cm de comprimento; volume de 24 mL) cujas tampas foram cobertas internamente com papel de filtro (2 cm de diâmetro). Ao papel filtro, foram adicionados 20 µL de solução (extrato de *R. complanata* ou do ácido divaricático, ambos diluídos em acetona destilada) para formar as concentrações de 0,195; 0,390; 0,781; 1,562 e 3,125 mg/L de ar. Para o grupo controle, foi utilizado apenas a acetona destilada. Após 1 min para evaporação do solvente, 20 insetos foram colocados em cada recipiente e as tampas foram fechadas firmemente para formar uma câmara selada. Após 24 h de exposição, os insetos foram transferidos para novos recipientes, sem amostra, e a taxa de mortalidade foi registrada após 7 dias. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

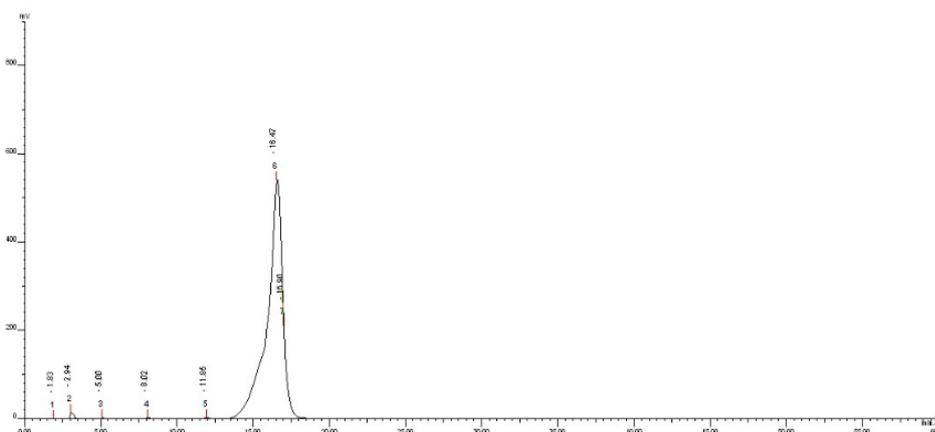
### **Análise estatística**

Para calcular o desvio padrão (DP) e a diferença entre os grupos tratados através do teste de Tukey de comparação múltipla, nível de significância ( $p < 0,05$ ), foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). A  $CL_{50}$  (concentração letal para causar 50% de mortalidade) foi calculada usando a análise Probit com um intervalo de confiança de 95%, através do software StatPlus 2006 (AnalystSoft, Canada).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análise físico-química do ácido divaricático

O ácido divaricático foi obtido a partir do extrato etéreo de *R. complanata*. Análise feita em CCD mostrou um  $R_f = 0,56$ , confirmando a presença do ácido divaricático com rendimento de 2,5%, em relação ao extrato bruto obtido de 30g do líquen. Para verificar a pureza do composto utilizamos a análise em HPLC (Figura 1), onde foi detectado um tempo de retenção de 16,47 min, similar ao padrão e 99% de pureza.



**Figura 2. Cromatograma em HPLC do Ácido divaricático purificado de *R. complanata* (RT – 16.47).**

Os dados de RMN- $^1\text{H}$  confirmaram a estrutura do ácido divaricático: (400MHz,  $\text{CdCl}_2$ )  $\delta$  0,98 (6H, T, 5,4Hz, Me, C18, 27); 1,68 (4H, m, CH<sub>2</sub> – C-16 e 26); 2,97 (4H, m, CH<sub>2</sub>, C-17, 25); 2,93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>, C-20); 6,38 (2H, d, 2,4Hz, C4, 11); 6,64 (1H, d, 2,4Hz, C15); 6,76 (1H, d, 2,4Hz, C-6); 10,65 (2H, s, OH, C7, 22).

### 3.2 Avaliação da toxicidade por ingestão

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de toxicidade por ingestão. O extrato etéreo induziu mortalidade dos adultos de *S. zeamais* de até 33,33%, enquanto o ácido divaricático promoveu uma mortalidade de 52,5% na maior concentração testada.

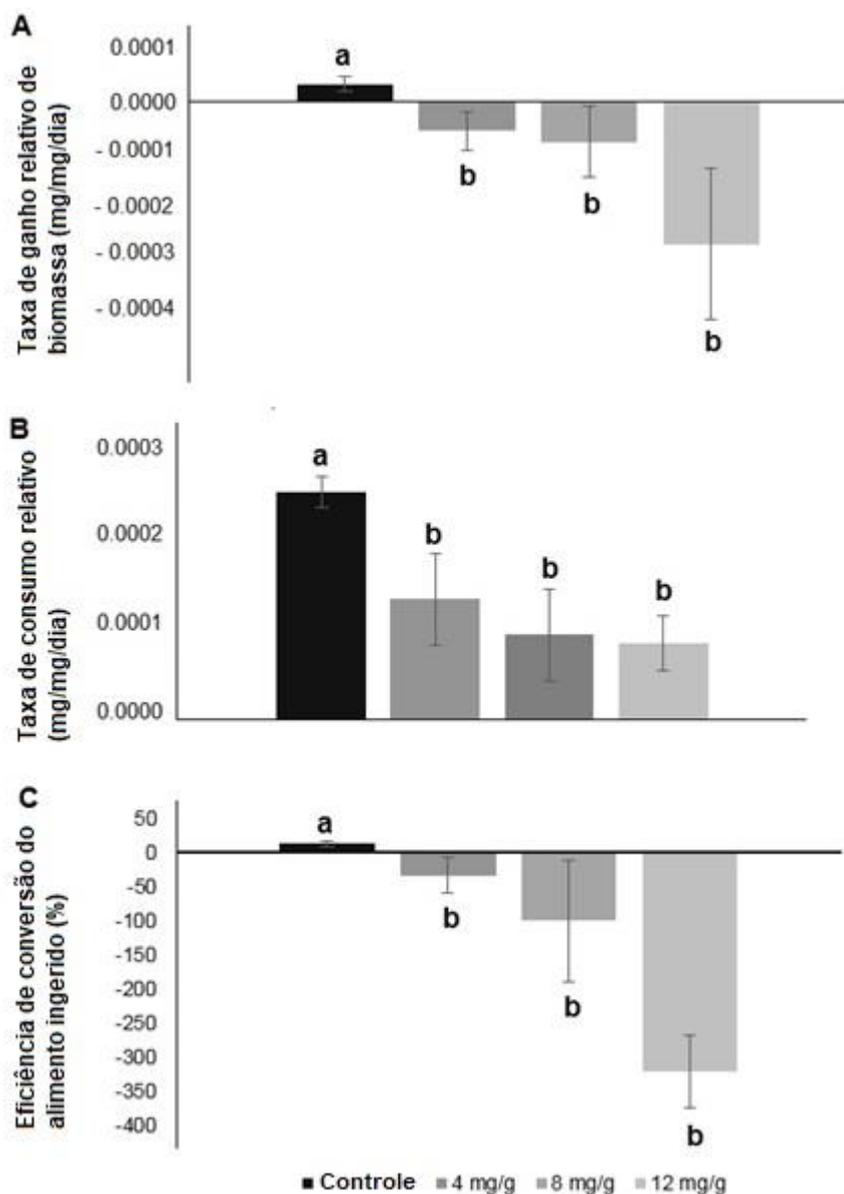
**Tabela 2.** Taxa de mortalidade de indivíduos adultos de *S. zeamais* após serem submetidos à dieta contendo o extrato etéreo de *R. complanata* ou o composto isolado ácido divaricático.

Concentrações (mg/g)	Taxa de mortalidade (%)	
	<i>R. complanata</i>	Ácido divaricático
<b>Controle</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>4</b>	5,00 ± 10,00	0,00 ± 0,00
<b>8</b>	22,50 ± 5,57	35,00 ± 5,77
<b>12</b>	33,33 ± 11,55	52,50 ± 9,57

Média ± desvio padrão das quatro réplicas. Os dados foram obtidos após 7 dias de tratamento. No grupo controle foi utilizada acetona destilada.

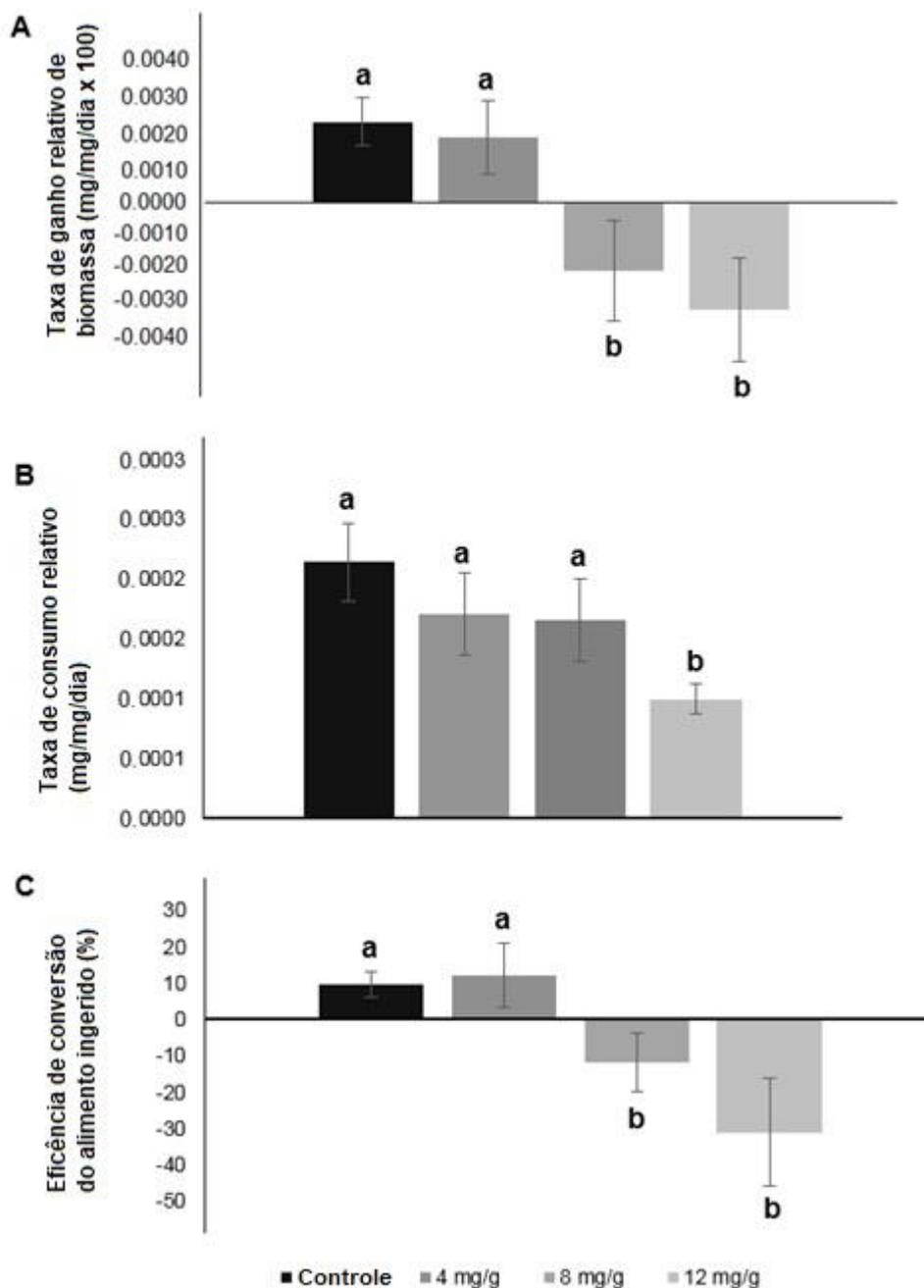
Camaroti et al (2018) demonstraram que o extrato salino da folha de *Schinus terebinthifolius* teve efeito na mortalidade de *S. zeamais* após 7 dias de tratamento, 100 mg/g matou 32%, 200 mg/g matou 40% e 250 mg/g matou 51% dos insetos. A lectina de *Opuntia ficus-indica*, quando associada a dieta artificial de *S. zeamais* não foi significativa em relação à mortalidade de insetos expostos às concentrações 15, 60 e 95mg/g nem indicou efeito dissuasivo nas concentrações 60 e 95 mg/g, no entanto, causou perda de massa por parte dos insetos (De Santana Souza et al., 2018). O extrato foliar de *Myracrodruon urundeuva* causou a morte de 50% de indivíduos adultos de *S. zeamais* expostos a 72,4mg/g (Napoleão et al., 2013). Os nossos dados mostram que em 12mg/g o extrato etéreo da *R. complanata* matou 33% e o ácido divaricático matou 52% para essa mesma concentração. Os compostos liquênicos apresentaram atividade maior que aquela demonstrada pelos compostos de Napoleão et al. (2013).

Foram avaliados os parâmetros nutricionais dos insetos após exposição ao extrato (Figura 3) e ao ácido divaricático (Figura 4). Houve perda de biomassa dos *S. zeamais* expostos ao extrato (Fig. 3A) e a taxa de consumo relativo foi menor nos tratamentos com o extrato em relação ao controle (fig. 3B). Devido a essa ingestão do extrato, por parte dos insetos no tratamento, pode-se perceber que o extrato apresentou um fraco índice de deterrência alimentar (IDA%) na concentração 4mg/g (IDA: 50%), moderada deterrência na concentração 8mg/g (IDA: 67%) e uma forte deterrência na concentração 12mg/g (IDA: 71%). Além disso, não houve uma conversão do alimento ingerido (fig. 3C), mostrando que os insetos utilizaram reservas energéticas para sua sobrevivência.



**Figura 3.** Efeito do extrato etéreo de *R. complanata* em parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais*. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa (B) Taxa de consumo relativo. (C) Eficiência de conversão do alimento ingerido. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Em relação ao composto isolado, ácido divaricático, pode-se observar que também houve diminuição da biomassa dos insetos expostos às concentrações de 8 e 12 mg/g (Figura 4A). O consumo relativo (Figura 4B) foi estatisticamente significativo na concentração 12mg/g, mas sendo menor que o grupo controle. O ácido divaricático apresentou fraca deterrência alimentar nas concentrações 4mg/g e 8mg/g (IDA: 5% e 16%, respectivamente) e moderada na concentração 12mg/g (IDA: 51%). No entanto, mesmo os insetos tendo se alimentado do composto, é possível perceber que a taxa de eficiência na conversão de biomassa do alimento ingerido foi negativa nas doses de 8 e 12 mg/g.



**Figura 4.** Efeito do ácido divaricático em parâmetros nutricionais de adultos de *S. zeamais*. (A) Taxa de ganho relativo de biomassa (B) Taxa de consumo relativo. (C) Eficiência de conversão do alimento ingerido. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Camaroti et al. (2018) estudaram o extrato da folha de *Schinus terebinthifolius* e a lectina SteLL do extrato no experimento de ingestão do *S. zeamais*. O extrato da folha de *S. terebinthifolius* teve efeito deterrente na mortalidade por ingestão de *S. zeamais*. Já a lectina SteLL não apresentou efeito deterrente. Os insetos se alimentaram de lectina, mas não houve a conversão em biomassa e com isso os insetos utilizaram de reserva energética para

sobrevivência. Em nosso trabalho, os insetos ingeriram o extrato etéreo *R. complanata* mas eles não conseguiram converter em biomassa e acabaram morrendo. O mesmo efeito foi observado para o experimento de ingestão usando o ácido divaricático no *S. zeamais*.

No presente trabalho, tanto o extrato de *R. complanata* quanto o ácido divaricático isolado demonstraram efeitos anti-nutricionais nos insetos expostos ao tratamento. Semelhantemente Lira et al. (2015) ao testarem o óleo de *A. purpurata* perceberam que, quando ingerido por adultos de *S. zeamais*, o óleo não aumentou a taxa de mortalidade nos insetos, no entanto afetou a nutrição, pois o ganho de biomassa e a eficiência na conversão de alimentar foram negativas.

Emsen et al. (2015) demonstraram que extratos dos líquens *Lecanora muralis* (Schreb.) Rabenh., *Letharia vulpina* (L.) Hue, e *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb apresentaram atividade de mortalidade em ingestão frente a adultos de *Sitophilus granarius*. Os extratos de *L. muralis* e *L. vulpina* causaram uma mortalidade de 100% dos indivíduos em 20 mg/mL e o extrato de *P. rufescens* provocou 86% de mortalidade na mesma concentração.

Compostos isolados de líquens têm apresentado atividade inseticida por ingestão frente a outras pragas, como relatado por Martins et al. (2018), que testaram ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico e ácido barbático, isolados respectivamente de *Cladonia substellata*, *Cladonia verticillaris* e *Cladia aggregata* frente a cupins da espécie *Nasutitermes corniger*. Nesse estudo, foi observado que em 10 dias de exposição houve uma mortalidade de 100% dos indivíduos, em todas as concentrações testadas (5, 7 e 10 mg/mL).

Ainda são poucos os trabalhos de líquens e seus metabólitos secundários para controle de pragas. O presente trabalho destaca a ação inseticida do composto ácido divaricático de origem líquênica, o que suscita a necessidade de mais estudos utilizando esses organismos e seus metabólitos secundários buscando a descoberta de inseticidas de origem natural.

### **3.2 Avaliação da toxicidade por fumigação**

A análise dos resultados do teste de fumigação (Tabela 1) mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre a mortalidade no grupo controle (acetona destilada) e nos grupos tratados (*R. complanata* ou ácido divaricático). Isso mostra que houve toxicidade por inalação do extrato e do composto isolado. Além disso, as taxas de mortalidade foram semelhantes nos ensaios com o extrato e o composto isolado, indicando que o composto ativo do extrato de *R. complanata* é o ácido divaricático.

**Tabela 1.** Taxa de mortalidade por fumigação de indivíduos adultos de *S. zeamais* expostos ao extrato etéreo de *R. complanata* e ao composto isolado ácido divaricático.

Contrações (mg/ml)	Taxa de mortalidade (%)	
	<i>R. complanata</i>	Ácido divaricático
Controle	0,00 ± 0,00	6,67 ± 5,77
78	46,67 ± 11,55	33,33 ± 5,77
156,25	50,00 ± 10,00	43,33 ± 5,77
312,5	56,67 ± 15,28	46,67 ± 5,77
625	66,67 ± 15,28	56,67 ± 5,77
1250	63,33 ± 5,77	63,33 ± 5,77

Os valores correspondem à média ± desvio padrão das quatro réplicas. Os adultos foram expostos por 24 horas e a mortalidade registrada 7 dias após essa exposição.

Diversos óleos essenciais têm sido descritos com essa propriedade. Lira et al. (2015) testaram a toxicidade por fumigação do óleo essencial de *Alpinia purpurata*, o qual foi capaz de causar a morte dos insetos com 41,4 µL/L de ar. Os dados apresentados na tabela 1, mostram uma toxicidade por fumigação superior a 50% nos indivíduos expostos ao tratamento com o extrato etéreo de *R. complanata* e o composto isolado, ácido divaricático, nas concentrações 1,562 e 3,125 mg/L de ar. Ainda sobre a atividade de toxicidade por fumigação frente a *S. zeamais*, foi observado que o óleo essencial de *Artemisia vestita* causou a mortalidade de 50% dos indivíduos adultos expostos à concentração de 13,42 mg/L de ar (Chu, 2010). O óleo essencial das partes aéreas florais de *Dipsacus japonicus* teve ação fumigante contra as pragas *S. zeamais* (LC<sub>50</sub>=10,11mg/l de ar) e *Tribolium castaneum* (LC<sub>50</sub>=5,26mg/L de ar) (Liu et al., 2013). Kim et al (2016), demonstraram a toxicidade por fumigação dos óleos essenciais de *Hyssopus officinalis*, *Origanum majorana* e *Thymus zygis* frente a adultos de *Sitophilus oryzae* na concentração de 25 mg/L de ar. Nosso trabalho é o primeiro da literatura com teste de fumigação utilizando líquens e seus metabólitos secundários frente a *Sitophilus zeamais*

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato etéreo de *R. complanata* e o ácido divaricático isolado apresentaram toxicidade por fumigação e por ingestão para adultos de *S. zeamais*. O ácido divaricático apresentou maior toxicidade em ambos os casos. A toxicidade por ingestão está possivelmente relacionada a efeitos anti-nutricionais que prejudicaram a conversão do alimento em biomassa pelos insetos. Sendo assim, o extrato e o ácido divaricático têm potencial para serem usados como inseticidas de origem natural contra *S. zeamais*.

#### 5. AGRADECIMENTOS

A todos os colaboradores, ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE), à agência de fomento FACEPE (APQ- 0443-1.06/15) e ao Departamento de Química Fundamental (DQF/UFPE).

#### 6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.A.C.; PESSOA, E.B.; GOMES, J.P.; SILVA, A.S. Emprego de extratos vegetais no controle das fases imatura e adulta do *Sitophilus zeamais*. **Agropecuária Técnica**, Areia, v.26, n.1, p.46-53, 2005.
- ARAÚJO, A.M.N, Oliveira, J.V., França, S.M., Navarro, D.M.A.F, Barbosa, D.R.S., Dutra, K.A., Toxicity and repellency of essential oils. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.23, n.5, p.372-377, 2019.
- ASAHINA, Y., Shibata, S. Chemistry of Lichen Substances. **Japan Society for the Promotion of Science**, Tokio. 1954.
- BRAGA, S.; SILVA, M. E.; RAGA, A. Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). **Biológico, São Paulo**, v. 81, n. 1, p. 1-30, 2019.
- CAMAROTI, João Ricardo Sá Leitão et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 81-89, 2018.
- CHU, S.S., Liu, Q.R., Liu, Z.L. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.38, p.489-492. 2010.
- Cosimi, S.; Rossi, E.; Cioni, P. L.; Canale, A. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.125-132, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.10.002>

Culberson, C.F., Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. **The University of North Carolina Press**, Chapel Hill. 1969.

DE LIRA, Camila Soledade et al. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**, v. 71, p. 95-100, 2015.

DIXIT, Akanksha et al. Antimicrobial and antifungal activity of indian lichen (*usnea* sps. And *parmotrema* sps.) Against human pathogenic bacterial and fungal SPS. 2017.

EMSEN, Bugrahan; YILDIRIM, Erol; ASLAN, Ali. Insecticidal Activities of Extracts of Three Lichen Species. 2015.

ESTRELA, J.L.V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.41, n.2, p.217-222, fev. 2006.

HUANG, Y.; LAM, S.L.; HO, S.H. Bioactivities of essential oil from *Ellateria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.36, n.2, p.107-117, 2000.

Huneck S, Yoshimura Identification of lichen substances, first ed. Springer, Verlag, Berlin, (1996).

Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminski, J. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.38, p.1406-1411, 1990.

Jaenson, T.G., Palsson, K., Borg-Karlson, A.K. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. **Journal of Medicine Entomology**. n.43, p.113–119, 2006.

JOHNSON, Christopher J. et al. Degradation of the disease-associated prion protein by a serine protease from lichens. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19836, 2011.

KIM, S. W., Lee, H. R., Jang, M. J., Jung, C. S., & Park, I. K.. Fumigant toxicity of Lamiaceae plant essential oils and blends of their constituents against adult rice weevil *Sitophilus oryzae*. **Molecules**, 21(3), 361, 2016.

LI, Shi-Guang et al. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. **Journal of pest science**, v. 86, n. 4, p. 677-683, 2013.

Liu, Z.L., Goh, S.H., Ho, S.H. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **J. Stored Prod. Res.** 43, 290-296, 2007.

Liu, Z.L., Ho, S.H. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v.35, n.4, p.317-328, 1999.

MAAZOUN, A. M., Hamdi, S. H., Belhadj, F., Jemâa, J. M. B., Messaoud, C., & Marzouki, M. N. Phytochemical profile and insecticidal activity of Agave americana leaf extract towards *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Science and Pollution Research**, p.1-13, 2019.

MARTINS, Mônica CB et al. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e111102, 2014.

MAURYA, Indresh K. et al. Antimicrobial activity of *Bulbothrix setschwanensis* (Zahlbr.) Hale lichen by cell wall disruption of *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans*. **Microbial pathogenesis**, v. 115, p. 12-18, 2018.

Napoleão, T.H., Belmonte, B.R., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., Sa, R.A., Paiva, L.M., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, n.54, p.26-33, 2013.

Nerio, L. S.; Oliveiro-Verbel, J.; Stashenko, E. E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.372-378, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>.

PAULIQUEVIS, Carolina F.; FAVERO, Silvio. Atividade insetistática de óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* sobre *Sitophilus zeamais*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 19, n. 12, p. 1192-1196, 2015.

Pimentel, M.A.G., L.R.D'A. Faroni L.R.D'A., Guedes R.N.C., Sousa A.H., Tola, M.R., Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.1, p.71-74, 2009.

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of stored products Research**, v. 44, n. 2, p. 126-135, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2007.08.003>.

RAJKUMAR, V., Gunasekaran, C., Christy, I. K., Dharmaraj, J., Chinnaraj, P., & Paul, C. A. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. **Pesticide biochemistry and physiology**, n.156, p.138-144, 2019.

Rees, D.P. Coleoptera. In: Subramanyam, Bh., Hagstrum, D.W. (Eds.), *Integrated Management of Insects in Stored Products*. Marcel Dekker, New York, p. 1-40, 1996.

SILVA, H. A. M. F. et al. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. **Acta tropica**, v. 178, p. 97-102, 2018.

SINGH, Garima et al. Fungal–algal association patterns in lichen symbiosis linked to macroclimate. **New Phytologist**, v. 214, n. 1, p. 317-329, 2017.

Tunón, H., Thorsell, W., Mikiver, A., Malander, I. Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*. **Fitoterapia** v.77, p.257– 261, 2006.

Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. **The Canadian Entomologist**, v.128, p.865-875, 1996.

## Apêndice B

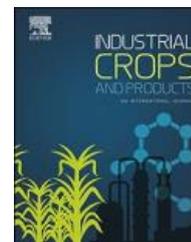
### Artigo 2

Trabalho a ser submetido para – **Industrial Crops**

Fator de Impacto – **3,849**

Qualis – **B1 (Biotecnologia)**

ISSN: **0926-6690**



### **Atividade larvicida de metabólitos secundários liquênicos contra *Aedes aegypti***

André Severino da Silva<sup>1,4</sup>, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar<sup>3</sup>, Jéssica da Silva Nascimento<sup>3</sup>, Érima Maria de Amorim<sup>1</sup>, Maria Aparecida Lira da Conceição<sup>2</sup>, Nicácio Henrique da Silva<sup>4</sup>, Eugênia Cristina Pereira<sup>4</sup>, Mônica Cristina Barroso Martins<sup>4</sup>, Maria de Lourdes Lacerda Buri<sup>4</sup>, Emerson Peter Silva Falcão<sup>2,4\*</sup>, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Autor para correspondência: E-mail: emerson\_falco@yahoo.com.br

## Resumo

Os líquens têm sido bastante estudados por suas propriedades biológicas, como bactericida, praguicida e bioindicadores ambientais. Os líquens produzem metabólitos secundários que são utilizados para a defesa contra predadores. Uma das propriedades desses metabólitos é a ação contra insetos. O mosquito *Aedes aegypti* tem sido conhecido como um vetor de importantes doenças humanas (dengue, zika, chikungunya e febre amarela). O combate a esse vetor tem sido executado por meio de inseticidas sintéticos que muitas vezes causam danos ao meio ambiente. Com base nisso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação larvicida dos extratos etéreo do líquen *Ramalina complanata* e acetônico de *Cladonia verticillaris*, bem como seus metabólitos secundários isolados, ácido divaricático e fumarprotocetrárico, respectivamente. Larvas em terceiro estágio larvário de *A. aegypti* foram expostas aos compostos e avaliadas a mortalidade após 24 e 48h. Os extratos, etéreo de *R. complanata* e acetônico de *C. verticillaris*, bem como os ácidos divaricático e fumarprotocetrárico apresentaram LC<sub>50</sub> de 5,95; 17,40; 29 e 13,63 ppm, respectivamente. Mostrando que os compostos liquênicos podem ajudar no combate a insetos vetores por interromperem o ciclo de vida desses.

**Palavras-chave:** Líquens; ácido divaricático; ácido fumarprotocetrárico; *A. aegypti*

## Abstract

Lichens have been extensively studied for their biological properties, such as bactericide, pesticide and environmental bioindicators. Lichens produce secondary metabolites that are used to defend against predators. One of the properties of these metabolites is the action against insects. The *Aedes aegypti* mosquito has been known as an insect vector of human pathologies (dengue, zika, chikungunya and yellow fever). The fight against this vector has been through chemical insecticides that often cause damage to the environment. Based on this, this work aimed to evaluate the larvicidal action of the ethereal extracts of lichen *Ramalina complanata* and acetonic of *Cladonia verticillaris*, as well as its isolated compounds, divaricatic acid and fumarprotocetrárico, respectively. Larvae in the third larval stage of *A. aegypti* were exposed to the compounds and mortality after 24 and 48 hours was evaluated. The ether extracts of *R. complanata* and acetonic of *C. verticillaris*, as well as the divaricatic and fumarprotocetrárico acids presented LC<sub>50</sub> of 5.95; 17.40; 29 and 13.63 ppm, respectively. Showing that lichenic compounds can help in fighting vector insects by interrupting their life cycle.

**Key words:** Lichens; divaricatic acid; fumarprotocetraric acid; *A. aegypti*

## INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é o mosquito vetor de doenças de relevante importância sanitária, são elas a Zika, Dengue, Chikungunya e Febre Amarela. Milhares de pessoas são afetadas por estas doenças no mundo em áreas tropicais e subtropicais (Musso et al., 2015 e WHO 2016). O número de casos de dengue em 2019 já é 149% maior que em 2018 (Ministério da Saúde, 2019). A dengue é endêmica em mais de 125 países, e estima-se que entre 2,5 e 3,6 bilhões de pessoas em todo o mundo estão em risco de contrair esta doença (Ferreira, 2012).

A forma comum de prevenir estas doenças é combater o mosquito transmissor com armadilhas de captura de ovos, larvicidas e inseticidas, ou seja, interrompendo seu ciclo de vida. Os larvicidas são eficientes por combaterem as larvas, forma aquática do ciclo biológico do mosquito, no entanto, já é constatado que larvicidas sintéticos desenvolvem mosquitos resistentes e uma alternativa para eles seriam os larvicidas naturais obtidos por meio dos metabolitos secundários de plantas, que são atualmente amplamente usados como fonte de produtos promissores no combate a mosquitos e outros insetos praga (Consoli e Oliveira, 1998; Maia et al., 2011; Diniz et al., 2014). Um exemplo disso é a atividade larvicida de lignanas isoladas de *Podophyllum hexandrum*, a podophyllotoxone exibiu significativa toxicidade frente ao *A. aegypti*, apresentando mortalidade de 73% das larvas em estágio L4 e 50% de mortalidade de pupas e ambos na concentração de 50 mg/ml (Maleck et al., 2016). Vale salientar os trabalhos com algas que também demonstraram esse tipo de atividade (Navarro et al., 2013). Bianco et al. (2013) verificaram não somente a atividade larvicida com algas, como também mostraram que a substância responsável pela mortalidade das larvas foi o elatol. Um exemplo em plantas é a atividade larvicida de *Piper corcovadensis*, na qual o óleo das folhas e o composto majoritário (1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene and terpinolene) mostraram possuir atividade larvicida frente ao *A. aegypti* (Silva et al., 2016).

Líquens também são ricos em metabólitos secundários com propriedades biológicas comprovadas, resultantes de suas rotas secundárias, como por exemplo, os ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e lecanórico. O ácido

fumarprotocetrário tem demonstrado atividade expectorante e antioxidante comprovada em camundongos e o ácido lecanórico além de se comportar como antioxidante, também demonstrou ação contra bactérias Gram-positivas quando testada sua avaliação antimicrobiana (GAIKWAD *et al.*, 2014; DE AZEVEDO NÓBREGA *et al.*, 2012; DE BARROS ALVES *et al.*, 2014). Extratos dos líquens *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina* e *Peltigera rufescens*, apresentaram atividade inseticida frente a adultos de *Sitophilus granarius* (Emsen, 2015). Os metabolitos secundários conferem aos líquens uma proteção contra determinados tipos de insetos (PÖYKKO *et al.*, 2010). O que pode ser uma alternativa na busca de bioinseticidas contra pragas como larvicida para o combate ao *A. aegypti*.

São poucos os trabalhos de líquens como inseticida frente a insetos de importância sanitária, assim realizamos um estudo de vários extratos de líquens e seus compostos majoritários testando-os separadamente frente ao mosquito *A. aegypti*.

## **METODOLOGIA**

### **Material líquênico**

O líquen *Ramalina complanata* foi coletado na região Nordeste do Brasil, no município de Saloá (estado de Pernambuco, Brasil), Latitude S 09° 01.399', Longitude W 36°47.565', a uma altitude de 1052 metros, no período do inverno do Hemisfério Sul (Junho 2008). O talo foi identificado de acordo com características morfológicas e uma amostra (voucher nº 54299) foi depositada no Herbário Geraldo Mariz, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

Os líquens *Cladonia verticillaris* e *Parmotrema flavescens* foram coletados na região Nordeste do Brasil, no município de Taquaritinga do Norte (estado de Pernambuco, Brasil), Latitude S 09° 01.399', Longitude W 36°47.565', a uma altitude de 785 metros, no período do inverno do Hemisfério Sul (Junho 2017). Os talos foram identificados de acordo com características morfológicas e uma amostra de cada (voucher nº 54301 e 54302, respectivamente) foram

depositadas no Herbário Geraldo Mariz, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

### **Preparação dos extratos e isolamento dos compostos**

O isolamento de todos os compostos se deu de acordo com a metodologia descrita por Asahina e Shibata (1954). Para obtenção dos extratos foi utilizado o aparelho de Soxhlet, 100mL de solvente (sendo éter para *R. complanata*, acetona para *C. verticillaris* e *P. flavescens*) refluxado em banho maria a 40°C. A partir dos extratos de *R. complanata*, *C. verticillaris* e *P. flavescens* foram isolados os compostos ácidos: divaricático, Fumarprotocetrárico e salazínico, respectivamente.

### **Identificação dos compostos presentes nos extratos e confirmação de estrutura molecular**

A identificação e isolamento dos compostos se deu por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC) e Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-H<sup>1</sup>).

### **Manutenção da colônia de *Aedes aegypti***

As larvas foram oriundas da colônia do *Aedes aegypti* Linneaus (cepa Rockefeller) do insetário do Laboratório de Ecologia Química da UFPE. O insetário foi mantido à temperatura de 27°C ±1°C, umidade relativa média de 50% e fotoperiodismo de 14D :10N. A cepa Rockefeller foi cultivada e utilizada em diversos laboratórios de entomologia, pois é referência em suscetibilidade, o que permite o seu emprego em bioensaios para comparação de resistência com populações locais (FIOCRUZ, 2007).

### **Criação de *A. aegypti* em laboratório**

Para eclosão dos ovos de *Aedes aegypti* foi necessário colocar um ou mais papelotes contendo os ovos coletados em um copo com a água anteriormente

usada nas bacias com as larvas em desenvolvimento. A eclosão ocorre , normalmente, dentro de 24 horas.

As larvas recém eclodidas são distribuídas e condicionadas em bacias plásticas redondas de 20cm de diâmetro, contendo cerca de 450 mL de água destilada. Nos estágios larvais a alimentação é realizada com ração para cachorro Purina® pulverizada.

A água das bacias de cultivo das larvas foi trocada a cada dois dias até as larvas atingirem o estágio de pupa. Quando as larvas atingiram o estágio pupal, as bacias são colocadas dentro de gaiolas quadradas de 35cm de lado, onde segue a emergência dos mosquitos adultos dentro de gaiolas.

Os adultos foram alimentados diariamente com uma solução de sacarose a 10%.

### ***Bioensaio Larvicida***

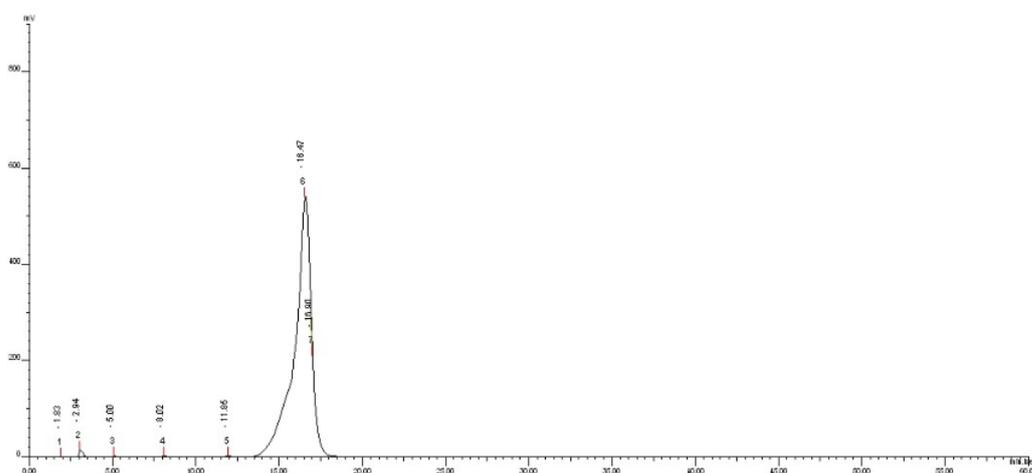
Larvas de *A. aegypti* no quarto estágio inicial (L4), foram expostas aos compostos isolados (ácidos divaricático e FUM) e extratos dos líquens, sendo, 20 larvas do mosquito *A. aegypti* no quarto estágio inicial (L4, cabeça branca) por concentração foram colocadas em béqueres contendo 20mL de solução. O número de larvas mortas bem como alterações morfológicas e comportamentais foi registrado após 24 horas de início do experimento e novamente após um período de 48 horas. Foram preparadas também soluções controle, que continham o co-solvente utilizado no preparo da solução teste, na mesma concentração.

De acordo com o resultado obtido foi construída uma curva concentração/mortalidade para o cálculo da CL<sub>50</sub>. A CL<sub>50</sub>. A curva de sobrevivência foi calculada utilizando-se da análise de sobrevivência Probit com o programa estatístico Statplus 2008.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

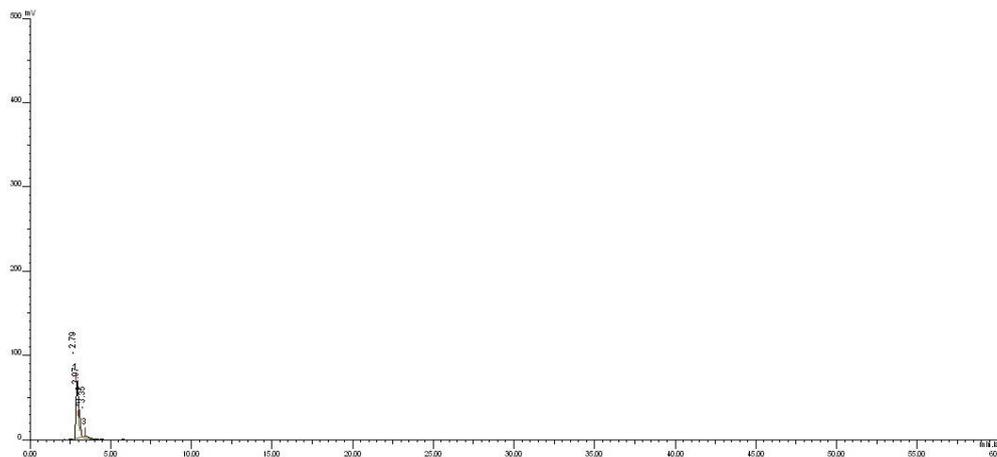
### Análises físico-química dos metabolitos liquênicos

O isolamento dos compostos foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD). Para o FUM o  $R_f = 0,18$ , demonstrando assim estar de acordo com os dados apresentados na literatura (Martins et al., 2018). E o ácido divaricático  $R_r = 0,56$ . A pureza dos compostos foi avaliada utilizando análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o ácido divaricático apresentou 99% de pureza (FiguraFigura 1) a um tempo de retenção de 16,47min.



**Figura 1. Cromatograma em HPLC.** Ácido divaricático purificado de *R. complanata* (RT – 16.47).

O FUM com um tempo de retenção de 2,79min e 93,79% de pureza (FFigura 2).



**Figura 2. Cromatograma líquido de alta eficiência.** Ácido Fumarprotocetrário (FUM), Rt 2,79 e 93,79% de pureza.

A análise molecular foi realizada com a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMNH<sup>1</sup>), conforme Huneck e Yoshimura (1996). Para o ácido divaricático: (400MHz, CdCl<sub>3</sub>) $\delta$  0,98 (6H, T, 5,4Hz, Me, C18, 27); 1,68 (4H, *m*, CH<sub>2</sub> – C-16 e 26); 2,97 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>, C-17, 25); 2,93 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>, C-20); 6,38 (2H, *d*, 2,4Hz, C4, 11); 6,64 (1H, *d*, 2,4Hz, C15); 6,76 (1H, *d*, 2,4Hz, C-6); 10,65 (2H, *s*, OH, C7, 22).

O FUM apresentou o seguintes dados de RMNH<sup>1</sup>: <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ <sub>H</sub> (H; *mult.*; int.): 2,38 (3H; *s*; CH<sub>3</sub>-9), 2,41 (3H; *s*; CH<sub>3</sub>-9'). 5,26 (2H; *s*; CH<sub>2</sub>-8'), 6,60 (2H; *s*; CH-2'; CH-3'), 6,80 (1H; *s*; CH-5), 10,53 (1H; *s*; CH-8), 11,93 (1H; *s*; C-4-OH ou C-2'-OH).

### Atividade larvicida dos compostos testados

Os resultados de LC<sub>50</sub> das larvas de *A. aegypti* expostas aos compostos liquênicos estão apresentados na tabela 1. O extrato etéreo de *R. complanata* apresentou uma letalidade de 50% dos indivíduos expostos em 5,95ppm, quando comparado esse resultado ao composto isolado, ácido divaricático, o qual a LC<sub>50</sub> foi em 29ppm. Pode-se observar que o extrato demonstrou uma ação

larvicida superior ao composto isolado. Esse fato pode ser decorrente do sinergismo entre os componentes químicos do extrato.

O extrato acetônico de *C. verticilaris* apresentou uma LC<sub>50</sub> em 17,40ppm. Já o seu composto isolado, ácido fumarprotocetrárico (FUM), ficou em 13,63 ppm a mortalidade de 50% de indivíduos expostos. Nesse caso, o composto isolado, FUM demonstrou uma atividade larvicida superior a do extrato. O potencial inseticida do FUM já foi reportado na literatura por alguns autores como Martins et al. (2018), que demonstraram uma ação inseticida do FUM no desenvolvimento de *Nasutitermes corniger*. Além do FUM, a lectina isolada do líquen *C. verticillaris* também apresentou ação inseticida contra *Nasutitermes corniger* (Silva et al., 2009).

Outros compostos isolados de líquens se apresentaram como bioinseticidas. O ácido úsnico isolado do líquen *Ramalina usnea*, foi capaz de causar uma letalidade de 50% de larvas de *A. aegypti* expostas ao composto na concentração de 4,48 µg/mL (Moreira et al., 2016). Extratos do líquens *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina* e *Peltigera rufescens*, causaram a mortalidade em indivíduos adultos de *Sitophilus granarius* (Emsen et al., 2015).

A tabela 1 mostra dados de LC<sub>50</sub> dos compostos testados

Material liquênico	Atividade larvicida	
	LC <sub>50</sub>	Desvio padrão
Extrato etéreo de <i>Ramalina Complanata</i>	5,95 ppm	1,54
Ácido divaricático	29 ppm	1,62
Extrato acetônico de <i>Cladonia verticilaris</i>	17,40 ppm	0,99
Ácido Fumarprotocetrárico	13,63 ppm	10,5

## CONCLUSÕES

Os extratos dos líquens *R. complanata* e *C. verticilaris* juntamente com seus compostos isolados, ácido divaricático e FUM, respectivamente se mostraram como larvicidas contra o *A. aegypti*, uma vez que conseguiram interromper o ciclo de vida das larva expostas aos metabólitos.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a importância de se continuar a estudar metabolitos secundários de origem liquênica como uma fonte natural de bioinseticida e poder se evitar o uso de inseticidas químicos, os quais em sua maioria prejudicam o meio ambiente e conseqüentemente a saúde humana, devido contaminação de fontes aquáticas.

## AGRADECIMENTOS

Aos nossos colaboradores, ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE), à agência de fomento FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em especial o Departamento de Química Fundamental (DQF/UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio/UFPE).

## REFERÊNCIAS

Consoli, R.A.G.B., and R. Lourenc,o-de-Oliveira. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, 20th ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.

DA Silva, M.F.R., Bezerra-Silva, P.C., de Lira, C.S., de Lima Albuquerque, B.N., Agra Neto, A.C., Pontual, E.V., Maciel, J.R., Paiva, P.M.G., Navarro, D.M.d.A.F. 2016. Composition and Biological Activities of the Essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae), Experimental Parasitology, 165,64-70 doi: 10.1016/j.exppara.2016.03.017.

Diniz, M. M.C.S. L., Henriques, A. D. S., Leandro, R.S., Aguiar, D.L., Beserra, E.B. 2014. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. *Revista Saúde Pública*. v.48, n.5, p.775-782.

E.M. Bianco, L. Pires, G.K.N. Santos, K.A. Dutra, T.N.V. Reis, E.R.T.P.P. Vasconcelos, A.L.M. Cocentino, D.M.A.F. Navarro. 2013. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*), *Industrial Crops and Products*. n.43, p.270-275, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.032>.

EMSEN, Bugrahan; YILDIRIM, Erol; ASLAN, Ali. 2015. Insecticidal activities of extracts of three lichen species on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Plant Protection Science*, v.51, n.3, p.155-161.

Ferreira, G.L.C. 2012. Global dengue epidemiology trends. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.54, p.5–6.

Ministério da Saúde, 2019. Ministério da Saúde alerta para aumento de 149% dos casos de dengue no país. <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45257-ministerio-da-saude-alerta-para-aumento-de-149-dos-casos-de-dengue-no-pais>. Acesso 14/05/2019

Maia, M. F., and S. J. Moore. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar. J.* 10: S11.

Maleck, M., Holanda, P.O, Serdeiro, M.T., Soares, R.O.A., Honório, N.A., Silva, C.G. 2016. Toxicity and Larvicidal Activity of Podophyllum-Based Lignans Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Journal of Medical Entomology*, p. 1–8.

MARTINS, Monica CB et al. 2018. Effects of Usnic, Barbatic and Fumarprotocetraric acids on Survival of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology*, v. 65, n. 1, p. 79-87.

MOREIRA, Antônio SN et al. 2016. Larvicidal activity of *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 4, p. 530-532.

Musso, D., Cao-Lormeau, V. M., Gubler D. J. 2015. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet.com*, v.386, 2018.

Navarro, D.M.A.F., Silva, P.C.B., Silva, M.F.R., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G. 2013. Larvicidal Activity of Plant and Algae Extracts, Essential Oils and Isolated Chemical Constituents against *Aedes aegypti*. *The Natural Products Journal*, v.3, p.268-291.

PÖYKKÖ, H., BACKOR, M.; BENCÚROVÁ, E.; MOLCANOVÁ, V.; BACKOROVÁ, M.; HYVÄRINEN, M. 2010. Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. *Oecologia*, v.164, n.2, p.423-430.

SILVA, Michele DC et al. 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.3, p.334-340.

WHO 2016. Can a mosquito transmit more than one disease?  
<https://www.who.int/features/qa/co-infection-mosquitos/en/> Acesso  
14/05/2019.

## **ANEXOS**

## Anexo A

### TEXTO DA PATENTE

#### “LARVICIDA E PUPICIDA A BASE DE USNATO DE POTÁSSIO”

##### **Campo da Invenção**

[001] A presente invenção refere-se ao produto de microemulsão com o usnato de potássio obtido a partir da síntese de ácido úsnico e hidróxido de potássio, que para ser utilizado como larvicida/pupicida é preparado em tween 80. Desta maneira, a microemulsão mostrou capacidade de causar a mortalidade em todos os estágios larvários e na fase de pupa do mosquito *Aedes aegypti*. É a primeira vez que o usnato de potássio é descrito na literatura científica como sendo larvicida/pupicida para *Aedes aegypti*.

##### **Estado da Técnica/problemas**

[002] O mosquito *Aedes aegypti* tem se tornado um problema de saúde pública, atualmente já são conhecidas três patologias associadas a esse vetor, como Dengue, Zika vírus e febre Chikungunya. Estudos voltados para o combate a espécie de mosquito têm ganhado destaque. Um meio para eliminação de focos é a utilização de inseticidas sintéticos que tem causado resistência por parte do vetor e afetado o meio ambiente, o que ainda é um grande problema.

[003] Compostos naturais, extraídos de plantas são uma opção para o combate ao *Aedes aegypti*. Uma vez que tem demonstrado forte potencial larvicida e como forma de evitar os sintéticos utilizados atualmente. Vários artigos e patentes têm mostrado que uma série de metabólitos secundários de plantas apresentou potencial larvicida e pupicida frente a larvas e pupas de mosquitos, entre esses o *Aedes aegypti*, como visto na patente, BR 102016012240-6 A2, a qual refere-se a uma microemulsão contendo o óleo essencial de planta *Citrus sinensis*. No entanto, óleos essenciais são de difícil dissolução em água o que pode ocasionar perda da atuação larvicida/pupicida ao longo da sua utilização no meio ambiente.

[004] Compostos de origem liquênica têm apresentado atividades biológicas importantes, inclusive como praguicidas. O ácido úsnico é extraído de líquens, mas o usnato de potássio não é um composto de origem natural.

### **Sumário da Invenção/novidade/efeito técnico/vantagens**

[005] Na intenção de evitar a proliferação do mosquito *Aedes aegypti* e erradicar esse vetor, sem no entanto causar dano ao meio ambiente, desenvolveu-se o presente produto formulado a partir da microemulsão de usnato de potássio e tween 80, facilitando assim sua solubilidade em água e um composto com uma rápida ação contra o inseto testado em todas as suas fases de larva e no estágio de pupa. Trata-se de uma invenção biotecnológica, biodegradável e que não causa resíduos nem danos ao meio ambiente.

### **Descrição detalhada da Invenção**

[006] Para melhor compreensão da invenção, são usados exemplos específicos que detalham melhor as etapas de obtenção do produto. Esses exemplos tem a finalidade de ilustrar a produção do nosso produto, que é dividido em 3 etapas.

[007] Exemplo 1: Obtenção do metabolito secundário ácido úsnico. O composto foi isolado da espécie líquênica *Ramalina aspera* em extração a soxhlet e purificado.

[008] Exemplo 2: Obtenção do sal (usnato de potássio). Para obtenção deste sal de potássio, foi realizada uma reação com hidróxido de potássio (10%) onde, o ácido úsnico foi totalmente solubilizado em pH 11 e logo após essa solução foi submetida à liofilização. Desta maneira, se obteve o usnato de potássio.

[009] Exemplo 3: Formulação de microemulsão do usnato de potássio. Para obtenção da formulação, foi utilizado como tensoativo, o tween80. A técnica de reparação consiste na mistura física entre o sal e o tensoativo na proporção de 5% de tween80 em água com 1 mg do usnato de potássio, com agitação mecânica entre 3 e 5 minutos a solução está pronta para uso em teste larvicida/pupicida.

[010] Para a avaliação biológica foram realizados testes larvicidas e pupicida no Laboratório de Ecologia Química do DQF/UFPE, obedecendo a metodologia da OMS (Organização Mundial da Saúde). Foram utilizadas 20 larvas do mosquito *Aedes aegypti* nos estágios: L1, L2, L3 e L4 em cada réplica de concentração. As larvas foram submetidas a 20ml da formulação de usnato

de potássio (1 mg) em tween80 (5%) e água. Após 48h de exposição (nas concentrações abaixo de 1ppm) das larvas na formulação pode-se observar que a formulação teve um efeito letal nas larvas 100%, conforme tabela 1.

Tabela 1. Atividade larvicida do usnato de potássio, testado contra larvas de *A. aegypti* em todos os estágios larvários, após 48h de exposição.

Estágios larvários	Atividade larvicida	
	LC <sub>50</sub>	Desvio padrão
L <sub>1</sub>	0,001 ppm	0,0001
L <sub>2</sub>	0,19 ppm	0,01
L <sub>3</sub>	0,18 ppm	0,02
L <sub>4</sub>	0,36 ppm	0,01

[011] Pupas do mosquito *Aedes aegypti*, foram expostas à formulação de usnato de potássio obtida para verificar sua possível ação citotóxica a essa fase de desenvolvimento. E após 48h de exposição na concentração 30ppm observou-se que morreram 50% dos indivíduos para a formulação de usnato de potássio com tween em água nas proporções já explicitadas. A formulação de usnato de potássio com tween80 em água na concentração de 60 a 100 ppm mataram 100% das pupas e a LC50 ficou em 35ppm, de acordo com tabela 2.

Tabela 2. Atividade pupicida usnato de potássio, testado contra larvas de *A. aegypti* em todos os estágios larvários, após 48h de exposição.

Pupicida	Atividade pupicida	
	LC <sub>50</sub>	35 ppm

[012] A Figura 1 mostra a interrupção do desenvolvimento larval que, se deu pela mortalidade dos indivíduos expostos a microemulsão do composto testado. Diante dos resultados obtidos, pode-se perceber o potencial larvicida e pupicida da formulação. O que a torna uma futura opção no combate ao vetor *Aedes aegypti*.

[013] A ação do composto poderá ser melhor compreendida através da

Figura 1, que representa larvas mortas após exposição de 48h no composto:

**FIGURA 1**



### **REIVINDICAÇÕES**

1. . “LARVICIDA E PUPICIDA” **caracterizado por** ser uma microemulsão de usnato de potássio obtido pela síntese de ácido úsnico com hidróxido de potássio.

2. “LARVICIDA E PUPICIDA” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** combinar a formulação do usnato de potássio ao tween80 em concentrações na faixa de 0,001 mg/L até 0,1 mg/L.

3. “LARVICIDA E PUPICIDA” de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** a concentração preferencial de 0,012 mg/L.

## RESUMO

### “LARVICIDA E PUPICIDA A BASE DE UNSATO DE POTÁSSIO”

Trata-se de uma formulação de microemulsão do usnato de potássio obtido através de um processo químico com ácido úsnico com utilização como inseticida para combate ao *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram que o sal apresentou uma  $LC_{50}$  para indivíduos em estágio larval L1, L2, L3 e L4. Para todos esses o composto foi tóxico em menos de 1ppm. E ainda foi testada a ação do sal em pupas, o que mostrou uma  $LC_{50}$  em aproximadamente 30ppm. Diante dos dados apresentados o usnato de potássio se mostrou como um ótimo bioinseticida. E com isso encontramos em produtos naturais ação de grande importância para o controle do mosquito vetor dos vírus causadores das patologias: dengue, chikungunya e zika.

## ANEXO B – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DA PATENTE

18/03/2019 870190025437  
11:13

29409161811243702

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

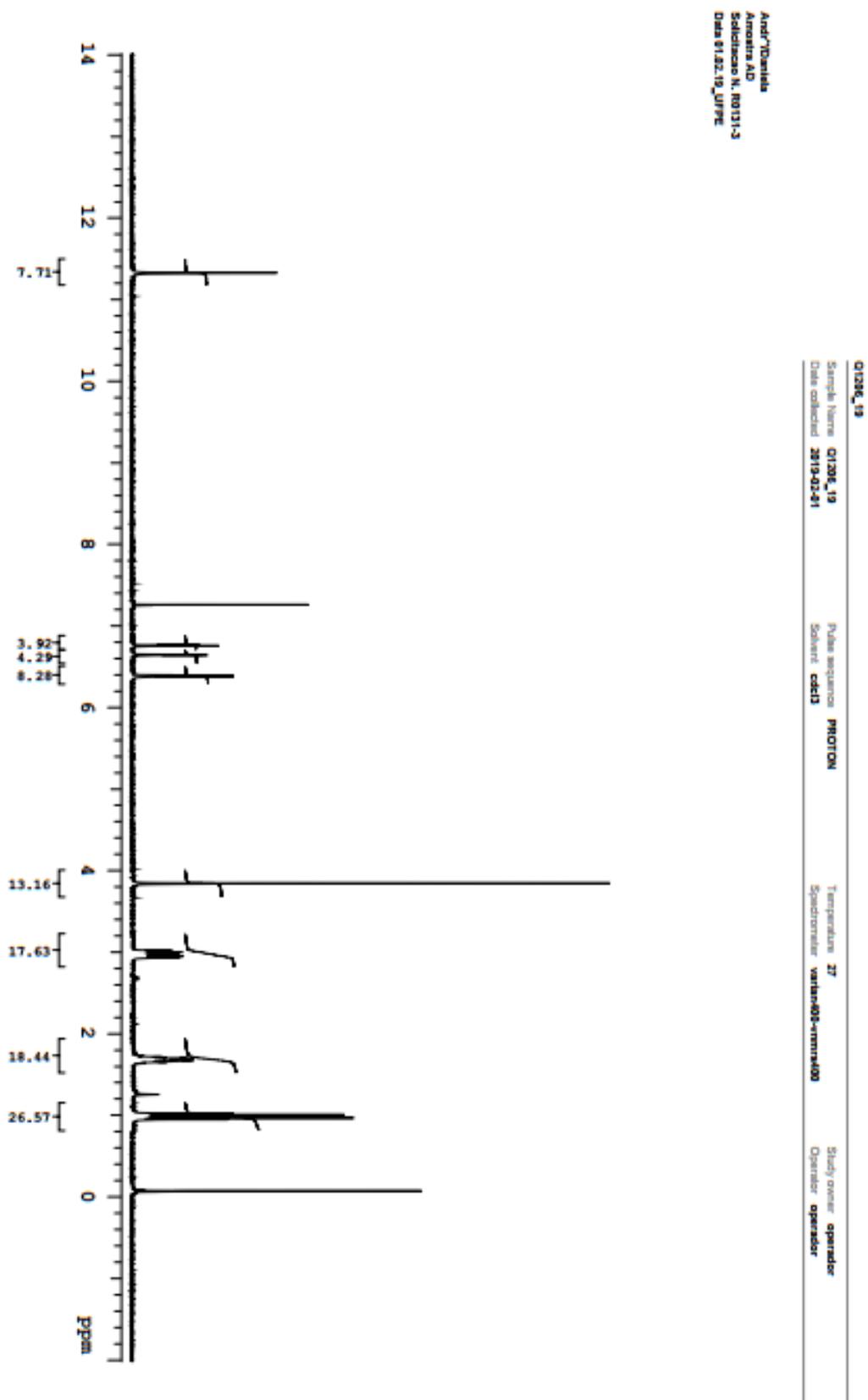
Número do Processo: BR 10 2019 005218 0

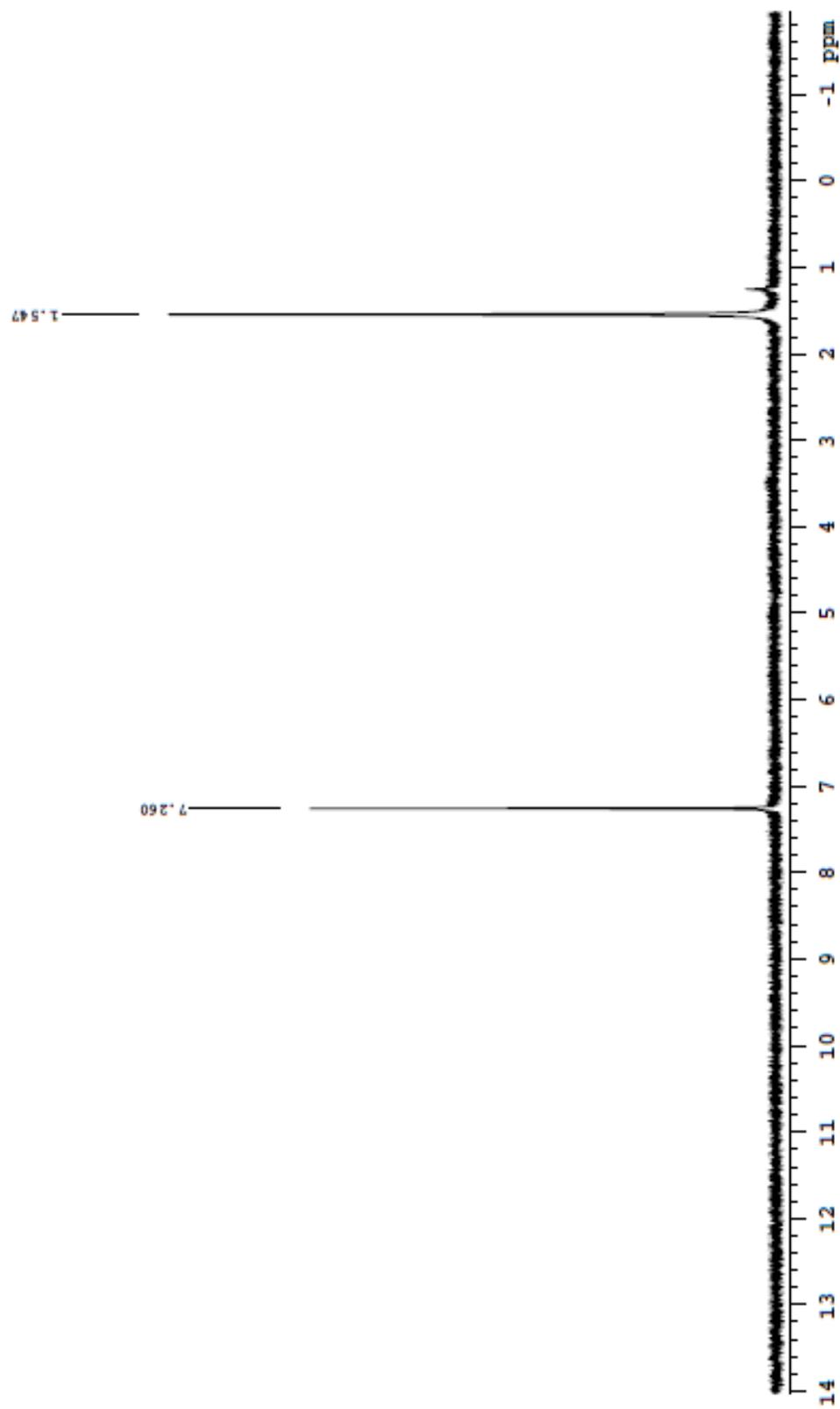
**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 24134488000108**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50670-901**País:** Brasil**Telefone:** (81)2126 8959**Fax:** (81)2126 8959

ANEXO C – ESPECTRO DE RMN-H<sup>+</sup> DO ÁCIDO DIVARICÁTICO

ANEXO D – ESPECTRO DE RMN- $H^+$  DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRIO

ANEXO E – ESPECTRO DE RMN-H<sup>+</sup> DO USNATO DE POTÁSSIO