



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**



**LEIDIANE BARBOZA DA SILVA**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DE SEMENTES DE ANGICO**  
**(*Anadenanthera colubrina*) CONTRA *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*, EM**  
**CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E DE CAMPO**

**NATAL/2022**

**LEIDIANE BARBOZA DA SILVA**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DE SEMENTES DE ANGICO  
(*Anadenanthera colubrina*) CONTRA *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*, EM  
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E DE CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Adriana Ferreira Uchôa.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - Centro de Biociências - CB

Silva, Leidiane Barboza da.

Eficácia e segurança do extrato de sementes de Angico (Anadenanthera colubrina) contra Aedes aegypti e Aedes albopictus, em condições de laboratório e de campo / Leidiane Barboza da Silva. - 2022.

124 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. Natal, RN, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchôa.

1. Arboviroses - Dissertação. 2. Controle de insetos vetores - Dissertação. 3. Extrato de Angico - Dissertação. I. Uchôa, Adriana Ferreira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 578.833.1

**LEIDIANE BARBOZA DA SILVA**

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DE SEMENTES DE ANGICO  
(*Anadenanthera colubrina*) CONTRA *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*, EM  
CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E DE CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 22/12/2022

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Patrícia Batista Barra  
Examinadora Externa à Instituição – UERN

Prof. Dr. José Roberto da Silva  
Examinador Externo à Instituição – UFRJ

Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto  
Examinador Interno ao Programa – UFRN

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Ferreira Uchoa  
Orientadora/Presidente – UFRN



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO  
E CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 22/12/2022

FICHA DE AVALIAÇÃO Nº 15/2022 - BIOQ (17.32)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

**(Assinado digitalmente em  
29/12/2022 11:02)**

ADRIANA FERREIRA UCHOA  
PROFESSOR DO  
MAGISTERIO SUPERIOR DBG/CB  
(17.09)  
Matrícula: ###497#5

**(Assinado digitalmente em  
30/12/2022 09:28)**

VALTER FERREIRA DE  
ANDRADE NETO  
PROFESSOR DO  
MAGISTERIO SUPERIOR DMP/CB  
(17.13)  
Matrícula: ###131#6

**(Assinado digitalmente em  
31/12/2022 06:58)**

JOSE ROBERTO DA SILVA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.677-##

**(Assinado digitalmente em  
09/01/2023 08:44)**

PATRICIA BATISTA BARRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.504-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: **15**, ano:

**2022**, tipo:

**FICHA DE AVALIAÇÃO**, data de emissão: **29/12/2022** e o código de verificação: **81f4c3e4c7**

## **AGRADECIMENTOS**

Os meus mais profundos agradecimentos a todos os que me apoiaram nessa jornada que saiu totalmente fora do meu planejamento, mas que me ensinou a ser mais resiliente e me adaptar as diferentes situações da vida. Assim, agradeço aos meus familiares e nisso incluem os meus amigos que são a família que eu escolhi, aos professores colaboradores e tantos outros, que certamente sem eles este trabalho não chegaria até aqui, então a todos vocês, a minha gratidão.

E, eu não poderia começar meus agradecimentos de forma diferente, então agradeço primeiramente a minha família, em especial meu irmão, Leijaniilson Barboza que me acolheu nesse percurso.

Ao meu amor e amigo, Eric Santos que me ajudou e contribuiu em momentos fundamentais, principalmente na reta final. As minhas amigas irmãs Maria Auxiliadora e Maria Íris que sempre me escutam e me motivam em todos os momentos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que me ajudaram durante a saga dos experimentos, o Pedro Victor, a Melissa Farias e o Giulian Cesar, é sempre divertido trabalhar com vocês.

Aos amigos que fiz no LABENT ao longo desses anos de pesquisas, e em especial o Cássio Silva, que me acolheu desde o primeiro momento que coloquei o pé no laboratório, que contribuiu com experimentos, com imagens maravilhosas, conselhos e com um lanchinho (serei sempre grata). Agradeço aos demais desse laboratório acolhedor que me fizeram me sentir parte do lugar, Virginia, Ayrton e Kadu e Profa. Dra. Fátima Ximenes, obrigada por todas as colaborações.

Ao Prof. Drs. Elizeu Antunes dos Santos e o Hugo Alexandre de Oliveira por ceder gentilmente um espaço a mim nos Laboratórios de Química e Função de Proteínas Biotivas (LQFPB/ Depto. de Bioquímica/UFRN) e o Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL/ Depto. de Bioquímica/UFRN).

Ao Prof. Dr. Guilherme Fulgêncio de Medeiros e ao Thiago, do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática (DOL/NUPPRAR/UFRN) por me receberem tão bem

e por dividirem comigo seus conhecimentos preciosos acerca da *Cerodaphnia dubia*.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Adriana Ferreira Uchôa, pela oportunidade e confiança dada a mim, há seis anos, e desde então pude conhecer a paixão com a qual conduz os projetos de pesquisa e a Coordenação do laboratório; por dividir comigo e com os demais membros do Laboratório de Proteômica suas experiências de vida e profissional que foram determinantes ao longo da construção desta dissertação de mestrado; sou muito grata por toda a disponibilidade e ensinamentos valiosos.

## RESUMO

*Aedes aegypti* (L., 1762) e *Aedes albopictus* (S., 1894) são vetores dos agentes etiológicos de inúmeras arbovirose de importância médica. As limitações no uso de inseticidas químicos têm estimulado a busca por opções efetivas e ecologicamente amigáveis, como os inseticidas botânicos. O presente estudo descreve o potencial aedecida do extrato de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) em diferentes fases do ciclo de vida dos vetores, sua ação atraente/repelente na oviposição, caracterização bioquímica parcial e avaliação da cito- e ecotóxica. O extrato aquoso a quente das sementes de *A. colubrina* (EAQA) foi obtido por extração em água destilada (1:10, m/v) por 7 h a 80 °C. O efeito larvicida de EAQA foi avaliado em diluições seriadas e as concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (mg/mL) determinadas após 24 h e 48 h de exposição. A atividade larvicida foi observada para *A. aegypti* e *A. albopictus*, registrando CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em 24 h (0,16 e 0,94 mg/mL; 0,36 e 1,28 mg/mL) e 48 h (0,02 e 0,26 mg/mL; 0,06 e 0,62 mg/mL), respectivamente. EAQA foi pupicida para ambos os insetos em concentrações superiores às concentrações larvicidas (CL<sub>50</sub> ≥ 0,85 mg/mL para 24 h e CL<sub>50</sub> ≥ 0,53 mg/mL para 48 h). 0,26 mg/mL foi escolhida como a concentração diagnóstica na atividade ovicida e oviposição, apresentando atividade ovicida para ambos os insetos, comprometendo a eclosão larval em 76% e reduzindo a emergência de adultos das larvas sobreviventes em 25%. Em condições de campo, EAQA exerce efeito atraente para oviposição. EAQA apresentou uma maior concentração de carboidratos totais (15,5 mg/mL), em comparação aos teores de proteínas solúveis totais (2,0 mg/mL) e compostos fenólicos totais (0,1 mg/mL). Inibidores de bromelaína, papaína, tripsina e quimiotripsina, foram observados em EAQA com atividade de inibição enzimática em 90,94%, 68,93%, 68,75% e 9,32%, respectivamente. Não foi detectada citotoxicidade para linhagens celulares testadas (3T3) e (HepG2), nem ecotoxicidade para os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Mysidopsis juniae*. EAQA tem um potencial para ser adjuvante nas estratégias de manejo integrado de *Aedes* devido a versatilidade de atuação contra diferentes fases do ciclo de vida dos vetores, bem como sua cito- e ecocompatibilidade.

**Palavras-chave:** *Aedes*; Angico; Arbovirose; Controle de insetos vetores; Extratos botânicos.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (S., 1894) are etiological agent vectors of numerous arboviruses of medical importance. Limitations in chemical insecticides prompted the search for effective and ecologically friendly options, such as botanical insecticides. The present study describes the aedicial potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) seed extract at different stages of the vectors' life cycle, its attractive/repellent action on oviposition, partial biochemical characterization and evaluation of cyto- and ecotoxicity. The hot aqueous extract of *A. colubrina* seeds (EAQA) was obtained in distilled water extraction (1:10, m/v) for 7 h at 80 °C. The larvicidal effect of EAQA was evaluated in serial dilutions, determining the lethal LC50 and LC90 concentrations (mg/mL) after 24 h and 48 h of exposure. The larvicidal activity for *A. aegypti* and *A. albopictus* recorded CL50 and CL90 at 24 h (0.16 and 0.94 mg/mL; 0.36 and 1.28 mg/mL) and 48 h (0.02 and 0.26 mg/mL; 0.06 and 0.62 mg/mL), respectively. EAQA was pupicidal for both insects at concentrations higher than larvicidal concentrations (24 h LC50  $\geq$  0.85 mg/mL and 48 h LC50  $\geq$  0.53 mg/mL). 0.26 mg/mL was chosen as the diagnostic concentration for ovicidal activity and oviposition, showing ovicidal activity for both insects, compromising larval hatching by 76% and reducing adult emergence of surviving larvae by 25%. Under field conditions, EAQA exerts an attractive effect on oviposition. EAQA showed a higher concentration of total carbohydrates (15.5 mg/mL) compared to total soluble protein (2.0 mg/mL) and total phenolic compounds (0.1 mg/mL). Bromelain inhibitors, papain, trypsin, and chymotrypsin, were observed in EAQA with enzyme inhibition activity in 90.94%, 68.93%, 68.75%, and 9.32%, respectively. Cytotoxicity was not detected for the cell lines tested (3T3) and (HepG2), nor ecotoxicity for the microcrustaceans *Ceriodaphnia dubia* and *Mysidopsis juniae*. EAQA has the potential to be an adjuvant in *Aedes* integrated management strategies due to the versatility of action against different stages of the vectors' life cycle, as well as their cyto- and eco-compatibility.

**Keywords:** *Aedes*; Angico; Arboviruses; Control of insect vectors; Botanical extracts.

## SUMÁRIO

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                        | 16 |
| 1.1 DIPTEROS                                                                               | 16 |
| 1.2 <i>Aedes aegypti</i> (L. 1762) E <i>Aedes albopictus</i> (S. 1894)                     | 17 |
| 1.3 PRINCIPAIS VIROSES TRANSMITIDAS POR <i>A. aegypti</i> E <i>A. albopictus</i> NO BRASIL | 22 |
| 1.4 ESTRATÉGIAS DE MANEJO DAS ARBOVIROSES                                                  | 27 |
| 1.5 INSETICIDAS BOTÂNICOS                                                                  | 29 |
| 1.6 <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan                                          | 31 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL                                                                         | 33 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                  | 33 |
| <b>3 MATERIAL E METÓDOS</b>                                                                | 34 |
| 3.1 SEMENTES                                                                               | 34 |
| 3.2 COLÔNIA DE INSETOS                                                                     | 34 |
| 3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO                                                                    | 35 |
| 3.5 BIOENSAIOS INSETICIDAS                                                                 | 36 |
| <b>3.5.1 Ensaios larvicidas</b>                                                            | 36 |
| <b>3.5.2 Ensaios pupicidas</b>                                                             | 37 |
| <b>3.5.3 Ensaios adulticidas</b>                                                           | 38 |
| <b>3.5.4 Ensaios avicida</b>                                                               | 39 |
| <b>3.5.5 Ensaio de atratibilidade/repelência de postura de ovos</b>                        | 40 |
| <b>3.5.6 Ensaio de campo em pequena escala</b>                                             | 40 |
| 3.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA INICIAL DO EXTRATO                                           | 41 |
| <b>3.6.1 Determinação do peso seco e rendimento</b>                                        | 41 |
| <b>3.6.2 Dosagem de proteínas solúveis, carboidratos e compostos fenólicos</b>             | 41 |
| <b>3.6.3 Detecção de proteínas bioativas</b>                                               | 42 |

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>3.6.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)</b>                                                   | 43  |
| <b>3.7 CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO</b>                                                              | 43  |
| <b>3.7.1 Citotoxicidade</b>                                                                                     | 43  |
| <b>3.7.2 Ecotoxicidade</b>                                                                                      | 44  |
| <b>3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>                                                                                | 45  |
| <b>4 RESULTADOS</b>                                                                                             | 46  |
| <b>4.1 ATIVIDADE INSETICIDA</b>                                                                                 | 46  |
| <b>4.4.1 Atividade larvica</b>                                                                                  | 46  |
| <b>4.4.2 Atividade pupica</b>                                                                                   | 48  |
| <b>4.4.3 Atividade adultica</b>                                                                                 | 50  |
| <b>4.4.4 Atividade ovica</b>                                                                                    | 51  |
| <b>4.4.5 Atratividade/repelência para a postura das fêmeas de <i>A. aegypti</i> em condições de laboratório</b> | 51  |
| <b>4.4.6 Ensaios de campo de interferência de postura das fêmeas de <i>Aedes</i></b>                            | 52  |
| <b>4.5 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO</b>                                                                            | 55  |
| <b>4.5.1 Caracterização bioquímica inicial</b>                                                                  | 55  |
| <b>4.5.2 Avaliação da citotoxicidade</b>                                                                        | 58  |
| <b>4.5.3 Avaliação da ecotoxicidade</b>                                                                         | 60  |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>                                                                                              | 61  |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>                                                                                              | 71  |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                              | 72  |
| <b>ANEXOS</b>                                                                                                   | 119 |
| Apêndice 1 – Artigo Publicado como Coautora                                                                     | 121 |
| Apêndice 2 - Artigo Derivado da Dissertação Submetido para Publicação                                           | 124 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .....                                                                                        | 19 |
| Figura 2- Diferenças morfológicas entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .....                                                                                                        | 22 |
| Figura 3- Detalhe de folhas, flores e fruto - <i>Anadenanthera colubrina</i> , Frutos (A) e Flores (B).....                                                                                         | 32 |
| Figura 4 - Sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> utilizadas na pesquisa.....                                                                                                                   | 34 |
| Figura 5 - Colônias de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> mantidas no Laboratório de Entomologia.....                                                                                         | 35 |
| Figura 6 - Ensaio larvicida realizado em placa de cultura de 6 poços com larvas em L4.....                                                                                                          | 37 |
| Figura 7 - Ensaio pupicida. Recipientes de vidro contendo pupas de <i>Aedes</i> e soluções-teste.....                                                                                               | 38 |
| Figura 8 - Gaiola utilizada nos ensaios adulticidas e de atratibilidade/repelência. (A) Vista frontal e (B) lateral. ....                                                                           | 39 |
| Figura 9 - Alterações nos aspectos morfológicos das larvas tratadas com EAQA. ...                                                                                                                   | 48 |
| Figura 10 - Alterações nos aspectos morfológicos das pupas tratadas com EAQA .                                                                                                                      | 50 |
| Figura 11 - Análise de taxa de eclosão e atividade ovicida do extrato aquoso a quente de <i>A. colubrina</i> .....                                                                                  | 51 |
| Figura 12 - Índice de repelência efetiva (IRE) do extrato a quente de <i>A. colubrina</i> com efeito duplo (atrativo e repelente) para as fêmeas grávidas de <i>A. aegypti</i> em laboratório. .... | 52 |
| Figura 13 – Análise da influência do extrato EAQA (extrato aquoso a quente de angico) no perfil de oviposição de <i>Aedes</i> , em quatro pontos de infestação de <i>Aedes</i> . ....               | 54 |
| Figura 14 – Resultado das 3 últimas semanas do teste de atratibilidade/repelência do EAQA em campo.....                                                                                             | 55 |
| Figura 15 – Perfil eletroforético das proteínas detectadas em EAQA (extrato aquoso a quente de Angico), obtido por SDS-PAGE (12%). ....                                                             | 57 |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16 – Avaliação da citotoxicidade de EAQA (extrato aquoso quente de angico) em linhagens celulares de hepatócitos humanos (HepG2). ..... | 59 |
| Figura 17– Avaliação da citotoxicidade do EAQA por análise da interferência na viabilidade de fibroblastos murinos (3T3). .....                | 59 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Determinação das concentrações letais de EAQA (extrato aquoso a quente de angico) com atividade larvicida contra larvas (L4) de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .....                                                                    | 47 |
| Tabela 2 – Determinação das concentrações letais de <i>Anadenanthera colubrina</i> em pupas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> Inibição da atividade de proteases pelos extrato a quente de de <i>Anadenanthera colubrina</i> .. .....                 | 49 |
| Tabela 3 – Determinação do teor de carboidratos, compostos fenólicos, proteínas solúveis, peso seco e rendimento do extrato de <i>Anadenanthera colubrina</i> (EAQA) .....                                                                                         | 56 |
| Tabela 4 – Detecção de inibidores da atividade proteolítica de proteases cisteínicas e serínicas em EAQA (extrato a quente de angico).....                                                                                                                         | 58 |
| Tabela 5 – Concentração letal do extrato de <i>Anadenanthera colubrina</i> necessária para matar 50% dos microcrustáceos <i>Ceriodaphnia dubia</i> (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) e <i>Mysidopsis juniae</i> (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ). ..... | 60 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANEs – Anti-inflamatórios Não Esteroides

BSA – Albumina Sérica Bovina

CHIKV – Chikungunya

DENV1 – Vírus Dengue sorotipo 1

DENV2 – Vírus Dengue sorotipo 2

DENV3 – Vírus Dengue sorotipo 3

DENV4 – Vírus Dengue sorotipo 4

EAQA - Extrato Aquoso a Quente de Angico

EB – Extrato Bruto

IRE – Índice de repelência efetiva

MAYV – Vírus Mayaro

OROV – Vírus Oropouche

PBS – Tampão fosfato salino

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – N, N, N', N' -tetrametiletilenodiamina

TFA – Ácido trifluoroacético

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

UAI – Unidade de atividade inibitória

WNV – Vírus do Nilo Ocidental

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus Zika

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DIPTEROS

O filo Arthropoda é o mais abundante e diverso dentre os animais, compreendendo mais de 1,2 milhão de espécies existentes (MINELLI; BOXSHALL; FUSCO, 2013). A classe Insecta – caracterizada por artrópodes de corpo formado por cabeça, tórax, abdome, três pares de pernas e um par de antenas, podendo ter ou não asas (NEVES, 2016), contempla a ordem Diptera, a ordem de maior representatividade, com aproximadamente 150 mil espécies identificadas, distribuídas por habitats aéreos, aquáticos e terrestres (ALVES *et al.*, 2010). A família Culicidae está contida na classificação Diptera e contempla insetos denominados vulgarmente como muriçocas, pernilongos e mosquitos (FORATTINI, 2002). Representantes desse grupo possuem destaque por serem capazes de transmitir agentes etiológicos de doenças infecciosas, durante repasto sanguíneo, via picada (MELO *et al.*, 2011; DUGUMA; RUEDA; DEBBOUN, 2020). A família Culicidae é dividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. Estando as duas primeiras diretamente envolvidas na transmissão e disseminação dos agentes etiológicos (arbovírus) de arboviroses (do inglês, “*arthropod-borne virus*”) (RODRIGUES-ALVES *et al.*, 2020; CARVALHO; LONG, 2021; DI GIOVANNI *et al.*, 2021).

A transmissão dos arbovírus pelos insetos pode ocorrer vertical ou horizontalmente (SOCHA *et al.*, 2022). Enquanto a transmissão vertical, também chamada de transmissão hereditária, refere-se à transmissão de um patógeno de pais para filhos (LEQUIME; PAUL; LAMBRECHTS, 2016), a transmissão horizontal abrange todos os modos de transmissão não parental, incluindo a transmissão sexual e a transmitida por vetores (SOCHA *et al.*, 2022). Por muitos anos, os insetos vetores e os arbovírus foram endêmicos e restritos a determinadas regiões, mas agora estão se espalhando para inúmeras áreas do globo, uma situação que tem agravado o surgimento de epidemias em grande escala (KRAEMER *et al.*, 2015). Dentre esses insetos, estão *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) e *Aedes albopictus* (Skuse),

reconhecidos por sua competência vetorial como os vetores mais notáveis de inúmeros arbovírus de importância epidemiológica mundial (BONIZZONI, *et al.*, 2013; LWANDE *et al.*, 2019).

## 1.2 *Aedes aegypti* (L. 1762) E *Aedes albopictus* (S. 1894)

O gênero *Aedes* contempla cerca de 110 espécies descritas, com ênfase em duas espécies de maior importância epidemiológica global, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (BRADY; HAY, 2020; JONES *et al.*, 2020). A espécie *A. aegypti* tem origem africana e foi difundida pelo globo por meio do aumento do comércio intercontinental ampliado com as grandes navegações (TABACHNICK, 1991; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; MARTÍNEZ MUÑOZ, 1995; MAIA *et al.*, 2019; ALONSO, 2022; DORZABAN *et al.*, 2022). Posteriormente, a urbanização contribui para uma maior adaptação com o surgimento de criadouros artificiais, que mantêm um ambiente favorável para a postura e desenvolvimento dos ovos (GUBLER, 2011; FOSTER; WALKER, 2019; MAIA *et al.*, 2019; GUTH *et al.*, 2020).

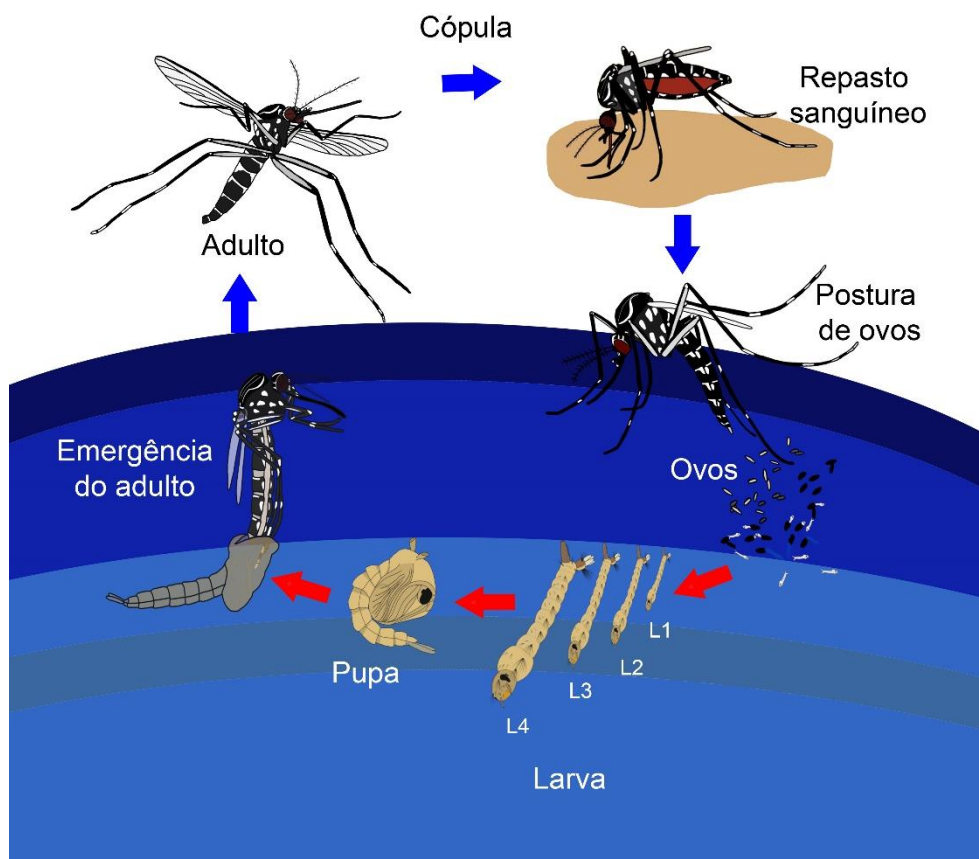
Já *A. albopictus* é uma espécie nativa da Ásia cuja dispersão mundial está associada à globalização, resultando em sua distribuição por todos os continentes, com exceção da Antártida (HAWLEY, 1988; BENEDICT *et al.*, 2007; FOSTER; WALKER, 2019; ROQUES *et al.*, 2021; POMBI; MONTARSI, 2020).

Apesar de *A. albopictus* ser uma espécie comumente encontrada em ambientes silvestres, já é possível registrar sua presença em ambientes urbanos devido ao processo de urbanização e devastação de ambientes naturais (JULIANO, 1998; DE MOURA *et al.*, 2014; ZOHDY *et al.*, 2018; FOSTER; WALKER, 2019; POMBI; MONTARSI, 2020). No Brasil, *A. albopictus* frequentemente ocorre em áreas periurbanas e silvestres, ou em parques urbanos muito menos associado a habitações urbanas do que o *A. aegypti* (AYLLÓN *et al.*, 2018; FERREIRA-DE-LIMA *et al.*, 2020). No entanto, a ocorrência de *A. albopictus* em zonas urbanas, utilizando criadouros artificiais para a sua reprodução, vem preocupando autoridades sanitárias nacionais (MEDEIROS-SOUSA *et al.*, 2015). Estudos de vigilância entomológica conduzidos na

região metropolitana de Natal-RN, área onde a pesquisa situa-se, revelaram uma profusão preocupante de *A. aegypti* e *A. albopictus*, além de outras espécies de insetos vetores de arbovírus (*Aedes fluviatilis*, *Aedes scapularis*, *Aedes serratus*, *Aedes taeniorhynchus*, *Haemagogus leucocelaenus* e *Wyeomyia bourrouli*) (SILVA-INÁCIO *et al.*, 2020; XIMENES *et al.*, 2020).

O ciclo de vida de *A. aegypti* e *A. albopictus* é composto de três fases imaturas (ovo, larva e pupa; a fase de larva, em especial, apresenta quatro estádios) e uma fase madura (adulto) (Figura 1) (FORATTINI, 2002; FIOCRUZ/IOF, 2022). O ciclo perdura de sete a dez dias em função das variações de temperatura e umidade, da quantidade de larvas no criadouro e da disponibilidade de alimento (CARRINGTON *et al.*, 2013; SARWAR; RASOOL, 2022). Alguns dias após atingir a fase madura, os insetos machos se tornam sexualmente competentes, então podem copular com as fêmeas. As fêmeas têm a necessidade de realização do repasto sanguíneo (sugar sangue picando humanos ou outros mamíferos) para obtenção de nutrientes essenciais à maturação dos ovarículos e outros processos fisiológicos envolvidos na reprodução (BRIEGEL, 2003; DUVAL *et al.*, 2019; NADIM *et al.*, 2020). Após repasto sanguíneo, ocorre a postura dos ovos, que variam entre 80 e 150 ovos/postura, podendo uma fêmea dar origem a 1.500 novos mosquitos durante sua vida e realizando vários repastos sanguíneos durante um único ciclo gonotrófico (GADELHA; TODA, 1985; SCOTT *et al.*, 1993; FIOCRUZ/IOF, 2019; JOVÉ *et al.*, 2020). As fêmeas detêm sangue, via repasto, geralmente de 1 e 3 dias após atingir fase adulta (FOSTER; WALKER, 2019).

Figura 1- Representação esquemática do ciclo de vida de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.



Fonte: Silva-Inacio, C.L., 2022 (Imagens gentilmente cedida pelo autor).

Para oviposição, as fêmeas do gênero *Aedes* geralmente buscam criadouros naturais ou artificiais que possibilitem o acúmulo de água da chuva (DIARRASSOUBA; DOSSOU-YOVO, 1997; BERNÁTH *et al.*, 2008). A escolha de local para oviposição, diferente de outros grupos de inseto, não se dá pela reflexão da luz, pois os criadouros geralmente estão em locais sombreados, havendo indícios que a escolha se dá por meio de detecção olfativa, preferindo ambientes ricos em microrganismos que possam servir de alimento para a sua prole (BERNÁTH *et al.*, 2008; BERNÁTH; HORVÁTH; MEYER-ROCHOW, 2012; MELO *et al.*, 2020). Após definição do local ideal, a postura dos ovos ocorre geralmente nas paredes úmidas dos criadouros, preferencialmente em superfícies rugosas ou com depressões que ficam um pouco acima da linha

d'água; os ovos eclodem dentro de dois dias, sob uma temperatura entre 27 e 30 °C (FORATTINI, 2002; FOSTER; WALKER, 2019; DORZABAN *et al.*, 2022).

As larvas que eclodem dos ovos concluem o seu desenvolvimento no ambiente aquático (SILVA *et al.*, 1993; FORATTINI, 2002; FOSTER; WALKER, 2019). O estágio larval perdura aproximadamente 8 dias, onde o inseto passa por quatro estádios larvais: L1 (onde a larva atinge 2 mm de comprimento, e perdura  $2,5 \pm 0,1$  dias), L2 (3 mm,  $0,9 \pm 0,1$  dias), L3 (4 mm,  $1,2 \pm 0,1$  dias) e L4 (5 mm,  $2,1 \pm 0,3$  dias) (GERIS *et al.*, 2012). Após o período de desenvolvimento larval, ocorre a muda para o estágio de pupa, durante a qual o indivíduo não se alimenta e, em seguida, metamorfoseia-se em adulto (FORATTINI, 2002; GERIS *et al.*, 2012; FOSTER; WALKER, 2019; DORZABAN *et al.*, 2022). Os adultos que emergem geralmente não voam por longas distâncias e dispersam até algumas centenas de metros de seus habitats de vida aquática (DORZABAN *et al.*, 2022). Espécies adultas do gênero *Aedes* apresentam todo o corpo de cor preta, possuindo também manchas brancas e listras no dorso (TAVEIRA *et al.*, 2001; FOSTER; WALKER, 2019).

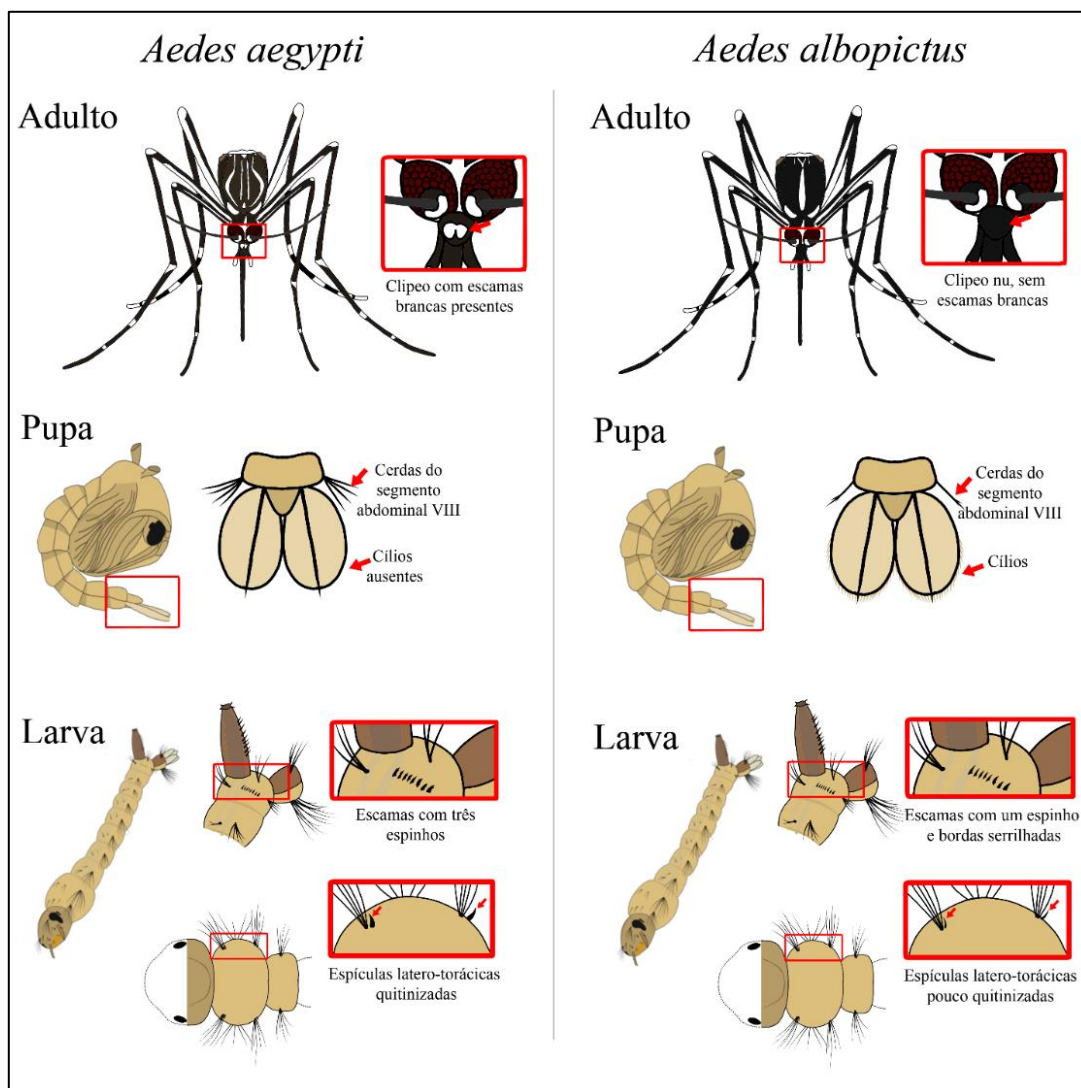
A distinção entre adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus* se dá, conforme ilustrado na Figura 2, pela presença de escamas no clipeo, localizado na região abaixo das antenas. Enquanto em *A. aegypti*, as escamas assumem tons branco-prateados, que se estrutura em um desenho com aspecto de lira, em *A. albopictus* as escamas estão dispostas formando uma faixa longitudinal de coloração branco-prateada (MARCONDES, 2001). O desenho do escutelo que é uma marcação branca em forma de lira com 4 linhas em *A. aegypti*, mas é uma única linha branca longitudinal mediana em *A. albopictus*, é mais claramente visível na superfície dorsal de mosquitos adultos (RUEDA, 2004; FONTANA *et al.*, 2020).

Ainda na figura 2, comparando larvas de instar IV notamos os pentes do segmento do tórax são uma característica claramente distinguível entre *A. aegypti* e *A. albopictus*, visto que no primeiro (um em cada lado do tórax) possuem grandes espinhos mediais arredondados por robustos espinhos subapicais, que estão ausentes no segundo (FARAJOLLAHI; PRICE, 2013; FONTANA *et al.*, 2020), como demonstrando na figura 2. Com relação as diferenças morfológicas em

pupas das duas espécies, na figura 2 mostra que em *A. albopictus* em apenas uma cerda no penúltimo seguimento abdominal e presença de cílios no último segmento, já o *A. aegypti* possui várias cerdas no penúltimo segmento e sem cílios no último segmento (BANGS e FOCKS, 2006).

Algumas vantagens para o crescimento populacional são demarcadas para *A. albopictus*, em relação a *A. aegypti*, a saber: larvas de *A. albopictus* se adaptam melhor em ambientes com recursos limitados e machos adultos da espécie são aptos a copular com fêmeas de outras espécies do gênero, tornando-as inférteis (JULIANO, 1998; BARGIELOWSKI; LOUNIBOS, 2016; WESTBY; JULIANO; MEDLEY, 2020).

Figura 2- Diferenças morfológicas entre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.



Fonte: Silva-Inacio, C.L., 2022 (Imagens gentilmente cedida pelo autor).

### 1.3 PRINCIPAIS VIROSES TRANSMITIDAS POR *A. aegypti* E *A. albopictus* NO BRASIL

A alimentação de adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus* é um fator determinante de sua taxa de fecundidade, comportamento de busca por hospedeiros e suscetibilidade à infecção (CARVAJAL-LAGO *et al.*, 2021). Os insetos geralmente se infectam durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado virêmico. Após

replicação no intestino médio do inseto, os arbovírus se disseminam para suas glândulas salivares, de onde são transmitidos para outro hospedeiro nos repastos sanguíneos subsequentes (FOSTER; WALKER, 2019; NADIM *et al.*, 2020; GUERRERO; CANTAERT; MISSÉ, 2020;). Dos arbovírus de maior importância médica no Brasil e no mundo transmitidos por *A. aegypti* e *A. albopictus*, aqueles causadores da dengue (ROY; BHATTACHARJEE, 2021), chikungunya (KHONGWICHIT *et al.*, 2021) e zika (PIELNAA *et al.*, 2020) recebem uma notória atenção, a demais, há também o vírus do Mayaro (MAYV) está causando surtos esporádicos na Amazônia brasileira (CARVALHO *et al.*, 2022). A dengue é considerada uma das mais importantes arboviroses humana do mundo em termos de morbidade e mortalidade, com ampla relevância epidemiológica em países tropicais e subtropicais (WELLEKENS *et al.*, 2022). Aproximadamente 400 milhões de casos de dengue por ano, resultando em 22.000 mortes em mais de 100 países em regiões tropicais e subtropicais (ROY; BHATTACHARJEE, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima um aumento de 30 vezes na incidência mundial de casos anuais de dengue nas últimas cinco décadas, tornando urgente os planos de redução da mortalidade e morbidade da dengue entre 2010 e 2020 em pelo menos 50% e 25%, respectivamente (WHO, 2021). De acordo com o boletim epidemiológico dos casos de arboviroses no Brasil (BRASIL, 2022), entre 02 de janeiro de 2022 a 05 de setembro de 2022, ocorreram 1.337.413 casos prováveis de dengue, compreendendo um aumento de 189,1% nos casos até o respectivo período em 2021. Para o ano de 2022, a Região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência de dengue, com 1.867,3 casos/100 mil hab., seguida das Regiões: Sul (1.018,0 casos/100 mil hab.), Sudeste (494,4 casos/100 mil hab.), Nordeste (398,5 casos/100 mil hab.) e Norte (227,6 casos/100 mil hab.). Até o momento, foram confirmados 854 óbitos por dengue e outros 277 óbitos permanecem em investigação.

Conhecida desde o século XVIII, a dengue tornou-se uma preocupação de saúde pública somente depois da segunda guerra mundial, quando houve uma expansão de casos (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015; WHO, 2022). O agente etiológico da dengue trata-se de um vírus de RNA envelopado de fita positiva (DENV),

sendo conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1 a DENV-4 (ROY; BHATTACHARJEE, 2021). Um quinto sorotipo (DENV-5) foi detectado no estado de Sarawak, na Malásia, em 2007, e isolado em outubro de 2013 (MUSTAFA *et al.*, 2015). Os sintomas da dengue são semelhantes ao da gripe comum (QURESHI, 2020), com potencial para evoluir para cefaleia frontal, dor orbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, fraqueza e erupção cutânea, podendo chegar à febre hemorrágica, na dengue mais grave (MUTHENENI *et al.*, 2017; CDC, 2022; DE *et al.*, 2022). O estágio crítico da infecção por DENV é quando o paciente desenvolve uma síndrome de vazamento capilar, com sinais de insuficiência circulatória e manifestações hemorrágicas que levam ao choque hipovolêmico potencialmente fatal, uma condição conhecida como síndrome do choque da dengue (MURUGESAN; MANOHARAN, 2020; CDC, 2022).

A chikungunya é uma arbovirose causada por um vírus (CHIKV) de RNA envelopado de fita simples de sentido positivo (KHONGWICHIT *et al.*, 2021). O vírus CHIKV tem origem enzoótica, encontrado inicialmente nas regiões sul e sudeste da Ásia, em ilhas do Oceano Índico, e nas regiões tropicais e subtropicais da África (ANJOS *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021), ocorrendo nas Américas no final de 2013 (NUNES *et al.*, 2015). Os sintomas clínicos da chikungunya envolvem distúrbios musculoesqueléticos debilitantes em humanos, caracterizados por febre, erupção cutânea, poliartralgia e mialgia. Embora não letal, a infecção por CHIKV pode resultar em manifestações clínicas atípicas ou graves, como uma síndrome reumática crônica (KRIL *et al.*, 2021). Devido à semelhança com o quadro clínico da dengue, erros de classificação dessas arboviroses acontecem com frequência, resultando em subnotificação (JAIN *et al.*, 2017); embora infecções simultâneas possam ocorrer em alguns casos (IREKEOLA *et al.*, 2022).

No Brasil, os primeiros casos de chikungunya foram notificados no segundo semestre de 2014, nas cidades de Oiapoque-AP e Feira de Santana-BA (BRITO, 2017). Entre 2014 e 2019, a epidemia de chikungunya se alastrou pela América Latina (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2017; GUALBERTO CAVALCANTI *et al.*, 2020). Somente em 2015, foram notificados 20.598 casos de infecção por CHIKV no Brasil, e em 2016,

até a 32ª semana epidemiológica, foram 216.102 notificações em todo o país; desses, 189.814 aconteceram no Nordeste do país (BRITO, 2017). De acordo com o boletim epidemiológico dos casos de arboviroses no Brasil (BRASIL, 2022), entre 02 de janeiro de 2022 a 05 de setembro de 2022, ocorreram 162.407 casos prováveis de chikungunya, compreendendo um aumento de 89,4% nos casos até o respectivo período em 2021. Para o ano de 2022, a Região Nordeste apresentou a maior incidência de chikungunya, com 243,7 casos/100 mil hab., seguida das Regiões Centro-Oeste (34,2 casos/100 mil hab.) e Norte (25,3 casos/100 mil hab.). Até o momento, foram confirmados 64 óbitos por chikungunya e outros 45 óbitos permanecem em investigação.

O agente etiológico da zika (ZIKV) é um vírus de RNA envelopado de fita positiva (PIELNAA *et al.*, 2020) inicialmente identificado em um primata da família Cercopithecidae (macaco-rhesus), em 1947, na Uganda, África (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Os impactos de sua dispersão estiveram limitados até o primeiro surto viral nas Ilhas Yap, Pacífico, em 2007, seguido por seu surgimento na Polinésia Francesa em 2015, e sua disseminação maciça nas Américas, a partir de 2015 (MASMEJAN *et al.*, 2020). No Brasil, o final de 2014 foi marcado pelo surgimento de um aglomerado de casos de doença exantemática aguda, mas somente em abril de 2015, o ZIKV foi identificado como agente etiológico e, em maio de 2015, o Ministério da Saúde Brasileiro reconheceu a circulação do ZIKV no Brasil (CARDOSO *et al.*, 2015). De acordo com o boletim epidemiológico dos casos de arboviroses no Brasil (BRASIL, 2022), entre 02 de janeiro de 2022 a 05 de setembro de 2022, ocorreram 9.916 casos prováveis de Zika, compreendendo um aumento de 98,8% nos casos até o presente momento. Felizmente, não foram notificados óbitos por zika no país até a respectiva semana do ano de 2022.

O ZIKV pode ser transmitido através da picada dos insetos vetores, sexualmente, por transfusão sanguínea ou verticalmente de mãe para filho, há ainda suspeitas de a transmissão do ZIKV ocorrer por transplante de órgãos e mediante contato com fluidos corporais infectados (MASMEJAN *et al.*, 2020). O período de incubação viral em humanos é de 3 a 12 dias, e os sintomas, quando ocorrem,

aparecem após 6 a 11 dias, sendo comumente dor de cabeça, febre, erupção cutânea, dor muscular/articular e conjuntivite (BHARDWAJ *et al.*, 2021). A transmissão vertical, resultando na infecção do feto, em particular, pode acarretar malformações graves no feto, incluindo anomalias estruturais cerebrais, hidropisia fetal, artrogripose, anomalias oculares e sinais clínicos como microcefalia, hipertonia e distúrbios da deglutição (MASMEJAN *et al.*, 2020). Um estudo observacional prospectivo realizado em Recife-PE (BRITO FERREIRA *et al.*, 2020) sinaliza a necessidade de uma atenção redobrada aos casos de infecção dupla por ZIKV e CHIKV com síndrome de Guillain-Barré, cujos pacientes investigados manifestaram sintomas mais agressivos, exigindo suporte de terapia intensiva e internações hospitalares mais longas, em comparação àqueles com monoinfecção.

Infelizmente ainda não há tratamentos específicos para essas e inúmeras outras arboviroses, cujo manejo clínico é realizado pela prevenção da infecção e pelo controle dos sintomas (SILVEIRA; TURA; SANTOS, 2019). Diversas pesquisas estão em andamento para o desenvolvimento de vacinas para seu enfrentamento. Em 2019, a primeira e única vacina contra dengue tetravalente (CYD-TDV), Dengvaxia® da Sanofi Pasteur, foi licenciada em 19 países endêmicos da dengue, mas está disponível apenas em 10 (TULLY; GRIFFITHS, 2021).

No Brasil, uma vacina contra dengue (Butantan-DV) desenvolvida pelo Instituto Butantan está na reta final de ensaios clínicos, cujos resultados são bastante promissores, mostrou uma eficácia de 79,6% para evitar a doença, de acordo com o estudo clínico de fase 3 (KALLAS *et al.*, 2020; INATITUTO BUTANTAN, 2022). O manejo da chikungunya é feito por uso de acetaminofeno (paracetamol), recomendado para o tratamento inicial da febre e da dor, estendendo a terapia com AINEs (anti-inflamatórios não esteróides) e corticosteroides em casos de insucesso (SALES *et al.*, 2018; DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022). Vacinas para a chikungunya estão em fase de testes clínicos (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022; ROQUES *et al.*, 2022; SLIFKA *et al.*, 2022; THOMPSON *et al.*, 2022). Ainda não existem vacinas aprovadas para a infecção por ZIKV (BAZ; BOIVIN, 2019), embora algumas já foram submetidas aos ensaios clínicos, com bons resultados (YEASMIN *et al.*, 2022).

Portanto, o controle do inseto vetor ainda é a estratégia mais eficaz para prevenir a infecção por arbovírus (SÁ *et al.*, 2022a).

#### 1.4 ESTRATÉGIAS DE MANEJO DAS ARBOVIROSES

O controle das arboviroses se dá por meio do manejo integrado e para isso são necessárias ações como: vigilância integrada de vetores e doenças, estratégias de controle de vetores, mobilização social e abordagens multissetoriais, fornecendo uma estrutura direcionada à distribuição do *Aedes* e ao nível de risco de doença (ROIZ *et al.*, 2018; OVERGAARD *et al.*, 2021). Essas ações visam controlar as doenças por meio do controle do vetor, controlando dessa forma há a diminuição da transmissão das arboviroses (OVERGAARD *et al.*, 2021).

Na década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, o uso de inseticidas orgânicos começou a ser empregado em grandes proporções, com o objetivo de proteger os soldados alocados nas regiões de risco de infecção por arbovírus (DANIEL, 2007; FERNANDES *et al.*, 2018). Nesse cenário, houve a descoberta das atividades inseticidas do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) (BRANCO, 2003; LEEMANS *et al.*, 2019). Além do uso do DDT, outros químicos com diferentes mecanismos de ação foram formulados, para controlar populações de vários vetores entre eles o *A. aegypti* e *A. albopictus* (BALA *et al.*, 2018; WULIANDARI *et al.*, 2020; WROBEL; MLYNARCZUK, 2021; SOCHA *et al.*, 2022). Na atualidade, estão disponíveis 4 classes principais de inseticidas químicos para controle de *Aedes*, piretroides, organoclorados, organofosfatos e carbamatos de acordo com o Comitê de Ação de Resistência a Inseticidas (do inglês, *Insecticide Resistance Action Committee* – IRAC) (BRAGA; VALLE, 2007; ALI *et al.*, 2022). Comumente, são usados dois grupos de inseticidas químicos para o controle de insetos no Brasil: os larvicidas, incluindo reguladores de crescimento de insetos (piriproxifeno, metopreno, diflubenzuron), e adulticidas, que são administrados por pulverização (SOCHA *et al.*, 2022).

Embora, o uso de inseticidas químicos seja recorrente no controle de insetos vetores, a administração indiscriminada vem promovendo o aumento da resistência a inseticidas em populações de insetos-alvo, a qual passaram a tolerar o inseticida (LIMA *et al.* 2006; CHEDIAK *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2018; ABBASI *et al.*, 2022; SILALAH *et al.*, 2022). Outros aspectos importantes são o elevado risco ambiental e o alto custo financeiro para a sua utilização (POLANCZYK *et al.*, 2003; BHANDARI *et al.*, 2021; HE *et al.* 2021; NEGATU; DUGASSA; MEKONNEN, 2021; SYAFRUDIN *et al.* 2021; KOCK *et al.*, 2022; REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2022). Desse modo, há urgência de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas formas de controle de *A. aegypti* e *A. albopictus* que sejam eficientes, de baixo custo, não apresentem risco ambiental, tenham direcionamento específico para as espécies e sejam capazes de minimizar a pressão seletiva sobre as populações, visando o retardo da resistência ou mecanismos adaptativos (BRAGA; VALLE, 2007; ACHEE *et al.*, 2019; MAFRA-NETO; DEKKER, 2019; RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020; PAUL; DAS, 2021; REZENDE-TEIXEIRA *et al.*, 2022).

Além disso, é pertinente considerar outros métodos já desenvolvidos para o manejo das arboviroses, a saber: vigilância entomológica, com o uso de armadilhas para a coleta de ovos, larvas, pupas e captura de adultos (DAY, 2016; ROSSI *et al.*, 2021; MULATIER; BOULLIS; VEGA-RÚA, 2022); intervenções moleculares e genéticas, como reguladores de crescimento de insetos (JINDRA; BITTOVA, 2020), a técnica do inseto estéril (PÉREZ-STAPLES; DÍAZ-FLEISCHER; MONTTOYA, 2021) e a tecnologia de DNA recombinante introduzida pela Oxitec (VIKTOROV, 2021); e controle biológico por organismos entomopatogênicos, a exemplo de formulações a base das bactérias *Bacillus thuringiensis israelensis* (POULIN *et al.*, 2022) e *Wolbachia* (ANTOWIJOYO *et al.*, 2022), e dos gêneros fúngicos *Beauveria* e *Metarhizium* (MANNINO *et al.*, 2019), além de predadores biológicos (FRÜH *et al.*, 2019; DAMBACH, 2020). Apesar dessas medidas usadas, o controle vetorial não está acontecendo de forma suficiente para barrar o crescimento das arboviroses, dessa forma, há uma demanda para implantação de estratégias adjuvantes (SARMA *et al.*, 2019).

## 1.5 INSETICIDAS BOTÂNICOS

Para lidar com todos os estresses bióticos e abióticos que afetam seu desenvolvimento e produtividade, as plantas desenvolveram estratégias adaptativas em níveis morfológico, anatômico, bioquímico e molecular (LAMALAKSHMI DEVI *et al.*, 2017; TIBEBU, 2018; RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020; MOSTAFA *et al.*, 2022; SHAH; JOSEPH, 2022). Essas estratégias adaptativas podem estar associadas ao desenvolvimento de estruturas físicas, como espinhos e tricomas, além da formação de barreiras químicas, como excreção de produtos do metabolismo primário e secundário (RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020; KAUR; KARIYAT, 2020). No caso da formação de barreiras químicas, as plantas, em especial leguminosas (uma família monofilética de plantas com flores), sintetizam e acumulam moléculas em resposta a estressores bióticos, conhecidos como fatores antinutricionais (FANs) (LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020; MOSTAFA *et al.*, 2022). Os FANs agem inibindo a atividade das proteases nos patógenos, impossibilitando-os de se alimentar dos aminoácidos presentes na planta (RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020).

Esses FANs vegetais, particularmente os de natureza proteica, como os inibidores de enzimas digestivas (proteases e amilases), as lectinas e as proteínas ligantes à quitina, vêm sendo estudados quanto às suas propriedades bioinseticidas, por expressarem efeito tóxico ou antimetabólico a inúmeros insetos vetores e pragas (AMORIM, 2007; RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020; PAUL; DAS, 2021). Alguns compostos inseticidas derivados de plantas já foram identificados, isolados, formulados e comercializados, a exemplo da nicotina, piretrona, rotenona e tosendanina (KOUL; WALIA, 2009; REZENDE, 2013; RODRÍGUEZ-SIFUENTES *et al.*, 2020).

A partir de diferentes órgãos de plantas, inúmeras extratos vegetais estão sendo analisados como adjuvantes no manejo de populações de *A. aegypti* e *A. albopictus*, principalmente quanto às suas propriedades larvicida (PIPLANI *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019; AMARASINGHE *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2021) e de repelência à picadas

(CHAMPAKAEW *et al.*, 2015; NICOLETTI, 2020; SILVA e JÚNIOR, 2020). Pesquisas sobre os efeitos ovicidas, na mortalidade de adultos e na repelência de postura das fêmeas também têm sido realizados, mas em menor escala (BARBOSA *et al.*, 2014; AUNGTIKUN; SOONWERA, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021; ALAVEZ-ROSAS; SOCORRO-BENITEZ; CRUZ-ESTEBAN, 2022; CHELLAPPANDIAN *et al.*, 2022).

O Brasil é um país com uma grande diversidade vegetal (PESSOA *et al.*, 2006; MARIANO *et al.*, 2021). Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga destaca-se como um ecossistema endêmico brasileiro caracterizado por uma vegetação xerófila decídua na qual a produção de folhas e flores é dependente das chuvas, que são mal distribuídas, em termos de volume e frequência ao longo do ano (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; FRANCO; PATERNO; GANAD, 2021). Embora a Caatinga seja ainda uma fonte pouco explorada por estudos quanto aos seus recursos naturais, esse ecossistema compreende uma rica fonte de biodiversidade para prospecção de moléculas bioativas contra insetos pragas ou vetores e patógenos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; DAWSON *et al.*, 2021). Nesse cenário, a vegetação da Caatinga desponta como candidata para obtenção sustentável de agentes para o manejo de infecções por arbovírus através do controle populacional de seus insetos vetores (BARBOSA *et al.*, 2014; SÁ *et al.*, 2022a).

Estudos concentrados na identificação de extratos de plantas da Caatinga com atividade inseticida contra *A. aegypti* e *A. albopictus* vêm sendo realizados por diversos grupos (LUNA *et al.*, 2005). BARBOSA e colaboradores do nosso laboratório em 2014, realizaram a análise de 20 extratos de sementes de plantas da Caatinga e averiguaram que esses extratos apresentavam atividade contra *A. aegypti* em diferentes fases do ciclo de vida do mosquito. Do mesmo modo, extratos provenientes das sementes de *Annona mucosa* Jacq. mostraram atividade larvicida contra as larvas de *A. albopictus* (RODRIGUES *et al.*, 2021). Há diversos outros trabalhos usando extratos de sementes contra mosquitos do gênero *Aedes* (QADIR, 2014; THONGWAT *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019; FARAG *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021; BERTONCELI *et al.*, 2022).

O nosso laboratório de pesquisa na UFRN vem realizando estudos na área de prospecção de extratos de plantas da Caatinga para o manejo do *Aedes* e obtendo resultados promissores, assim como outros grupos de pesquisas da Região Nordeste têm desenvolvido trabalhos na temática, como o da professora Patrícia Paiva (UFPE), da professora Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (UFPB), da professora Selene Maia (UECE).

#### 1.6 *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

A *Anadenanthera colubrina* é uma planta da família da Fabaceae Mimosoideae, também conhecido como Angico, Angico branco, Angico vermelho, Angico amarelo, Angico coco (LOREZI, 2008; MOTA *et al.*, 2017; CORRÊA *et al.*, 2021). Árvore decídua na estação seca, medindo 7-15 metros de altura, caule com 30 cm de diâmetro, ramos lentilhados, pubescente a glabrescente, folhas com 15-20 cm de comprimento, alternas, bipinadas (MORIM, 2017; PEREIRA, 2017). Frutos tipo vagem de cor castanho avermelhado (Figura 3), descente de apenas um dos lados, contendo 8 a 15 sementes, as sementes apresentam coloração variando entre castanho a pardo avermelhada escura, brilhante, com cerca de 2 cm de comprimento e 1,5 cm de largura (LORENZI, 2008; MORIM, 2017; PEREIRA, 2017) (Figura 3).

A espécie *A. colubrina* vulgarmente conhecida como angico-vermelho, pertence à família das *Mimosaceae*, é uma planta arbórea, muito utilizada na arborização de pastos, como fonte de madeira e para produção de carvão. O fruto é um tipo de vagem de cor castanho-avermelhada deiscente contendo em média 10 sementes que apresentam coloração do tegumento entre castanho a pardo avermelhada escura com cerca de 1,2 cm de forma discoide (NERY, 2008, PAREYN, *et al.*, 2018). A composição química das sementes se caracteriza pela presença de elevados teores de proteínas, seguidos de extrato etéreo e baixo conteúdo de amido (NERY, 2008). Considerando as características, *A. colubrina* é uma espécie de boa

adaptação, e potencial para bioprospecção de compostos bioativos candidatos a serem utilizados como bioinseticidas para auxiliar no controle do *Aedes*.

Figura 3- Detalhe de folhas, flores e fruto - *Anadenanthera colubrina*, Frutos (A) e Flores (B).



Fonte: PEREIRA, 2017. Disponível em:

<<http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/06/21/anadenanthera-peregrina-l-speg/>>.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o extrato aquoso a quente de sementes de *Anadenanthera colubrina* quanto a seu potencial inseticida contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, avaliar sua biossegurança por ensaios de cito e ecotoxicidade e efetuar sua caracterização bioquímica parcial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade inseticida do extrato de sementes de *A. colubrina* em diferentes estágios do ciclo de vida (ovo, larva, pupa e adulto) de *A. aegypti* e *A. albopictus*.
- Examinar, em condições de campo, os efeitos do extrato de sementes de *A. colubrina* na oviposição de fêmeas de *Aedes*.
- Efetuar a caracterização bioquímica parcial do extrato de sementes de *A. colubrina*.
- Averiguar a biossegurança do extrato por ensaios de toxicidade celular e ambiental.

### 3 MATERIAL E METÓDOS

#### 3.1 SEMENTES

As sementes *Anadenanthera colubrina* foram obtidas do banco de sementes da Floresta Nacional (Flona) de Nísia Floresta, Unidade de Conservação gerida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), localizada no município de Nísia Floresta, estado do Rio Grande do Norte (RN) (6°04'56.7"S 35°11'08.3"W). A presente pesquisa está regulamentada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob n. A3104E7. As sementes doadas não estavam destinadas a reflorestamento (Figura 4).

Figura 4 - Sementes de *Anadenanthera colubrina* utilizadas na pesquisa.



Fonte: Elaborada pela autora (2022)

#### 3.2 COLÔNIA DE INSETOS

Os insetos utilizados nos ensaios de laboratório foram provenientes das colônias de *A. aegypti* e *A. albopictus* mantidas no Laboratório de Entomologia Médica (LABENT) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) desde 2009. Os

insetos são oriundos do monitoramento realizado pelo LABENT no campus universitário (colônia aberta), são distribuídas ovitrampas semanalmente e os ovos coletados são contados e colocados para a eclosão e as larvas são identificadas. Insetos adultos foram mantidos em gaiolas de reprodução sob temperatura média de 27°C, umidade média de 80% e fotoperíodo natural, e alimentados com uma solução açucarada (10%). A cada 48 h, um hamster (*Mesocricetus auratus*) foi oferecido às fêmeas para repasto sanguíneo, já as larvas são alimentadas com fermento biológico na concentração 250 mg/L, a qual é adicionado os ovos para a eclosão das larvas para que a eclosão ocorra em um mesmo intervalo de tempo, e esse fermento já serve para a alimentação. A oviposição ocorreu em ovitrampas colocadas na base das gaiolas (Figura 5).

Figura 5 - Colônias de *A. aegypti* e *A. albopictus* mantidas no Laboratório de Entomologia



Médica da UFRN (LABENT). Com gaiolas de criação e bandejas de eclosão das larvas.

Fonte: Elaborada pela autora (2022)

### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Após a remoção do tegumento das sementes, os cotilédones foram triturados em moinho de facas Willye modelo STAR FT-50 (Fortinox, Brasil) até a obtenção de

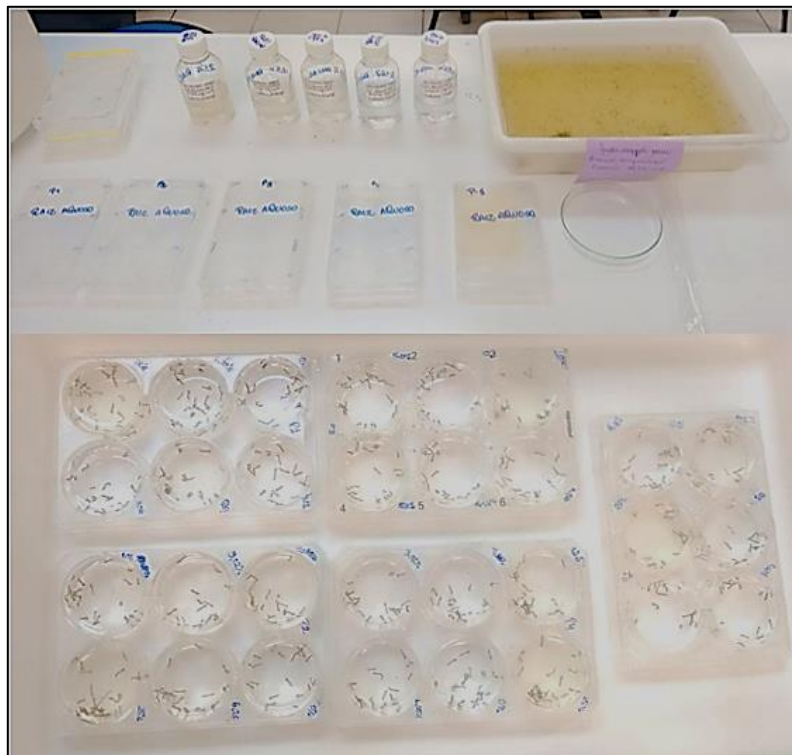
uma farinha, que foi então peneirada com malha correspondente a 40 mesh. Para a extração aquosa a quente, a farinha foi homogeneizada em água destilada, na proporção de 1:10 (m/v), e submetida a aquecimento a 80 °C em banho-maria, por 3h 30min sendo agitado manualmente a cada 30 min, com posterior centrifugação (Centrífuga modelo 5810R, Eppendorf, Alemanha) por 30 min, a 10.000 x g, 4 °C O sobrenadante foi filtrado. O sedimentado foi solubilizado com água na mesma proporção inicial e submetido ao banho maria por mais 3h 30 min e centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante resultante foi somado ao sobrenadante inicial e denominado extrato aquoso a quente de angico (EAQA) e armazenado a -20 °C.

### 3.5 BIOENSAIOS INSETICIDAS

#### 3.5.1 Ensaios larvicidas

Os ensaios larvicidas em larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram realizados segundo o protocolo estabelecido por nosso grupo (BARBOSA *et al.*, 2014), adaptados das diretrizes da OMS para larvicidas naturais (WHO, 2005). Em triplicata, 20 larvas do quarto estágio (L4) de cada espécie foram distribuídas em cada um dos seis poços de placas de cultura de células (adaptadas para a realização dos ensaios de forma a reduzir o volume de extrato empregado no ensaio). Posteriormente, 10 mL de EAQA em concentrações decrescentes 17,25 mg/mL, 8,62 mg/mL, 4,31 mg/mL, 2,15 mg/mL, 1,07 mg/mL e 0,54 mg/mL (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,56 v/v respectivamente) ou água destilada (controle negativo) foram distribuídos randomicamente nas placas. O efeito de EAQA sobre a mortalidade das larvas foi avaliado após 24 h e 48 h de incubação, em temperatura ambiente (Figura 6). As larvas foram consideradas mortas quando não respondiam aos estímulos mecânicos empregados nas placas.

Figura 6 - Ensaio larvicida realizado em placa de cultura de 6 poços com larvas em L4.



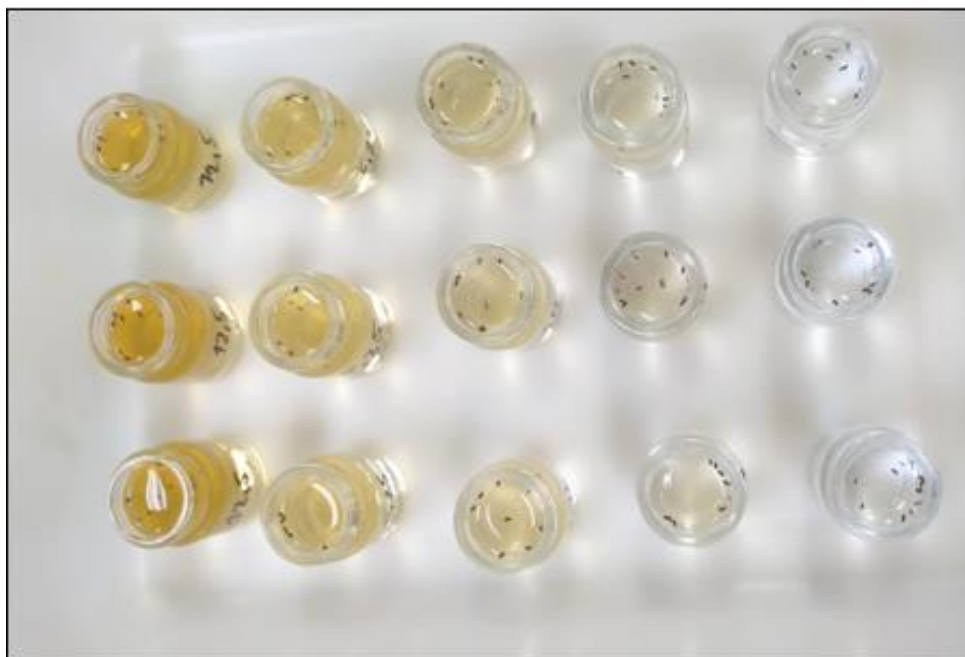
Fonte: elaborada pela autora (2022)

As concentrações letais capazes de interromper o desenvolvimento das larvas em 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>) após 24 h e 48 h de exposição foram determinadas e expressas em mg/mL, baseadas na massa seca do extrato.

### 3.5.2 Ensaio pupicidas

Em triplicata, 10 pupas foram transferidas para recipientes de vidro contendo 20 mL de água destilada (controle negativo) ou EAQA nas concentrações de 17,25 mg/mL, 8,62 mg/mL, 4,31 mg/mL, 2,15 mg/mL, 1,07 mg/mL e 0,54 mg/mL (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,56% v/v respectivamente). O efeito de EAQA sobre a mortalidade das pupas foi avaliado após 24 h e 48 h de incubação, em temperatura ambiente, conforme metodologia proposta por Barbosa *et al.* (2014) (Figura 7). As pupas foram consideradas mortas quando não respondiam aos estímulos mecânicos empregados nas placas.

Figura 7 - Ensaio pupicida. Recipientes de vidro contendo pupas de *Aedes* e soluções-teste.



Fonte: elaborada pela autora (2022)

### 3.5.4 Ensaios aduicidas

O efeito de EAQA sobre os insetos adultos de *Aedes aegypti* foi investigado conforme metodologia proposta por Barbosa *et al.* (2014). Em triplicata, 30 insetos (machos e fêmeas) com idade de 1-4 dias foram transferidos para gaiolas metálicas cúbicas (25,5 cm x 25,5 cm x 25,5 cm) revestidas com malha fina (Figura 8). Em cada gaiola, foi adicionado um chumaço de algodão embebido com solução açucarada 10% preparada com água destilada (Controle) ou com o EAQA (0,26 mg/mL). A cada 48 h, os chumaços contendo os tratamentos foram renovados. O número de insetos mortos foi contabilizado após 10 dias.

Figura 8 - Gaiola utilizada nos ensaios adulticidas e de atratibilidade/repelência. (A) Vista frontal e (B) lateral.



Fonte: elaborada pela autora (2022).

### 3.5.3 Ensaios ovicidas/eclosão

Os ensaios ovicidas foram realizados através de uma adaptação do método proposto por Su; Mulla (1998), no qual, inicialmente, palhetas acartonadas (2,5 cm x 15 cm; Eucatex®) foram envolvidas por papel filtro e fixadas à ovitrampas situadas na base da gaiola da colônia. Após 48 h, as palhetas foram retiradas da gaiola, e com o auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss Stemi 508), os ovos foram contados e evidenciados com lápis grafite. Em seguida, delicadamente, o papel filtro no qual os ovos estavam fixos, foram recortados para que os ovos fossem isolados e estes foram depositados em recipientes descartáveis de 50 ml de volume. Optou-se por considerar os ovos presos ao papel filtro para que eles não fossem danificados durante o seu manuseio.

Sobre os ovos (n = 50), em triplicata, foi adicionado 50 mL de EAQA na concentração estabelecida a partir do teste larvicida a CL<sub>90</sub> de 48 h (Teste) ou água destilada (controle negativo). Após dez dias, verificou-se a viabilidade dos ovos, conforme Taxa de Eclosão (TE), calculada conforme proposto por Su & Mulla (1998), através da fórmula abaixo:  $TE (\%) = (Nle / Ntot) \times 100$ , onde Nle é o número de larvas eclodidas após o tratamento dos ovos com EAQA e Ntot é o número total de ovos tratados.

### 3.5.5 Ensaio de atratibilidade/repelência de postura de ovos em Laboratório

A interferência de EAQA na postura de ovos por fêmeas adultas foi avaliada conforme metodologia proposta por Barbosa *et al.* (2014). Em triplicata, 100 insetos adultos, sendo 80 fêmeas e 20 machos, com idade de 1-4 dias foram transferidos para gaiolas metálicas cúbicas (25,5 cm x 25,5 cm x 25,5 cm) revestidas com malha fina, contendo ovitrampas adaptadas com um suporte rugoso de papel filtro para a oviposição. As ovitrampas continham água destilada (Controle) ou EAQA nas concentrações de 17,25 mg/mL, 8,62 mg/mL, 4,31 mg/mL, 2,15 mg/mL, 1,07 mg/mL e 0,54 mg/mL distribuídas randomicamente na base da gaiola.

Diariamente, uma solução açucarada a 10% foi oferecida aos insetos. A cada 48 h um hamster da espécie *Mesocricetus auratus* foi colocado no interior da gaiola para repasto sanguíneo das fêmeas. O papel filtro e as soluções teste (água destilada e EAQA) foram renovados a cada 48 h, e o ensaio teve duração de 10 dias. Decorrido esse período, os ovos postos em cada ovitrampa foram contabilizados e o índice de repelência efetiva (IRE) foi determinado para avaliar os efeitos repelente ou atrativo para oviposição das soluções testadas, através da fórmula proposta por Gupta e colaboradores (2011):  $IRE (\%) = (N_t - N_c / N_t + N_c) \times 100$ , onde  $N_t$  é o número total de ovos postos nas ovitrampas com EAQA e  $N_c$  é o número total de ovos depositados nas ovitrampas controle (água destilada). O índice obtido é interpretado como uma correlação, com range de -100 a +100, sendo que os valores negativos representam atratibilidade para oviposição e os positivos, repelência.

### 5.5.6 Ensaio de campo em pequena escala

A interferência de EAQA na oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* foi investigada em condições de campo, em ensaios de pequena escala, de acordo com a metodologia proposta por Fay; Eliason (1996), com algumas adaptações propostas por Sá *et al.*, (2022b). A cidade de Mossoró foi escolhida por ter alta densidade de *A. aegypti*. O clima de Mossoró é seco e as médias de temperatura e umidade durante os meses de execução dos testes de campo (janeiro a março de 2020), respectivamente, foram 27,8 °C (27,3 °C – 28,3 °C) e 77,1% (73,9% – 80,3%) (INMET, 2021). Recipientes de plástico de cor preta (capacidade de 1,5 L; Ovitrampas) foram

colocados aleatoriamente sob árvores em quatro locais no município de Mossoró - RN (5°12'17,8"S 37°18'55,8"W). Uma palheta de madeira prensada (2,5 cm x 15 cm; Eucatex®) foi fixada em cada ovitrampa, deixando a parte áspera exposta ao interior da ovitrampa. Durante seis semanas, ovitrampas contendo apenas água (controle; 300 mL) foram monitoradas e a partir da sétima semana, ovitrampas contendo EAQA na concentração de 0,26 mg/mL (300 mL volume total) foram adicionadas ao monitoramento. A positividade da ovitrampa, se deu pela presença de ovos nas palhetas. A densidade de ovos e número de ovos por ovitrampa foram registrados em intervalos semanais para cálculo do índice de densidade de ovos (ODI) e índice de positividade de oviposição (OPI), conforme Moura *et al.*, (2020). O ODI é o número médio de ovos por ovitrampa, obtido pela divisão do número de ovos encontrados pelo número de ovitrampas avaliadas. O OPI é obtido dividindo-se o número de ovitrampas positivas e o número de ovitrampas examinadas.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA INICIAL DO EXTRATO

#### 3.6.1 Determinação do peso seco e rendimento

O rendimento da massa (mg/mL) obtida na extração foi determinado pelo cálculo de peso seco (expresso em mg) a partir de volumes conhecidos de EAQA. Em separado e em triplicata, um volume padrão (5,0 mL) de EAQA foi disposto em tubos de fundo cônico tipo Falcon com peso conhecido e submetido à liofilização, com posterior pesagem. A diferença entre os pesos pré- e pós-liofilização foi determinada, sendo o resultado dividido pelo volume inicial de extrato submetido à liofilização (5,0 mL), estimando, desse modo, a quantidade de massa extraída por mL de solvente. Já o rendimento total (expresso em %), compreendeu a relação da massa de pó de semente (em g) investida na extração e a massa total (em g) de EAQA liofilizado.

#### 3.6.2 Dosagem de proteínas solúveis, carboidratos e compostos fenólicos

Os teores de proteínas solúveis totais, carboidratos totais e compostos fenólicos totais foram determinados no EAQA *in natura* ou liofilizado (solubilizado em concentrações conhecidas, m/v), respectivamente, pelos métodos de Bradford (1976), Dubois *et al.* (1956) e Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventós (1999), usando

albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Brasil), D-galactose (Sigma-Aldrich, Brasil) e ácido gálico (Casa da Química Ind. E Com., Brasil) como padrões.

### 3.6.3 Detecção de proteínas bioativas

A presença de lectinas foi avaliada pela visualização direta de aglutinação em suspensão de eritrócitos humanos (hematócrito 4%), após incubação por 60 min com diluições seriadas de EAQA (1,0 mg/mL) a 37 °C (DEBRAY *et al.*, 1981). Foi utilizado sangue humano dos tipos A, B e Q doados por doadores voluntários (Autorização do Comitê de Ética em Pesquisas para Coleta de Sangue n.4.769.699). Os eritrócitos foram previamente tratados com as enzimas tripsina (1,0 mg/mL; Sigma-Aldrich, Brasil) e papaína (1,0 mg/mL; Sigma-Aldrich, Brasil) na proporção 1:1 (v/v). Os resultados foram expressos em unidades de hemaglutinação (HU), definidas como o inverso da maior diluição do extrato que apresentou aglutinação visível.

Para identificação de inibidores de proteases serínicas no extrato foi realizado um ensaio de proteólise utilizando enzimas obtidas comercialmente, tripsina (Sigma-Aldrich, Brasil) e quimotripsina do pâncreas bovino (Sigma-Aldrich, Brasil), utilizando como substrato a azocaseína (1%; Sigma-Aldrich, Brasil) (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989). Uma curva de atividade da enzima foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal de enzima a ser utilizada nos ensaios de inibição com o extrato. Os ensaios foram realizados utilizando o volume de extrato corresponde a 200 µg de proteínas. A atividade proteolítica foi medida em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 a 37 °C, num volume final de 200 µL (0,3 mg/mL da enzima). A reação durou 30 min e foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 20% (v/v). Em seguida, a solução foi centrifugada a 12.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi alcalinizado com NaOH 2 N na proporção 1:1 (v/v). A reação de hidrólise do substrato foi acompanhada por leitura espectrofotométrica (Espectrofotômetro Epoch-Biotek, EUA) a 440 nm. Uma unidade de inibição (UI) corresponde a redução na abs em 0,01 na atividade enzimática na presença do extrato. A atividade específica foi considerada a relação entre a UI e a quantidade de proteína utilizada no ensaio. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicatas com controles negativos e positivos.

### 3.6.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético das proteínas do extrato foi analisado por separação em SDS-PAGE, de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis foram preparados em placas de vidro de 8 cm x 10 cm com espaçadores de 1 mm. O gel de separação de acrilamida a 12% foi composto de uma mistura de 3,35 mL de água ultrapura, 2,5 mL de tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, 100 µL de SDS 10%, 4 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (29,2:0,8), 50 µL de persulfato de amônio e 5 µL de TEMED. O gel de empilhamento foi preparado misturando-se: 3,05 mL de água ultrapura, 1,25 mL de tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 665 µL de bis-acrilamida (30%), 25 µL de persulfato de amônio, 5 µL de TEMED. O tampão de corrida utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, e SDS 0,1%, pH 8,3. EAQA foi diluído em tampão de amostra (SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,1% em tampão Tris/HCl 200 mM, pH 6,8) em volume equivalente a massa de proteína de 15 µg. A corrida eletroforética foi realizada em sistema de cubas para mini géis BioRad MiniProtean 3, em uma corrente de 50 V no gel de empilhamento e 150 V por período aproximado de 2 horas até a linha de frente de corante do tampão de amostra atingir o final do gel de separação. Em seguida, as proteínas separadas no gel foram reveladas por coloração com azul de coomassie coloidal, segundo Neuhoff e colaboradores (1988).

## 3.7 CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO

### 3.7.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade de EAQA foi avaliada em ensaios de cultura de células, pelo método de Mosmann (1983). Linhagens celulares de hepatócitos humanos (HepG2, ATCC® HB8065™) e de fibroblastos murinos (3T3, ATCC® CRL-1658™) foram cedidas pelas professoras doutoras Viviane Souza do Amaral e Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros, respectivamente, do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN, Natal-RN. As células foram cultivadas ( $5 \times 10^4$  células/mL) em meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco; Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab, Brasil), L-glutamina 2% (Sigma-Aldrich,

EUA) e estreptomicina/penicilina 1% (Sigma-Aldrich, EUA), a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> (Incubator HEPA Filter Modelo 3110 Thermoforma Serie II Water CO<sub>2</sub>, EUA). As células foram incubadas em uma concentração crescente do extrato (0,001, 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) e seus efeitos citotóxicos foram analisados pela redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio).

O comprometimento da viabilidade celular foi calculado utilizando a seguinte equação: Redução do MTT (%) =  $(A_e - A_c) \times 100$ , onde  $A_e$ : absorvância das células submetidas ao tratamento com extratos e  $A_c$ : absorvância do controle. Concentrações de extrato que promoveram redução de MTT abaixo de 80% foram consideradas antiproliferativas e potencialmente tóxicas, e a concentração citotóxica capaz de inibir 50% da viabilidade celular (CC<sub>50</sub>) foi determinada.

### 3.7.2 Ecotoxicidade

Os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1894) e *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979) foram provenientes de uma colônia bem estabelecida no Laboratório de Ecotoxicologia, do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFR, Natal-RN, e cedidos pelo professor doutor Guilherme Fulgêncio de Medeiros. O cultivo de *C. dubia* ocorreu conforme diretrizes da NBR 13373 (ABNT, 2005). Em um aquário (capacidade de 1 L de volume), foram colocados cerca de 60 indivíduos adultos, os quais foram mantidos em temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 h (12 h luz: 12 h escuro). Diariamente, foi ofertada aos microcrustáceos uma ração para peixes tropicais de Tetramin (Tetra ®; 10 mg de ração moída para cada 1 L de água destilada) e algas. A cada 24 h, os náuplios foram retirados do aquário para a realização dos ensaios. O cultivo de *M. juniae* ocorreu conforme diretrizes da NBR 15308 (ABNT, 2011). As colônias foram estabelecidas em água do mar natural e filtrada, onde 10 machos e 30 fêmeas foram mantidos por aquário (capacidade de volume de 10 L) continuamente aerados e cobertos com tampa para evitar a evaporação da água, que foi renovada semanalmente. Os organismos foram mantidos a  $24 \pm 2$  °C, salinidade de 35‰ e fotoperíodo de 12 h (12 h luz: 12 h escuro), foram alimentados diariamente com náuplios de *Artemia* sp.

Para o ensaio de ecotoxicidade em *C. dubia*, cinco filhotes de *C. dubia* com 6-12 h de idade foram transferidos para recipientes de vidro contendo 30 mL de água

destilada (controle negativo) ou concentração crescente de EAQA (0,001, 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) para determinação das CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub> e CL<sub>99</sub> em 24h e 48 h de exposição às soluções-teste.

Os experimentos com *M. juniae* foram utilizados em béqueres (volume final 300 mL), sem renovação do meio ou aeração, mantidos em sala com temperatura controlada ( $24 \pm 2$  °C) com fotoperíodo de 12 h de luz a 12 h de escuro. A cada 24 horas, o número de *M. juniae* vivos foi contabilizado e o excesso de comida e animais mortos foram removidos. Ao final do teste (48 h), os organismos sobreviventes foram contados. As concentrações de EAQA foram as seguintes 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL para determinação das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em 24h e 48 h de exposição às soluções-teste. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, os quais foram calculados usando o software GraphPad Prism versão 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). O software Probit<sup>®</sup> (Analyst Soft Canada) foi usado para calcular as concentrações requeridas para matar 50% (CL<sub>50</sub>), 90% (CL<sub>90</sub>) e 99% (CL<sub>99</sub>) dos organismos testados por meio da análise do Probit, com intervalo de confiança de 95%. O software Origin<sup>®</sup> versão 8.0 (Microcal, Northampton, USA) foi usado para obtenção das equações de regressão ( $y$ = mortalidade;  $X$ = concentração) e dos coeficientes de regressão. As diferenças entre as médias foram constatadas por Student's *t*-test e ANOVA (significância de  $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ATIVIDADE INSETICIDA

#### 4.4.1 Atividade larvícida

Análises dos resultados dos ensaios larvicidas para *Aedes aegypti* revelam que EAQA promoveu a letalidade em 24 h de 95% das larvas na concentração de 3,12% (v/v) (1,07 mg/mL) e de 97% na concentração de 6,25% (v/v) e nas demais concentrações 4,31 mg/mL, 8,62 mg/mL e 17,25 mg/mL (12,5%, 25% e 50% (v/v)) promoveu 100% de mortalidade, em 48 h todas as concentrações testadas matou 100% das larvas. Já para *A. albopictus*, O extrato propiciou mortalidade larval de 82% na concentração mais baixa (3,12% v/v) (1,07 mg/mL) e em 6,25% (v/v) (2,15 mg/mL) morte de 95%, e em 12,5%, 25% e 50% (v/v) (4,31 mg/mL, 8,62 mg/mL e 17,25 mg/mL) mortalidade de 100% das larvas em 24 h, em 48 h na concentração 3,12% (v/v) (1,07 mg/mL) matou 96% das larvas e nas outras concentrações 2,15 mg/mL, 4,31 mg/mL, 8,62 mg/mL e 17,25 mg/mL, (6,25%, 12,5%, 25% e 50% (v/v)) 100% das larvas morreram.

Visando obter uma comparação realística dos ingredientes ativos do extrato, os valores das CL foram determinados e expressos em mg/mL (Tabela 1). Com base nos intervalos de confiança de 95% (n = 100 larvas por concentração, 20 larvas por replicada, 5 replicata) para os valores de CL, EAQA apresentou promissores valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (mg/mL) obtidos em 24 h (0,16 e 0,94 mg/mL, Inclinação/SE = 1,49/0,14,  $\chi^2 = 0,99$  e  $R^2 = 0,92$ ) e 48 h (0,002 e 0,26 mg/mL, Inclinação/SE = 0,63/0,41,  $\chi^2 = 1,00$  e  $R^2 = 0,82$ ) pós-exposição às larvas de *A. aegypti*. Em relação às larvas de *A. albopictus*, os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (mg/mL) obtidos em 24 h foram, respectivamente 0,36 e 1,28 mg/mL (Inclinação/SE = 1,99/0,11,  $\chi^2 = 0,77$  e  $R^2 = 0,97$ ), e os valores obtidos em 48 h foram, respectivamente, 0,06 e 0,62 mg/mL (Inclinação/SE = 1,66/0,16,  $\chi^2 = 0,82$  e  $R^2 = 0,93$ ). Esses dados sugerem uma potencialização da atividade larvícida em função do tempo de exposição aos componentes tóxicos do extrato.

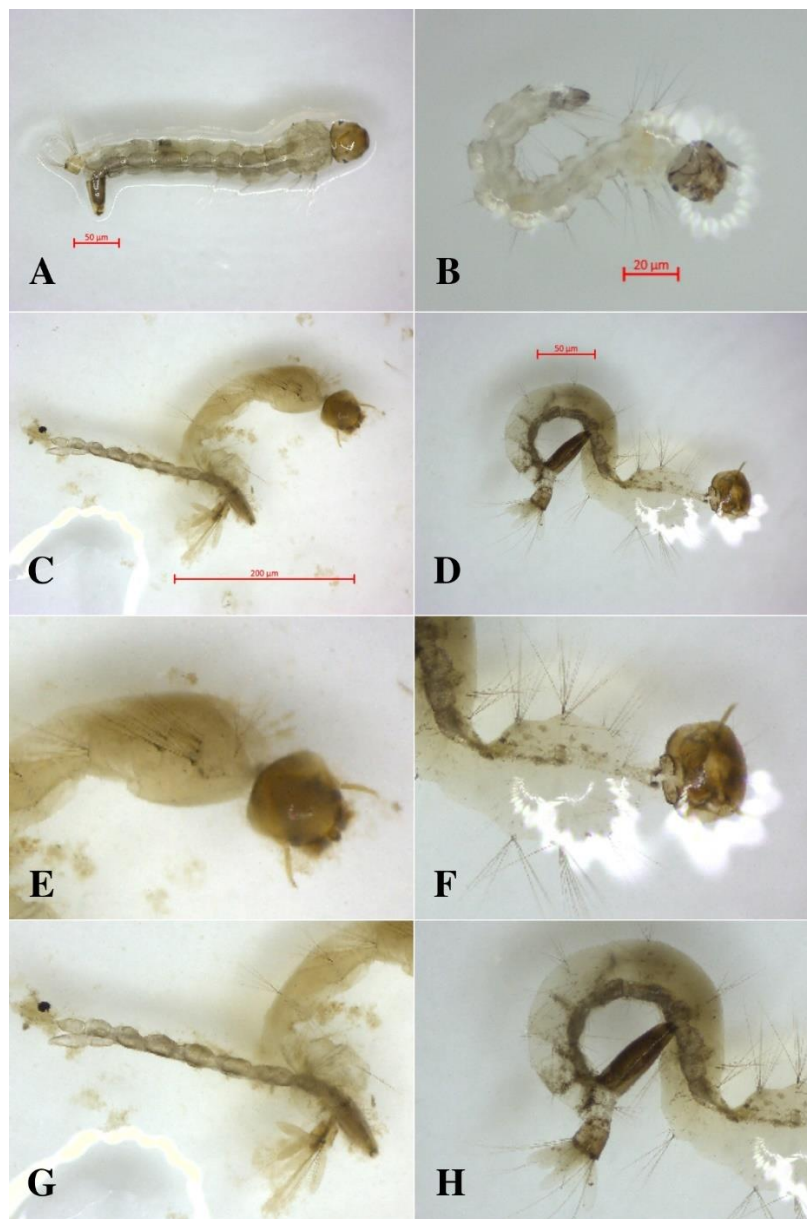
**Tabela 1** - Determinação das concentrações letais de EAQA (extrato aquoso a quente de angico) para larvas (L4) de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

|                                           | <i>Aedes aegypti</i> |                         | <i>Aedes albopictus</i> |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
|                                           | 24 h                 | 48 h                    | 24 h                    | 48 h                 |
| <b>CL<sub>50</sub></b><br><b>(IC 95%)</b> | 0,16<br>0,08 – 0,31) | 0,002<br>(0,0003– 0,01) | 0,36<br>(0,021– 0,59)   | 0,06<br>(0,06– 0,25) |
| <b>CL<sub>90</sub></b><br><b>(IC 95%)</b> | 0,94<br>(0,66– 2,35) | 0,26<br>(0,04–1,64)     | 1,28<br>(0,94– 2,58)    | 0,62<br>(0,35– 1,51) |
| <b>Inclinação/(SE)</b>                    | 1,49/0,14            | 0,62/0,41               | 1,99/0,11               | 1,66/0,16            |
| <b><math>\chi^2</math></b>                | 0,99                 | 1,00                    | 0,77                    | 0,82                 |
| <b>R<sup>2</sup></b>                      | 0,92                 | 0,82                    | 0,97                    | 0,93                 |

Valores gerados em Probit, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (concentração letal para 50 e 90, respectivamente) são expressos em mg/mL de extrato (mínimo – máximo). Determinado. para 24 e 48 h pós-exposição.

Conforme ilustrado na Figura 9, podemos observar alterações morfológicas nas larvas L4 de ambas as espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, que foram observadas pós-exposição ao extrato. Podemos visualizar a redução do comprimento da larva, escurecimento da cutícula (melanização), estreitamento das paredes intestinais (atividade na membrana peritrófica) e despregamento do intestino da cutícula.

Figura 9 - Alterações nos aspectos morfológicos das larvas tratadas com EAQA.



A - Controle (*Aedes aegypti*); B - Controle (*Aedes albopictus*); C - Tratamento (*Aedes aegypti*); D - Tratamento (*A. albopictus*); E - Cabeça e tórax (*A. aegypti*); F - Cabeça e tórax (*A. albopictus*); G - Intestino e sifão (*A. aegypti*); H - Intestino e sifão (*A. albopictus*).

#### 4.4.2 Atividade pupicida

Uma vez que as pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus* não se alimentam, ensaios pupicidas foram realizados para identificar se o EAQA apresenta toxicidade por contato e se o extrato é tóxico apenas por ingestão (larvicida e não pupicida). Na tabela 4 são apresentados os resultados dos ensaios pupicidas com as concentrações letais a 50% e 90% e das pupas para ambas as espécies de insetos. EAQA

apresentou valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (mg/mL) para pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, obtidos, respectivamente, em 24 h [0,50 e 1,5 mg/mL (Inclinação/SE = 2,68/0,08,  $\chi^2$  = 0,27 e R<sup>2</sup> = 0,85); 1,13 e 2,26 mg/mL (Inclinação/SE = 4,24/0,06,  $\chi^2$  = 0,79 e R<sup>2</sup> = 0,99) ] e 48 h [0,37 e 1,04 mg/mL (Inclinação/SE = 2,83/0,07,  $\chi^2$  = 0,31 e R<sup>2</sup> = 0,90); 0,83 e 1,34mg/mL (Inclinação/SE = 4,54/0,07,  $\chi^2$  = 0,80 e R<sup>2</sup> = 1,00) ] pós-exposição (Tabela 2). Conforme visto, EAQA também apresenta atividade pupicida para ambas as espécies, porém em concentrações letais superiores às observadas na atividade larvicida (Tabela 1).

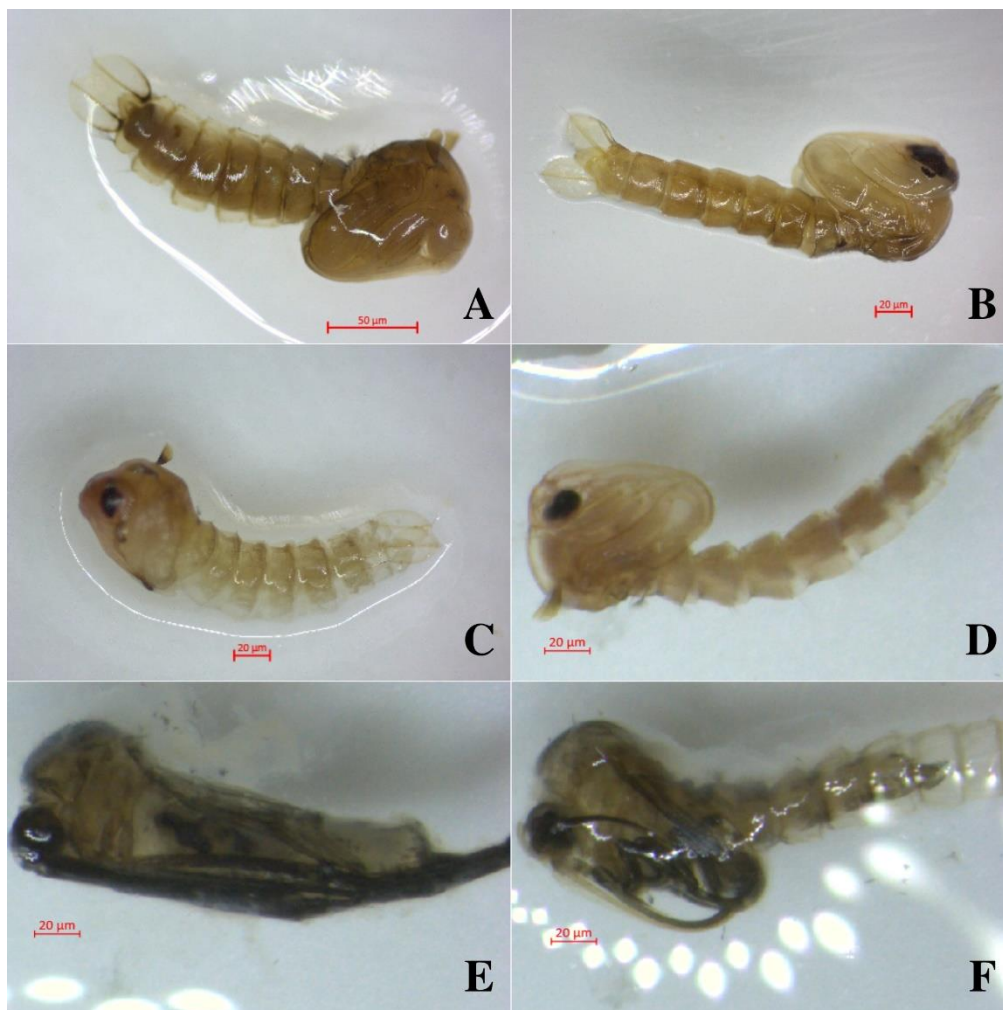
**Tabela 2-** Determinação das concentrações letais de EAQA (extrato aquoso a quente de angico) contra pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

|                                           | <i>Aedes aegypti</i>  |                       | <i>Aedes albopictus</i> |                        |
|-------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
|                                           | 24 h                  | 48 h                  | 24 h                    | 48 h                   |
| <b>CL<sub>50</sub></b><br><b>(IC 95%)</b> | 0,50<br>(0,36 – 0,71) | 0,37<br>(0,26 – 0,51) | 1,13<br>(0,84 – 1,50)   | 0,83<br>(0,52 – 0,94)  |
| <b>CL<sub>90</sub></b><br><b>(IC 95%)</b> | 1,5<br>(1,08 – 2,12)  | 1,04<br>(0,74 – 1,46) | 2,26<br>(1,70 – 2,92)   | 1,34<br>(01,00 – 1,80) |
| <b>Inclinação</b><br><b>(SE)</b>          | 2,68/0,08             | 2,83/0,07             | 4,24/0,06               | 4,54/0,07              |
| <b><math>\chi^2</math></b>                | 0,27                  | 0,31                  | 0,79                    | 0,80                   |
| <b>R<sup>2</sup></b>                      | 0,85                  | 0,90                  | 0,99                    | 1,00                   |

Valores gerados em Probit, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Os valores de CL<sub>50</sub>, e CL<sub>90</sub> (concentração letal para 50 e 90%, respectivamente) são expressos em mg/mL de extrato (mínimo – máximo). em todos os casos, para 24 e 48 h pós-exposição, respectivamente.

A figura 10 destaca as alterações morfológicas induzidas nas pupas expostas ao extrato EAQA, em comparação ao controle (pupas expostas à água destilada) de pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Detectou-se alguma mudança na morfologia (estrutura e tamanho) e no comportamento do nado, as pupas expostas ao extrato se movimentavam mais lentamente, durante a emergência do inseto adulto ouve interferia no processo de muda e ele não completava a emergência, além de mudança de coloração da cutícula como podemos observar na figura 10.

Figura 10 - Alterações nos aspectos morfológicos das pupas tratadas com EAQA



A - Controle (*Aedes aegypti*); B - Controle (*Aedes albopictus*); C - Tratamento/pupa morta (*A. aegypti*); D - Tratamento/pupa morta (*A. albopictus*); E – Mosquito morto durante a muda (*A. aegypti*); F – Mosquito morto durante a muda para fase adulta (*A. albopictus*).

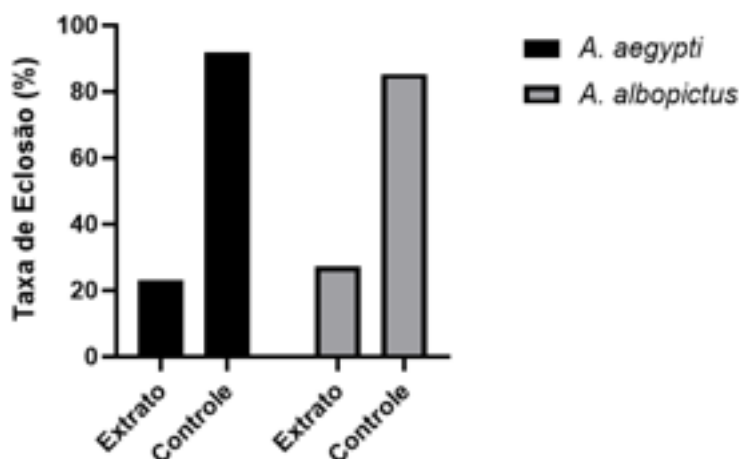
#### 4.4.3 Atividade adúltica

Devido a indisponibilidade de insetos adultos de *A. albopictus* e o número diminuto de adultos de *A. aegypti* em idade adequada para realização do ensaio adúltica, optamos por realizar os ensaios em apenas uma concentração do extrato (equivalente a  $CL_{90}$  larvica de 48 h = 0,26 mg/mL) com adultos de *A. aegypti*. EAQA ocasionou mortalidade de  $100\% \pm 2,48\%$  dos insetos incubados na concentração 0,26 mg/mL e a mortalidade dos insetos incubados no controle negativo do ensaio (água destilada) foi de  $1\% \pm 0,3$ .

#### 4.4.4 Atividade ovicida

Conforme ilustrado na Figura 11, EAQA inviabilizou a eclosão das larvas de ambas as espécies em torno de 74%, registrando-se um percentual de eclosão de  $24,6\% \pm 1\%$  dos ovos de *A. aegypti* e de  $26,5\% \pm 3\%$  dos ovos de *A. albopictus* após 10 dias de exposição. O teste de eclosão foi analisado a cada 24 h por um período de 96 h, a qual, no teste foram eclodidas 35 larvas de um total de 150 ovos para *A. aegypti* no período total do teste. Já no teste com *A. albopictus* eclodiram 41 larvas de 150 ovos no período de 96 h. Já no controle eclodiram 138 de um total de 150 ovos. Além disso, das larvas que eclodiram no teste com o extrato, apenas  $25,7\% \pm 1,0\%$  chegaram a fase adulta. O experimento foi feito em triplicata, a qual cada replicata continha 50 ovos.

Figura 11 - Análise de taxa de eclosão do extrato aquoso a quente de *A. colubrina*.



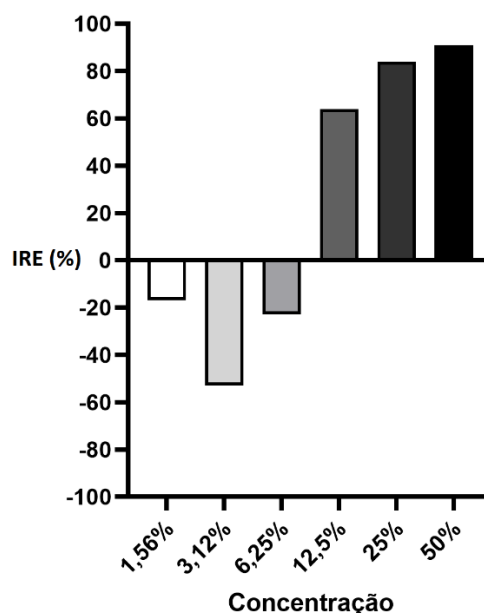
Análise da taxa de eclosão (%) com o extrato de *A. colubrina* na concentração de 0,26 mg/mL com ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus*.

#### 4.4.5 Atratividade/repelência para a postura das fêmeas de *A. aegypti* em condições de laboratório

Os ensaios de atratividade/repelência para oviposição foram realizados com adultos de *A. aegypti*, com a intenção de investigar o potencial de EAQA sob diferentes concentrações. Conforme ilustrado na Figura 12, as três maiores concentrações de

EAQA (50%, 25% e 12,5%, v/v, equivalentes a 17,25, 8,6 e 4,31 mg/mL do extrato, respectivamente) mostraram-se eficazes em repelir as fêmeas, sob efeito repelente para oviposição, com IRE positivo de 91%, 84% e 64%, respectivamente. Já as três menores concentrações de EAQA (6,25%, 3,12% e 1,56%, v/v, equivalentes a 2,15, 1,0 e 0,53 mg/mL do extrato, respectivamente) mostram-se como potenciais agentes atrativos para oviposição, com IRE negativo de 23%, 53% e 17%, respectivamente. Portanto, o extrato apresentou efeito duplo, foi atrativos em concentrações baixas e em concentrações mais altas ele repeliu.

Figura 12 - Índice de repelência efetiva (IRE) do extrato a quente de *A. colubrina* com efeito duplo (atrativo e repelente) para as fêmeas grávidas de *A. aegypti* em laboratório.



(IRE): O índice obtido é interpretado como uma correlação, com intervalo de -100 a +100, sendo que os valores negativos representam atração e os positivos, repelência.

#### 4.4.6 Ensaios de campo de interferência de postura das fêmeas de *Aedes*

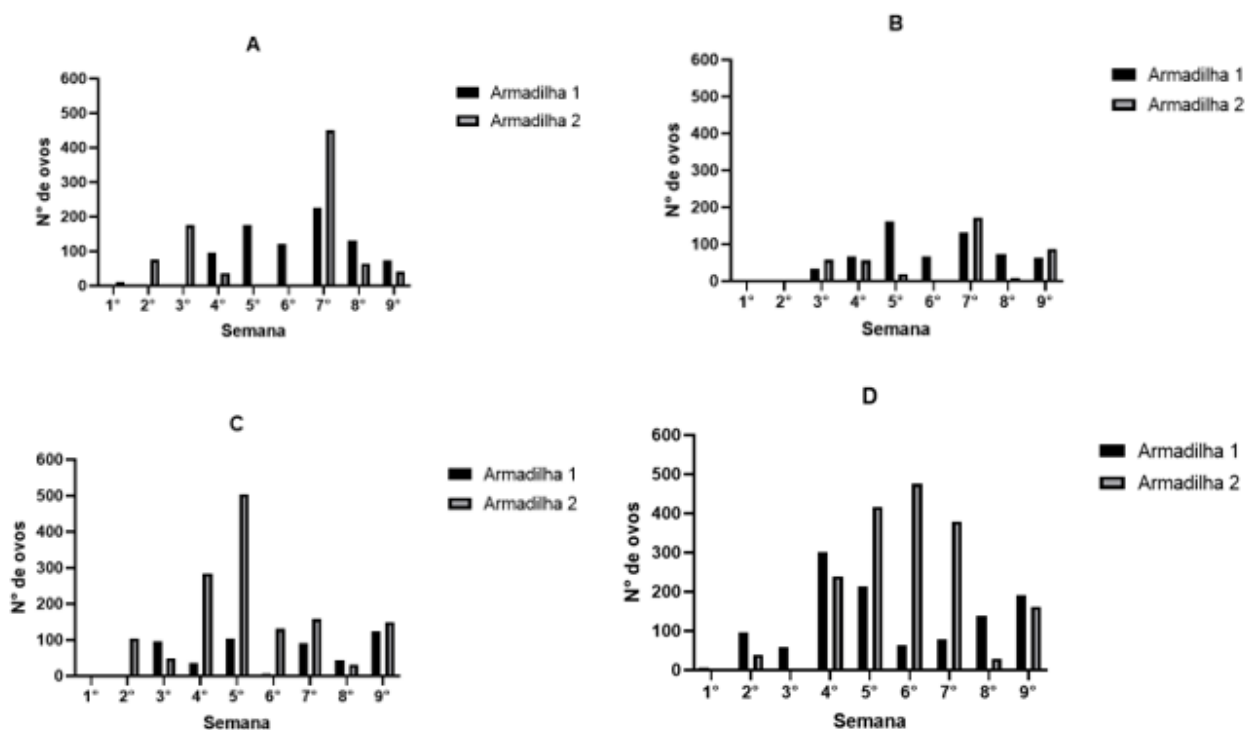
Durante as nove semanas de estudo, foram contabilizados 7.487 ovos, distribuídos em 72 palhetas. Nas primeiras seis semanas de observação do ensaio foram coletados 4.395 ovos, equivalente a 48 palhetas depositadas nas ovitrampas

contendo água (controle). Os ovos foram distribuídos da seguinte maneira: 699 ovos no ponto A (OPI = 83,33%; EDI = 69,9), 468 ovos no ponto B (OPI = 83,33%; EDI = 46,8), 1.317 ovos no ponto C (OPI = 100%; EDI = 109,75), e 1.911 ovos no ponto D (OPI = 91,66%; EDI = 173,72).

Da sétima semana até a nona semana 3.092 ovos ( $n = 24$  palhetas) foram contados em ovitrampas distribuídas em dois grupos de 12, um contendo água (controle) e outro contendo o EAQA (0,26 mg/mL,  $CL_{90}$  larvicida de 48 horas). Os ovos foram distribuídos da seguinte forma: 984 ovos no ponto A (OPI = 100%; EDI = 164), 533 ovos no ponto B (OPI = 100%; EDI = 88,83), 598 ovos no ponto C (OPI = 100%; EDI = 99,66) e 977 ovos no ponto D (OPI = 100%; EDI = 162,83). Observando a Figura 13, nas ovitrampas contendo EAQA (teste), podemos constatar que não houve uma redução da postura de ovos, com 1.732 ovos (56% dos ovos das 3 últimas semanas) ( $n = 12$  palhetas). ao longo das três semanas (Ponto A: 556 ovos, OPI = 100 % e EDI=185,33; Ponto B: 267 ovos, OPI = 100% e EDI = 89; e Ponto C: 339 ovos, OPI = 100% e EDI = 113; Ponto D: 570 ovos, OPI = 100% e EDI = 190), já nas ovitrampas contendo apenas água foram contados 1.360 ovos (44% dos ovos das 3 últimas semanas) ( $n = 12$  palhetas) (Ponto A: 428 ovos, OPI = 100% e EDI = 142,6; Ponto B: 266 ovos, OPI = 100% e EDI= 88,66; e Ponto C: 259 ovos, OPI = 100% e EDI = 86,33 e Ponto D: 407 ovos, OPI = 100% e EDI = 135,66), com esses resultados podemos inferir que o extrato possui potencial atrativo para atrair fêmeas grávidas de mosquitos do gênero *Aedes* para a oviposição.

Conforme representado na Figura 13 e 14, a contagem semanal de ovos postos revelou a eficácia de EAQA na atratibilidade na primeira aplicação, pois o número de ovos foi maior que nas ovitrampas sem a adição de extrato, no entanto, nas duas semanas seguintes houve a redução dos ovos nas ovitrampas com o EAQA, a qual o número de ovos se equiparou aos das ovitrampas contendo apenas água.

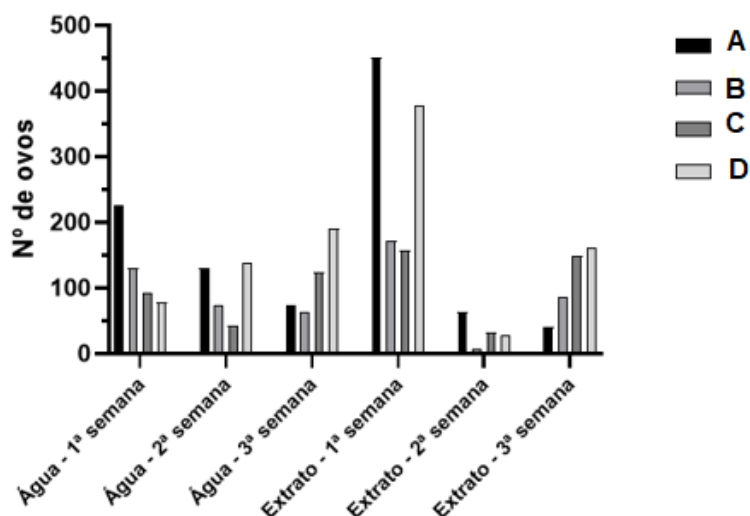
Figura 13 – Análise da influência do extrato EAQA (extrato aquoso a quente de angico) no perfil de oviposição de *Aedes*, em quatro pontos de infestação.



A, B, C e D: quatro pontos de alta circulação de *Aedes* em Mossoró - RN, Brasil. Armadiilha 1 continha apenas água durante todo o experimento, enquanto a armadilha 2 teve água substituída por EAQA após a sétima semana de observação.

Conforme representado na Figura 14, a contagem semanal de ovos postos revelou a eficácia de EAQA na atratibilidade na primeira aplicação, pois o número de ovos foi maior que nas ovitrampas sem a adição de extrato, nas duas semanas seguintes houve a redução dos ovos nas ovitrampas com o EAQA, a qual o número de ovos se equiparava ao das ovitrampas apenas com água.

Figura 14- Resultado das 3 últimas semanas do teste de atratibilidade/repelência do EAQA em campo.



Teste de campo do EAQA com a CL<sub>90</sub> (0,26 mg/mL) A, B, C e D: quatro pontos de alta circulação de *A. aegypti*, em Mossoró-RN, Brasil. Em cada ponto continha duas armadilhas, 1 continha apenas água e a armadilha 2 o EAQA, o gráfico mostra o resultado das 3 últimas semanas do experimento, quando foi iniciado o teste com extrato, é chamado de 1ª semana a (7 semana de experimento), 2ª semana (8 semana de experimento) e 3ª semana (9 e última semana de experimento).

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

### 4.5.1 Caracterização bioquímica inicial

O processo de extração promoveu o rendimento de 54,16% de massa de extrato (EAQA), equivalentes a um peso médio 34,5 mg de componentes sólidos para cada 1,0 mL do extrato bruto. As condições de extração favoreceram a obtenção de um extrato (EAQA) com uma promissora concentração de teores de carboidratos totais (15,50 mg/mL  $\pm$  0,06), correspondendo a 45% da massa do extrato, em comparação aos teores de proteínas solúveis totais (2,02 mg/mL  $\pm$  0,05) e de compostos fenólicos totais (0,10 mg/mL  $\pm$  0,02), correspondendo a 5,85% e 0,29% da massa do extrato respectivamente, os resultados podem ser observado na tabela 3.

Tabela 3 - Determinação do teor de carboidratos, compostos fenólicos, proteínas solúveis, peso seco e rendimento do extrato de *Anadenanthera colubrina* (EAQA).

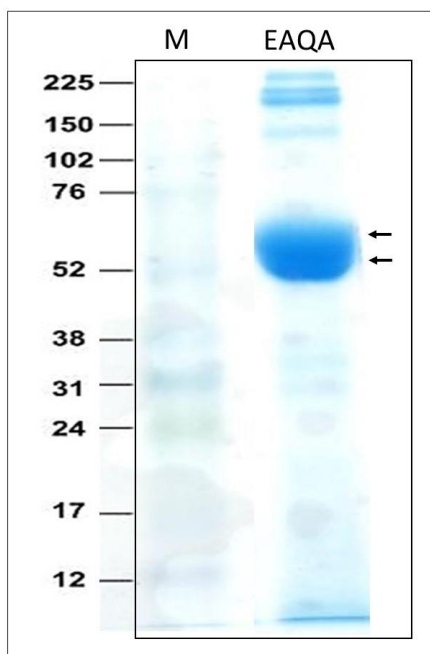
| <b>Caracterização Bioquímica<br/>Parcial</b>  | <b>EAQA</b>  |
|-----------------------------------------------|--------------|
| <b>Rendimento (%)</b>                         | 54,16        |
| <b>Peso seco recuperado (g)</b>               | 27,08 ± 0,08 |
| <b>Proteínas solúveis totais<br/>(mg/mL)</b>  | 2,02 ± 0,05  |
| <b>Carboidratos totais (mg/mL)</b>            | 15,5 ± 0,06  |
| <b>Compostos fenólicos totais<br/>(mg/mL)</b> | 0,100 ± 0,02 |

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, exceto rendimento, com três repetições (n=3). As dosagens dos teores de carboidratos, fenólicos e proteínas são expressas para concentração de extrato bruto em mg/mL.

A caracterização dos componentes que compõem o extrato se faz importante tendo em vista a necessidade de identificar os possíveis compostos que estão proporcionando a atividade Aedicida, com isso tendo em vista que plantas possuam diversas proteínas com ação anti-herbivória se fez importante analisar a composição proteica do extrato.

Análises eletroforéticas de EAQA (Figura 15) revelam que o extrato possui uma baixa diversidade de bandas proteicas, com a distribuição de bandas proteicas no intervalo de massas moleculares compreendido entre 38 e 230 kDa, com duas bandas predominantes em torno de 65 e 74 kDa. As equações da reta e cálculos para estimativa das massas moleculares das proteínas do extrato estão presentes nos anexos 1 e 2.

Figura 15 - Perfil eletroforético das proteínas detectadas em EAQA (extrato aquoso a quente de Angico), obtido por SDS-PAGE (12%).



(M): Marcador molecular (225 a 12 kDa); EAQA: extrato aquoso a quente de angico (10  $\mu$ g de proteínas). As setas indicam as bandas predominantes.

Dentre as proteínas expressas em EAQA, as análises evidenciam que os métodos empregados na obtenção do extrato contribuíram para a concentração de inibidores de proteases cisteínicas e serínicas, com potencial inibitório da atividade catalítica das enzimas tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína, cujo resultado é apresentado na Tabela 4. O extrato EAQA inibiu a atividade proteolítica da enzima bromelaína em  $90,94\% \pm 0,06$ , e inibiu a atividade proteolítica das enzimas papaína ( $68,75\% \pm 0,01$ ) e tripsina ( $68,93\% \pm 0,08$ ) em percentuais superiores a 68%. No entanto, apresentou baixa atividade inibitória para a enzima quimiotripsina ( $9,32\% \pm 0,04$ ). Já o teste de hemaglutinação não identificaram a presença de lectinas, nas condições de ensaio. No entanto, não realizamos os ensaios na presença de íons.

Tabela 4 – Detecção de inibidores da atividade proteolítica de proteases cisteínicas e serínicas em EAQA (extrato a quente de angico)

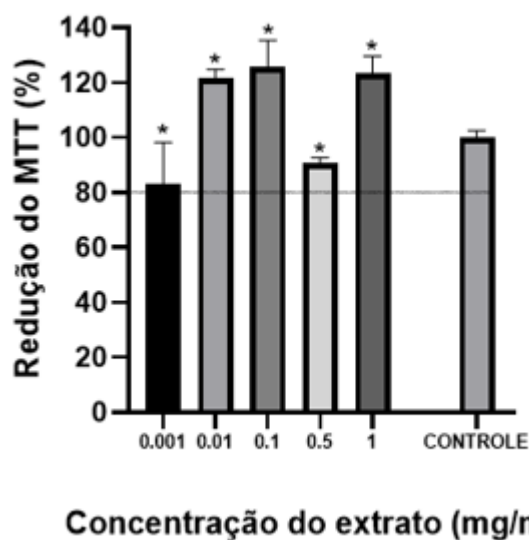
| Enzimas               | Índices                                                 | Valores |
|-----------------------|---------------------------------------------------------|---------|
| <b>Bromelaína</b>     | Inibição da atividade proteolítica (expresso em %)      | 90,94   |
|                       | Unidade inibitória (expresso em UI)                     | 32,47   |
|                       | atividade específica (expresso em UI.mg <sup>-1</sup> ) | 64,93   |
|                       | Desvio padrão                                           | 0,06    |
| <b>Papaína</b>        | Inibição da atividade proteolítica (expresso em %)      | 68,75   |
|                       | Unidade inibitória (expresso em UI)                     | 10,27   |
|                       | atividade específica (expresso em UI.mg <sup>-1</sup> ) | 20,53   |
|                       | Desvio padrão                                           | 0,01    |
| <b>Quimiotripsina</b> | Inibição da atividade proteolítica (expresso em %)      | 9,32    |
|                       | Unidade inibitória (expresso em UI)                     | 1,10    |
|                       | atividade específica (expresso em UI.mg <sup>-1</sup> ) | 2,20    |
|                       | Desvio padrão                                           | 0,04    |
| <b>Tripsina</b>       | Inibição da atividade proteolítica (expresso em %)      | 68,93   |
|                       | Unidade inibitória (expresso em UI)                     | 14,20   |
|                       | atividade específica (expresso em UI.mg <sup>-1</sup> ) | 28,40   |
|                       | Desvio padrão                                           | 0,08    |

Os valores são apresentados como média dos índices, com três repetições (n=3).

#### 4.5.2 Avaliação da citotoxicidade

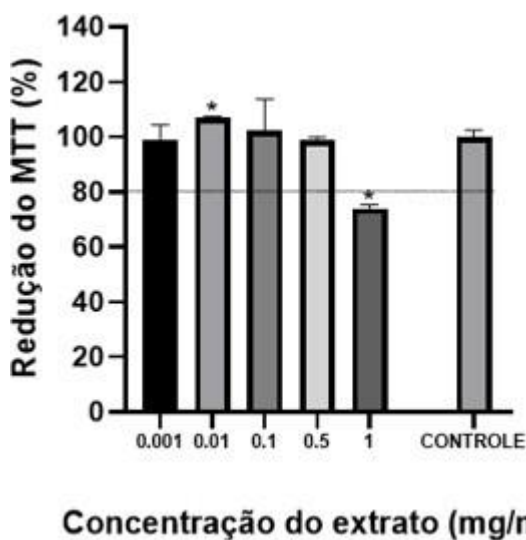
A citotoxicidade de EAQA foi investigada em cultura de células, registrando que o extrato, aparentemente, não compromete a viabilidade celular de linhagens celulares de fibroblastos murinos (3T3) e hepatócitos humanos (HepG2) sob concentrações específicas. Conforme ilustrado na Figura 16, as concentrações de EAQA testadas parecem não comprometer a viabilidade celular de HepG2, sugerindo uma possível compatibilidade hepática do extrato. No entanto, a concentração de 0,001 mg/mL desperta uma preocupação ao reduzir a viabilidade celular de HepG2 a um percentual de 80%, com diferença estatística do controle ( $P = 0,0085$ ). Quando investigado em 3T3, o extrato EAQA aparenta não comprometer a atividade metabólica desta linhagem celular entre o intervalo de concentrações de 0,001 a 0,5 mg/mL. A concentração de 1,0 mg/mL foi estatisticamente diferente do controle ( $P = 0,0001$ ) ao reduzir a viabilidade celular de 3T3 em percentuais inferiores a 80% (Figura 17).

Figura 16 – Avaliação da citotoxicidade de EAQA (extrato aquoso quente de angico) em linhagens celulares de hepatócitos humanos (HepG2).



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com três repetições ( $n=3$ ). (\*): significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre a concentração do extrato e o controle do ensaio.

Figura 15– Avaliação da citotoxicidade do EAQA por análise da interferência na viabilidade de fibroblastos murinos (3T3).



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com três repetições ( $n=3$ ). (\*): significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre a concentração do extrato e o controle do ensaio.

### 4.5.3 Avaliação da ecotoxicidade

Análises dos resultados dos ensaios de ecotoxicidade nos organismos aquáticos *Ceriodaphnia dubia* e *Mysidopsis juniae* revelam que EAQA promoveu a letalidade em ambas as espécies testadas (Tabela 5). Com base nos intervalos de confiança de 95%, EAQA apresentou CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>(mg/mL) obtidos em 24 h (0,72 e 2,02 mg/mL, Inclinação/SE = 1,60/0,12  $\chi^2 = 0,78$  e  $R^2 = 0,89$ ) e 48 h (0,42 e 1,16mg/mL, Inclinação/SE = 2,45/0,99,  $\chi^2 = 0,00$  e  $R^2 = 0,49$ ) pós-exposição para de *C. dubia*. Em relação aos ensaios com nauplios de *M. juniae*, os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (mg/mL) obtidos em 24 h foram, respectivamente 0,87 e 3,1 mg/mL (Inclinação/SE = 1,70/0,12  $\chi^2 = 0,81$  e  $R^2 = 0,96$ , e os valores obtidos em 48 h foram, respectivamente, 0,87 mg/mL e 1,7 mg/mL (Inclinação/SE = 2,77/0,09,  $\chi^2 = 0,53$  e  $R^2 = 0,99$ ). Esses dados sugerem que o extrato EAQA pode ser bem tolerado por organismos aquáticos em intervalos de concentrações específicas.

**Tabela 5** – Avaliação da ecotoxicidade de EAQA (extrato aquoso aquecido de angico) em organismos aquáticos não-alvo, *Ceriodaphnia dubia* e *Mysidopsis juniae*.

|                                           | <i>Ceriodaphnia dubia</i> |                       | <i>Mysidopsis juniae</i> |                       |
|-------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
|                                           | 24 h                      | 48 h                  | 24 h                     | 48 h                  |
| <b>CL<sub>50</sub></b><br><b>(IC 95%)</b> | 0,72<br>(0,48 – 1,02)     | 0,42<br>(0,32 – 0,74) | 0,87<br>(0,33 – 1,00)    | 0,87<br>(0,23 – 0,94) |
| <b>CL<sub>90</sub></b><br><b>(IC 95%)</b> | 2,02<br>(1,16– 4,82)      | 1,6<br>(1,1– 2,47)    | 3,1<br>(1,88 – 5,67)     | 1,7<br>(0,98– 02,05)  |
| <b>Inclinação</b><br><b>(SE)</b>          | 1,60/0,12                 | 2,45/0,99             | 1,70/0,12                | 2,77/0,09             |
| <b><math>\chi^2</math></b>                | 0,78                      | 0,00                  | 0,81                     | 0,53                  |
| <b>R<sup>2</sup></b>                      | 0,89                      | 0,49                  | 0,96                     | 0,99                  |

Valores gerados em Probit, com intervalo de confiança de 95%. Os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (concentração letal para 50 e 90 %, respectivamente) são expressos em mg/mL de extrato (mínimo – máximo em todos os casos, para 24 e 48 h pós-exposição, respectivamente).

## 5 DISCUSSÃO

O *Aedes aegypti* é um mosquito fortemente adaptado para viver em torno de humanos em uma configuração doméstica e devido a adaptação das espécies ao repasto em humanos associada a alta densidade das populações em ambiente urbano, o que favorece o aumento de infestação do mosquito. Porém, *A. aegypti* não se encontra só na busca por presa para o repasto, o *A. albopictus* também é encontrado em ambientes urbanos e suas proximidades, o que proporciona o aumento de doenças que são transmitidas por esses vetores (RUBIO *et al.*, 2020; BUCHWALD *et al.*, 2020).

O *A. aegypti* é considerado o vetor mais eficiente do vírus da dengue mesmo em baixas densidades (YALWALA *et al.*, 2015; NDENGA *et al.*, 2017; ST. JOHN; GUBLER, 2021; CHAVDA *et al.*, 2022). No entanto, em alguns países, o mosquito *A. albopictus* também pode transmitir o DENV e promover surtos de dengue e de outras arboviroses (RATSITORAHINA *et al.*, 2008). Apesar dos esforços realizados para o controle e manejo desses vetores com o uso de inseticidas químicos e monitoramento de infestações, o aumento da incidência de arboviroses nas últimas décadas indica que o uso dessas estratégias não tem alcançado êxito no controle desses vetores. Além disso, a administração indiscriminada de inseticidas químico tem evidenciado o surgimento de resistência a inseticidas nos vetores (LIMA *et al.* 2006; CHEDIAK *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2018; ABBASI *et al.*, 2022; SILALAH *et al.*, 2022). Portanto, devido à alta incidência de casos de doenças que são transmitidas por esses vetores, se faz necessário a busca e utilização de métodos complementares que possam ajudar a controlar e manejar esses insetos associada a busca por vacinas e intervenções medicamentosas para estas arboviroses.

Assim, extratos de plantas com atividade contra insetos vetores vêm se revelando promissores para a produção de novos inseticidas, dos quais muitos componentes já foram isolados, identificados e comercializados (COSTA *et al.*, 1999; CORRÊA; SALGADO, 2011; REZENDE, 2013; PAVELA; BENELLI, 2016; ISMAN, 2020; REEGAN *et al.*, 2021; EMAM *et al.*, 2021; SENGUL DEMIRAK; CANPOLAT, 2022; SNEHA *et al.*, 2022; ALBUQUERQUE *et al.*, 2022). E diversos trabalhos vêm propondo o controle do vetor *A. aegypti*, por meio do uso de compostos derivados da flora brasileira (SANTHOSH *et al.*, 2015; FRANÇA *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2022).

O uso de extratos vegetais para a produção de inseticidas mostra-se vantajoso, uma vez que a produção é realizada de forma simples, com baixo desperdício de matéria prima, além dos extratos vegetais possuírem diferentes biomoléculas que podem agir conjuntamente, retardando e/ou impossibilitando o surgimento de organismos resistentes, evento comum para os inseticidas sintéticos empregados atualmente (BENELLI *et al.*, 2016; FRANÇA *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2021).

Os métodos de extração dos compostos vegetais são diversos e podem influenciar diretamente no desempenho da sua atividade. Entre os solventes empregados podemos destacar a água, tampão fosfato de sódio, etanol, acetona entre outros (PARTHIBAN *et al.*, 2021). A extração aquosa pode trazer benefícios no uso contra *A. aegypti*, por esse inseto ter grande parte de seu ciclo de vida em ambiente aquático, portanto, moléculas hidrossolúveis poderão estar melhor biodisponíveis para o contato e consequente efeito sobre as larvas do inseto (CHAGAS, 2016). No entanto, extratos obtidos com tampões salinos também têm apresentado bons resultados, sem interferência do sal na atividade larvicida (BARBOSA *et al.*, 2014; CHAGAS, 2016).

Além disso, a eficácia dos extratos depende de sua composição, já que os extratos de plantas são combinações bastante complexas de biomoléculas, onde parte das quais apresentam atividade biocida contra insetos de forma isolada, mas que também podem ter sua eficácia inseticida associada a relações sinérgicas entre esses compostos (PAVELA *et al.*, 2019a, 2019b). Adicionalmente, as combinações de compostos nos extratos, podem contribuir para evitar o desenvolvimento de populações resistentes a substâncias ativas dos extratos por apresentarem diferentes modos de ação, resultando em um impacto inseticida mais duradouro (PAVELA, 2014). Tais combinações de compostos larvicidas botânicos podem se tornar formulações eficazes e ainda servir de base para o desenvolvimento de misturas complexas pela indústria química.

O extrato aquoso a quente de Angico (EAQA) de acordo com os resultados apresentados na tabela 1, é um promissor agente larvicida. Quando comparado com extratos cetônicos de partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae), EAQA apresentou valores similares de CL<sub>50</sub> para larvas de *A. aegypti* (CL<sub>50</sub> = 0,12 mg/mL para 24 h) e *A. albopictus* (CL<sub>50</sub> = 0,25 mg/mL para 24 h) (RODZAY; ZUHARAH, 2021). Por outro lado, apresentou atividade larvicida mais ativa (com CL<sub>50</sub> menor) que os

extratos obtidos por Barbosa *et al.* (2014), incluindo os extratos salinos de sementes de *A. colubrina* ( $CL_{50} = 2,90$  mg/mL para 24 h). Provavelmente, as condições de extração de EAQA tenham promovido uma alteração na composição e/ou quantidade de componentes larvicidas do extrato, de modo a favorecer a ocorrência da atividade larvicida em concentrações menores para EAQA, quando comparado às extrações salinas de Barbosa *et al.* (2014).

As larvas de *Aedes* se alimentam usando modos comportamentais típicos de navegação e filtragem, podendo navegar para a superfície de seus criadouros quando detritos alimentares atrativos são oferecidos (SKIFF; YEE, 2014). Dessa maneira, é possível vislumbrar o desenvolvimento de formulações larvicidas à base de EAQA e administrá-las em criadouros artificiais presentes em ambientes urbanos e silvestres, considerando a diversidade de habitats de *A. aegypti* e *A. albopictus*. É interessante que essa formulação também comprometa outros estágios do desenvolvimento dos insetos.

Portanto, e considerando as recomendações da OMS para inseticidas naturais (WHO, 2005), foi definido que 0,26 mg/mL seria a concentração diagnóstica para determinação dos efeitos inseticidas de EAQA nos demais estágios de desenvolvimento dos insetos, em condições de laboratório e de campo. Os ensaios larvicidas representam uma estratégia eficaz para controle de espécies filtradoras, como aquelas do gênero *Aedes*, pois os indivíduos em estágio larval ficam restritos em um ambiente propício a intervenções antropogênicas (SÁ *et al.*, 2022b). Embora a maioria dos estudos sobre a influência da imunidade dos insetos na transmissão de patógenos estejam focados no estágio adulto do inseto, é importante considerar a influência do estágio larval na competência do vetor, pois as larvas ingerem continuamente micróbios da água de reprodução e, portanto, podem ser expostas a uma variedade de elicitores imunológicos durante o desenvolvimento (COON; BROWN; STRAND, 2016).

Com o intuito de conhecer o mecanismo de ação do extrato, analisamos a capacidade do extrato aquoso das sementes *A. colubrina* em contribuir no controle da população do *A. aegypti* e *A. albopictus* afetando outras fases do ciclo de vida dos vetores. As pupas assim como as larvas compreendem uma fase aquática do ciclo de vida dos insetos do gênero *Aedes*, e podem ser atingidas por inseticidas solúveis ou em suspensão nesse meio (BARBOSA *et al.*, 2014; SOONWERA;

PHASOMKUSOLSIL, 2017). Análises dos resultados dos ensaios pupicidas (Tabela 2) sugerem que além de larvicida o extrato possui a capacidade de reduzir a sobrevivência das pupas. Diferente das larvas, as pupas de *Aedes* não se alimentam (SOUZA *et al.*, 2011; FUJIWARA *et al.*, 2017; SENTHIL-NATHAN, 2020). No extrato salino de sementes de *A. colubrina* obtido por Barbosa e colaboradores (2014) não foi detectada atividade pupicida. As pupas diferentes das larvas não se alimentam, e quando o extrato mostra atividade pupicida isso pode indicar que a ação se dá por meio da absorção dos compostos tóxicos através da superfície corporal, podendo causar diversas anomalias morfológicas que interferem na sobrevivência, maturação e emergência de adultos (SOUZA *et al.*, 2011; FUJIWARA *et al.*, 2017; SENTHIL-NATHAN, 2020; DA SILVA SÁ *et al.*, 2022).

Na literatura há poucos estudos que apontam eficácia de extratos vegetais contra pupas, mas quando colocado em nanopátículas pode aumentar o potencial desses extratos (BARABADI *et al.*, 2019). Inseticidas que afetam essa fase do ciclo biológico do mosquito, geralmente provoca deformidades na pupa, comprometimento do sistema respiratório e mudanças no comportamento da pupa, aumento do cefalotórax, diminuição do tamanho da pupa, má formação das asas e escurecimento do abdome (BARBOSA *et al.*, 2014; CHANTAWEE E SOONWERE, 2018; ROMANO *et al.*, 2018; DA SILVA SÁ *et al.*, 2022). As  $CL_{50}$  do extrato obtidas para as atividades pupicidas foram em concentrações maiores do que as observadas nos bioensaios larvicida, reforçando o indicativo de que o modo de ação larvicida por ingestão dos compostos bioativos é diferente do provável modo de ação dos compostos envolvidos na atividade pupicida, a qual apresentou pigmentação da cutícula (melanização), deformação do mosquito que impedem os mosquitos de emergir, como mostrados na figura 10.

Dentre os órgãos e tecidos vegetais a semente é uma estrutura rica em compostos bioativos, pois este órgão além de conter o embrião e ser responsável por nutrí-lo para o desenvolvimento de uma nova planta (indivíduo), possuem substâncias para protegê-lo da ação de insetos pragas e patógenos (MARGIS-PINHEIRO, *et al.*, 1999 apud CHAGAS, 2006). Assim, com o uso da semente de *A. colubrina* com a extração aquosa a quente promovemos a extração de proteínas solúveis de 2,02 mg/mL. Essa concentração de proteínas é considerada baixa (5,85%) para os teores de proteínas encontrados nas sementes de leguminosas, mas pode estar relacionada

a forma de extração empregada, uma vez, que o teor proteico do extrato depende do órgão da planta avaliado e da metodologia de extração usada. Observou-se também a presença de inibidores de proteases (Tabela 4), principalmente para bromelaína (90,94%), papaína (68,93%), tripsína (68,75%) e em menor proporção para quimiotripsina (9,32%). O extrato apresentou uma considerável quantidade de carboidratos totais, de 15,5 mg/mL sendo o equivalente a 45% do soluto total do EAQA. Por outro lado, os teores de compostos fenólicos foram os menores (0,1 mg/mL) (Tabela 4).

As deformações morfológicas identificadas nas larvas e pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus* pós-exposição ao extrato EAQA podem estar relacionadas aos mecanismos de ação já descritos para vários agentes larvicidas e pupicidas (FUJIWARA *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2018; SOONWERA *et al.*, 2022; SÁ *et al.*, 2022a). Anormalidades morfológicas nas formas imaturas de insetos podem ser o resultado do interrompimento de seu equilíbrio endocrinológico, bem como do comprometimento da musculatura do inseto (FALLATAH; KHATER, 2010; CHOWAŃSKI *et al.*, 2016). Além disso, alguns tipos de extratos vegetais podem afetar os padrões de natação das larvas e pupas, induzindo o deslocamento dos indivíduos para a superfície para realizar a respiração (SILVÉRIO *et al.*, 2020), comportamento registrado nos ensaios realizados.

Por sua vez, também testamos a atividade ovicida na concentração da CL<sub>90</sub> de 48 horas obtidas na atividade larvicida e observamos atividade ovicida acima dos 70% e uma taxa de eclosão larval abaixo dos 30% (Figura 11). Em 1998, os pesquisadores Su e Mulla analisaram a atividade ovicida de um metabólito secundário (Azadiractina) de sementes, contra insetos *Culex quinquefasciatus* e verificaram que os produtos da planta contra os mosquitos testados possuem potencial ovicida. Barbosa e colaboradores (2014) constataram a atividade ovicida de várias sementes de plantas da caatinga, e mais recentemente outros pesquisadores, verificaram que extratos de sementes podem impedir a eclosão de larvas (SILVA *et al.*, 2021). Portanto o extrato obtido a quente de semente de *A. colubrina* mostra-se promissor para controlar populações aquáticas de *Aedes* nos três estágios de desenvolvimento.

Foi constatada também a morte de insetos adultos que se alimentaram com o EAQA na concentração de 0,26 mg/mL, no entanto essa abordagem usada nos ensaios não é viável para aplicação em campo, pois nos ensaios os insetos são

estimulados a se alimentam do EAQA em virtude de essa ser a única dieta açucarada disponível na gaiola. Em condições de campo há muitas opções de alimento para esses insetos, sendo uma variável de difícil controle. Entretanto, esse ensaio é importante para avaliarmos a ação do extrato sobre os adultos, e futuramente podemos desenvolver outras metodologias para sua aplicabilidade adúltica considerando as possibilidades sugeridas pelas Diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2012).

Os ensaios de repelência/atratibilidade em laboratório foram realizados para averiguar o potencial de atrair ou repelir o *Aedes* para oviposição, as ovitrampas tratadas com as concentrações de 6,25% (2,15 mg/mL), 3,12% (1,0 mg/mL) e 1,56% (0,53 mg/mL) apresentaram atividade atrativa para a postura dos ovos pelas fêmeas grávidas (IRE negativos 23%, 53% e 17%, respectivamente), esse efeito é interessante para a produção de iscas-armadilhas para as fêmeas de *A. aegypti*, pois além de promover a atração para a oviposição também há atividade larvicida nessa faixa de concentração. Nas concentrações 50% (17,25 mg/mL), 25% (8,6 mg/mL), e 12,5% (4,31 mg/mL) (IRE positivo de respectivamente 91%, 84% e 64%) o EAQA mostrou atividade repelente ou deterrente de forma dose dependente. Portanto, verificamos que o extrato apresenta ação atrativa à postura em concentrações mais baixas, e repelente em concentrações mais altas.

Uma das maiores críticas às pesquisas de desenvolvimento de inseticidas naturais é sobre a pouca reprodutibilidade dos resultados em condições de campo. Visando ampliar o repertório dos estudos disponíveis e investigar o comportamento de EAQA sobre a oviposição das fêmeas de *Aedes*, a análise dos resultados dos testes de campo (Figura 14) sugerem que o extrato exerça um efeito atraente para oviposição em ambientes urbanos com alta incidência de *A. aegypti*.

A escolha de criadouros por fêmeas adultas para postura de ovos ocorre por influência de fatores visuais, tácteis e olfatórios (CHITOLINA *et al.*, 2016; QUIROZ-MARTINEZ *et al.*, 2017; AZEEM *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2020; VELAN *et al.*, 2021; DIENG *et al.*, 2022). Em relação às armadilhas contendo EAQA, verificou-se alterações na aparência do extrato no decorrer do experimento com alteração da cor, espessura do extrato e odor. Essas alterações podem ser determinantes para a preferência das fêmeas, no que compete a oviposição, uma vez que já é conhecido

que estes insetos têm preferência por locais com determinadas características sensoriais (MELO *et al.*, 2020).

Esses resultados oferecem possibilidades para produção de armadilhas com incorporação de EAQA em palhetas de forma a agir em conjunto com os atuais sistemas de manejo de vetores. Para tanto, espera-se que as fêmeas grávidas de *Aedes* sejam atraídas até as armadilhas contendo EAQA, oviponham os ovos e, quando as larvas eclodirem na solução contendo o extrato, este promova a morte dos indivíduos, em função de sua atividade larvicida. Já há diversas aplicações usando extratos botânicos com atividade atraente ou repelente aplicados ao desenvolvimento de roupas, mosquiteiros, aplicação em beirais de casas, nas redes de esgoto (SILVA SÁ *et al.*, 2022).

Os extratos de plantas são combinações complexas de biomoléculas, onde parte das quais apresentam atividade biocida contra insetos de forma isolada, mas que também podem ter sua bioatividade derivada da associação desses compostos (PAVELA *et al.*, 2019a, 2019b). Da caracterização bioquímica inicial de EAQA, demarcou-se uma abundância de carboidratos, em comparação aos teores de proteínas solúveis e compostos fenólicos. Em especial, a concentração de proteínas no extrato foi considerada baixa por se tratar de uma semente de leguminosa, pois este órgão é uma estrutura rica em proteínas (ELAMINE *et al.*, 2022). Uma explicação para essa observação pode ser estar relacionada ao método de extração empregado, que empregar água como solvente não solubilizaria proteínas insolúveis em meio aquoso e por ser um método a quente pode promover desnaturação por e precipitação de parte das proteínas reduzindo o conteúdo de proteínas solúveis totais.

No entanto, mesmo com a inserção de condições limitantes na extração, como o aquecimento – que é indutor da desnaturação proteica –, observou-se a presença de inibidores de proteases (Tabela 4), principalmente inibidores da atividade proteolítica das enzimas bromelaína, papaína, tripsina e, em menor proporção, quimiotripsina (GUARNEIRE *et al.*, 2019). Os inibidores de protease agem inibindo a digestão de proteínas essenciais para a nutrição dos insetos, levando à não disponibilidade de aminoácidos para seu crescimento e desenvolvimento, resultando na morte dos indivíduos (SHAMSI *et al.*, 2018; PRAKASH, KORMATH; MEETHAL, 2020; FELIX *et al.*, 2021; APARNA *et al.*, 2021). Embora as proteases cisteínicas não sejam a classe majoritária de proteases do intestino médio de *Aedes*, e sim proteases

serínicas, os inibidores de proteases cisteínicas detectados em EAQA podem estar influenciando em outras funções relacionadas ao desenvolvimento dos insetos, pois esses inibidores são capazes de inibir proteases presentes em muitos insetos e nematoides (HAQ; ATIF; KHAN, 2004; LIMA; DOS REIS; DE SOUZA, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2016).

É possível que outras proteínas com atividade bioinseticida possam ser expressas em EAQA, mesmo que numa intensidade de difícil quantificação. Semelhante aos nossos resultados, França e colaboradores (2021) também não detectaram a presença de lectinas nos extratos de sementes de *A. colubrina*, mas registraram a presença de inibidores de  $\alpha$ -amilase e vicilinas com potencial entomotóxico para *Callosobruchus maculatus*.

Análises eletroforética do extrato (Figura 14) apontam a presença de bandas proteicas no intervalo de massas moleculares compreendido entre 38 e 230 kDa, com duas bandas predominantes em torno de 65 e 74 kDa. Esse intervalo de bandas majoritário é similar ao descrito por França *et al.* (2021) no extrato de sementes de *A. colubrina*. Os autores do estudo identificaram a expressão de uma vicilina tetramérica, denominada AcV, composta por subunidades proteicas de 41, 43, 70 e 73 kDa e 1,55% de carboidratos. As vicilinas são proteínas de reserva, que correspondem a 70-80% das proteínas em sementes de leguminosas (ATEEQ *et al.*, 2022), mas também agem como proteína de defesa contra agentes fúngicos e insetos (UCHÔA *et al.*, 2006; CÂNDIDO *et al.*, 2011; WARSAME; O'SULLIVAN; TOSI, 2018; MIRANDA *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2021; SAEED *et al.*, 2021). Além disto, há evidências que mostram que as vicilinas têm a capacidade de se ligar a estruturas formadas por quitina da superfície do intestino de larvas de insetos, promovendo a sua ação inseticida por interferir na homeostase da absorção intestinal (FRANÇA *et al.*, 2021; SAEED *et al.*, 2022). Portanto, a presença de bandas proteicas correspondentes as vicilinas encontradas por França e colaboradores (2021) pode indicar a sua participação como um dos componentes ativos do EAQA.

Um estudo de revisão recente (DELICES *et al.*, 2023) sobre os aspectos fitoquímicos de *A. colubrina* revelou a identificação de 56 compostos para a espécie, como compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides e alcaloides. Dentre eles, os autores mencionam a anadantoflavona, que é exclusiva desta espécie, além da bufotenina, que foi isolada das sementes. No melhor de nossas buscas, não foram

identificados estudos sobre a caracterização dos carboidratos presentes na espécie vegetal, o que dificulta a discussão dos resultados. Embora a identificação e isolamento dos possíveis compostos detentores da bioatividade seja interessante para determinação do mecanismo de ação inseticida, as combinações de compostos bioativos nos extratos podem retardar o desenvolvimento de resistência nos insetos por apresentarem diferentes modos de ação, resultando em um efeito mais duradouro (PAVELA, 2014).

Em adição à sua bioatividade, os extratos inseticidas não devem estimular eventos tóxicos em organismos não-alvo, incluindo o homem e outras espécies não visadas, para ser considerados pela OMS (WHO, 2005). Apesar de os extratos vegetais serem biodegradáveis, a investigação de sua toxicidade e biossegurança deve sempre ser analisada antes de sua recomendação ou incorporação em programas de manejo de vetores (BENELLI, 2016; MAHESWARAN *et al.*, 2019; FERRAZ *et al.*, 2022). Visando iniciar os ensaios de Fase II das diretrizes da OMS para larvicidas naturais (WHO, 2005), o potencial cito- e ecotóxico de EAQA foi investigado.

Os efeitos de EAQA sobre a atividade metabólica de linhagens celulares HepG2 (hepatócitos humanos) e 3T3 (fibroblastos murinos) sugerem a compatibilidade celular do extrato no intervalo de concentrações com as atividades biológicas analisadas (Figura 15 e 16). HepG2 é uma linhagem celular padrão ouro para estudos de hepatocompatibilidade devido seus aspectos morfofuncionais e metabólicos possuírem semelhanças com as dos hepatócitos não transformados (KRISHNAN *et al.*, 2020). A linhagem celular 3T3 também é amplamente utilizada em diversos protocolos de segurança como modelo para estudo de citotoxicidade (TAM *et al.*, 2020).

De maneira semelhante, EAQA, aparenta ser bem tolerado pelos microcrustáceos *C. dubia* e *M. juniae* (Tabela 5), sugerindo sua baixa ecotoxicidade para esses modelos biológicos. Os microcrustáceos foram selecionados com base na versatilidade de seus ambientes aquáticos, considerando uma abordagem por ensaios com organismos que possam compartilhar o mesmo habitat com estágios imaturos de *A. aegypti* e *A. albopictus*. O presente ensaio também considerou o fato de a região Nordeste do Brasil possuir vários ambientes dulcícolas e uma grande área costeira, na qual resíduos de inseticidas poderiam ser lixiviados até esses ecossistemas.

*Ceriodaphnia dubia* é um modelo animal muito usado para estudos de ecotoxicidade de inseticidas por apresentar alta sensibilidade a contaminantes químicos (SHEN *et al.*, 2012). Enquanto *M. juniae* é um organismo de estuários, ecossistemas de alta diversidade, e ambiente ecologicamente importante por atuar como um berçário de diversas espécies marinhas (ARAUJO; CEDENO-MACIAS, 2016). Em comparação aos resultados descritos por Barbosa e colaboradores (2014), nota-se que o método de extração empregado na obtenção de EAQA possibilitou uma redução significativa da toxicidade do extrato para os microcrustáceos.

Embora os efeitos tóxicos de EAQA sejam mínimos na concentração bioativa sugerida (0,26 mg/mL), o uso de equipamentos de segurança pessoal ainda é recomendado na administração do extrato, além de outras medidas de proteção humana e ambiental. É importante considerar que a metodologia empregada na obtenção de EAQA, por aquecimento a temperatura de 80 °C, pode favorecer a concentração de biomoléculas termoresistentes no extrato. Assim, espera-se que as propriedades inseticidas de EAQA persistam em ambientes com temperaturas elevadas, como aquelas de países tropicais. Destaca-se ainda que a produção do extrato demandou poucos recursos laboratoriais e teve baixo desperdício de matéria prima. Por fim, o seu uso pode representar uma interessante estratégia para o desenvolvimento de tecnologias para convivência no Semiárido, reconhecendo a valorização dos componentes florísticos da Caatinga, um ecossistema ainda tão negligenciado.

Com o advento da pandemia do COVID-19, alguns experimentos ficaram inviáveis e não foi possível realizá-los. Portanto, temos como perspectivas futuras a ampliação da caracterização bioquímica do extrato; a produção de novos extratos das sementes, proveniente, de outras formas de extração visando a comparação da sua bioatividade e eficiência; além da produção de um protótipo de produto comercial inseticida, uma proposta coordenada pelo mestrando Pedro Vítor Vale Bezerra, aprovada para Fase 2 do Edital nº 004/2022 do Programa Nacional de Apoio à Geração de Empreendimentos Inovadores – Programa Centelha 2 RN, na área de Biotecnologia e Genética.

## 6 CONCLUSÃO

O extrato aquoso a quente de sementes de *Anadenanthera colubrina* (EAQA) é um promissor agente ovicida, larvicida e pupicida a ser considerado no manejo de populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A combinação dos componentes bioativos do EAQA pode proporcionar seu potencial inseticida por diversos modos de ação, interferindo nos diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos. Em condições de campo, o EAQA atuou como um atraente de oviposição para fêmeas adultas de *Aedes*.

O EAQA nas condições testadas não interferiu na atividade metabólica de linhagens celulares HepG2 (hepatócitos humanos) e 3T3 (fibroblastos murinos), além de não comprometer o desenvolvimento de *Ceriodaphnia dubia* e *Mysidopsis juniae*, sugerindo sua biossegurança por compatibilidade celular e ecotóxica.

Assim, os dados disponibilizados sugerem o extrato EAQA como uma fonte promissora de bioativos para aplicação em formulações para o controle de *A. aegypti* e *A. albopictus*, importantes insetos vetores de arbovírus.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. et al. Monitoring of synthetic insecticides resistance and mechanisms among malaria vector mosquitoes in Iran: A systematic review. **Heliyon**, v. 8, n. 1, p. e08830, jan. 2022.
- ABDULLAHI, I. N., ANKA, A. U., EMERIBE, A. U., UMAR, K., ADEKOLA, H. A., UZAIKUE, L., OKWUME, C. C. The interplay between environmental factors, vector competence and vaccine immunodynamics as possible explanation of the 2019 yellow fever re-emergence in Nigeria. **New Microbes and New Infections**, 41, 100858; 2021.
- ABDULLAHI, I. N., ANKA, A. U., EMERIBE, A. U., UMAR, K., ADEKOLA, H. A., UZAIKUE, L., OKWUME, C. C. The interplay between environmental factors, vector competence and vaccine immunodynamics as possible explanation of the 2019 yellow fever re-emergence. **New Microbes and New Infections**, 41, 100858. in Nigeria, 2021.
- ABNT – NBR 13373- **método de ensaio com *Ceriodaphnia dubia* (Crustácea Cladóceras)** / 2005.
- ABNT, Associação Brasileira de Normalização Técnica - ABNT. NBR 15308: **Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade Aguda - Método de Ensaio com Misídeos (Crustáceos)**. 2011.
- ABREU, F. V. S. DE et al. Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 218–231, jan. 2019.
- ACHEE, N. L. et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006822, 3 jan. 2019.
- ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 11 abr. 2018.
- AHMADU, T., AHMAD, K. Uma Introdução aos Produtos Naturais Bioativos e Aplicações Gerais. Em: Pal, D., Nayak, AK (eds) Produtos Naturais Bioativos para

Aplicações Farmacêuticas. Advanced Structured Materials. **Springer**, Cham, vol. 140, 2021.

AKKASAENG, R. Evaluation of trees and shrubs for forage and fuelwood in Northeast Thailand. *Int. Tree Crops Journal*, v.5, n.4, p.209- 220, 1989.

AL-MEKHLAFI, F. A. Larvicidal, ovicidal activities and histopathological alterations induced by *Carum copticum* (Apiaceae) extract against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 52–56, 1 jan. 2018.

ALAVEZ-ROSAS, D., SOCORRO-BENITEZ, C. & CRUZ-ESTEBAN, S. Efeito repelente e adulticida de misturas de óleos essenciais em fêmeas de *Aedes aegypti*. **Int J Trop Insect Sci**, 42, 1885-1892, 2022.

ALBUQUERQUE, I.G.C; MARANDINO, R.; MENDONÇA, A. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; VASCONCELOS, P. F. C.; GUERRA, L. R.; BRANDÃO, B. C.; MENDONÇA, A. P. P.; AGUIAR, G. R.; DE BACCO, A. P. A. M. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 45(1):128-129, 2012.

ALBUQUERQUE, Isabella Gomes Cavalcanti de et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n. 3, p. 325-354, 2007.

ALI, A. *et al.* Mathematical modeling for the transmission potential of Zika virus with optimal control strategies. **The European Physical Journal Plus**, v. 137, n. 1, jan. 2022.

ALI, H; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. a-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.

ALI, W. N. W. M, *et al.* Distribuição espacial, atividade enzimática e status de resistência a inseticidas de *Aedes Aegypti* e *Aedes Albopictus* de áreas de hotspots de dengue em Kuala Lumpur e Selangor, Malásia. **Serangga** 25 , 65-92 (2020).

ALLGEIER, S.; KÄSTEL, A.; BRÜHL, C. A. Adverse effects of mosquito control using *Bacillus thuringiensis* var. israelensis: Reduced chironomid abundances in mesocosm, semi-field and field studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 786–796, mar. 2019.

ALONSO, A. C. *et al.* Abiotic factors affecting the prevalence of Wolbachia (Rickettsiaceae) in immature *Aedes albopictus* (Skuse) (Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107730, 4 fev. 2022.

ALVES, W. C. L; GORAYEB, I. S; LOUREIRO, E. C. B. Bactérias isoladas de culicídeos (Diptera: Nematocera) hematófagos em Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 131-142, 2010.

AMARASINGHE, L. D. *et al.* Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, v. 6, n. 6, 27 jun. 2020.

AMORIM, M.P. Anadenanthera in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrb.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18071>. Acesso em: 14 maio 2017.

AMORIM, Ticiania Maria Lúcio de. Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de *Erythrina velutina* em enzimas digestivas e membrana peritrófica de larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular) - **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2007.

AMRUTHA, M., SHIJI, T. M., MEETHAL, K. V. As serina proteases representam a protease predominante no intestino das larvas do mosquito *Culex pipiens*. **Revista Internacional de Pesquisa em Entomologia**. 3(1):92-94, 2018.

ANJOS, R. O. et al. Transmission of Chikungunya Virus in an Urban Slum, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 7, p. 1364–1373, jul. 2020.

ANTOWIJOYO, W., TANAMAS, S. K., NURHAYA, T. I. I., SETYAWAN, S., BUDIWATI, N., FITRIANA, I., et al. *Aedes aegypti* perfis de abundância e resistência a inseticidas no ensaio Aplicando Wolbachia para Eliminar a Dengue. **PLoS Negl Trop Dis** .16(4): e0010284, 2022.

APARNA. N, PARAMBIL, R. P., GEORGE, N., MEETHAL, K. V. Toxicity of plant extracts containing trypsin inhibitor to the larvae of *Aedes aegypti*. **International Journal of Mosquito Research**, v. 8, n. 3, p. 22–27, 1 maio 2021.

ARAUJO, C. V., CEDENO-MACIAS, L. A. Metais pesados em atum albacora (*Thunnus albacares*) e doirado comum (*Coryphaena hippurus*) desembarcados na costa equatoriana. Sci. **Ambiente Total**. 541, 149-154. 2016.

ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* L. R. K. Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 134–140, jul. 2018.

ARRUDA, C. C. L. et al. CdTe-GSH as luminescent biomarker for labeling the larvicidal action of WSMoL lectin in *Aedes aegypti* larvae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 187, p. 110672, mar. 2020.

ARYA, S. K.; SHIVA, S.; UPADHYAY, S. K. Entomotoxic Proteins from Plant Biodiversity to Control the Crop Insect Pests. **Bioprospecting of Plant Biodiversity for Industrial Molecules**, p. 15–52, 25 jun. 2021.

ARYA, S. K.; SHIVA, S.; UPADHYAY, S. K. Entomotoxic Proteins from Plant Biodiversity to Control the Crop Insect Pests. **Bioprospecting of Plant Biodiversity for Industrial Molecules**, p. 15–52, 25 jun. 2021.

ATEEQ, M. et al. In Silico Analysis and Functional Characterization of Antimicrobial and Insecticidal Vicilin from Moth Bean (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal) Seeds. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3251, 19 maio 2022.

AUNGTIKUN, J.; SOONWERA, M. Improved adulticidal activity against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) from synergy between *Cinnamomum* spp. essential oils. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4685, 25 fev. 2021.

AVERETT, E. et al. Evaluation of West Nile virus education campaign. **Evaluation**, 2005.

AYLLÓN, T. et al. Dispersion and oviposition of *Aedes albopictus* in a Brazilian slum: Initial evidence of Asian tiger mosquito domiciliation in urban environments. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195014, 23 abr. 2018.

AYLLÓN, T. et al. Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1411–1412, 1 ago. 2017.

AZEEM, M. et al. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111609, nov. 2019.

BACA, S. F. et al. Estudio experimental de la “Coquera” en caprinos. *Revta Fac. Med. Vet.*, v. 18, n. 20, p. 131-159, 1967.

BALA, R., ROHIT, S.M., SHARMA, K., WANGOO, N. A supersensitive silver nanoprobe based aptasensor for low cost detection of malathion residues in water and food samples. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol.* 196, 268–273, 2018.

BANGS, M. J., e FOCKS, D. A. “Chave de identificação abreviada de pupa para os Mosquitos comuns reprodutores de contêineres no sudeste Asiático urbano”, **Journal of the American Mosquito Control Association**. 22(3), 565-572, 1 de setembro de 2006.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, dez. 2007.

BARABADI, H. et al. Nanobiotechnology as an emerging approach to combat malaria: A systematic review. *Nanomedicine: Nanotechnology, **Biology and Medicine***, v. 18, p. 221–233, 1 jun. 2019.

BARABADI, H., ALIZADEH, Z., RAHIMI, M.T., BARAC, A., MARAOLO, A.E., ROBERTSON, L.J., MASJEDI, A., SHAHRIVAR, F. AND AHMADPOUR, E. (2019). Nanobiotechnology as an emerging approach to combat malaria: A systematic review. *Nanomedicine: Nanotechnology, **Biology and Medicine***, [online] 18, pp.221–233. doi:10.1016/j.nano.2019.02.017.

BARBI, L. et al. Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. ***The Brazilian Journal of Infectious Diseases***, v. 22, n. 2, p. 137–141, mar. 2018.

BARBOSA, P. B. B. M., DE OLIVEIRA, J. M., CHAGAS, J. M., RABELO, L. M.A., DE MEDEIROS, G. F., GIODANI, R. B., SANTOS, E. A., UCHÔA, A. F., XIMENES, M. F. F. M. Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. ***Parasitology Research***, v. 113 (10): 3565-3580, 2014.

BARGIELOWSKI, I. E.; LOUNIBOS, L. P. Satyrization and satyrization-resistance in competitive displacements of invasive mosquito species. ***Insect Science***, v. 23, n. 2, p. 162–174, 18 jan. 2016.

BARIK, M. et al. Evaluation of mosquito larvicidal activity of fruit extracts of *Acacia auriculiformis* against the Japanese encephalitis vector *Culex vishnui*. ***Natural Product Research***, v. 33, n. 11, p. 1682–1686, 19 fev. 2018.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, MARIA, G.. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. ***Estudos avançados***, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BATTISTI, V.; URBAN, E.; LANGER, T. Antivirals against the Chikungunya Virus. ***Viruses***, v. 13, n. 7, p. 1307, 5 jul. 2021.

BAZ; BOIVIN. Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. ***Pharmaceuticals***, v. 12, n. 3, p. 101, 29 jun. 2019.

BEERNTSEN, B.T; JAMES, A. A; CHRISTENSEN, B.M. "Genetics of Mosquito Vector Competence." **Microbiol Mol Biol.** v. 64, n.1, p,115-137, 2000.

BELOUSOVA, M. E., MALOVICHKO, Y. V., , SHIKOV, A. E., NIZHNIKOV, A. A., EKIRILL S. ANTONETS. I. Dissecting the Environmental Consequences of *Bacillus thuringiensis* Application for Natural Ecosystems. **Toxins**, v. 13, n. 5, p. 355, 16 maio 2021.

BENEDICT, M. Q. et al. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 1, p. 76–85, mar. 2007.

BERTONCELI, M. A. A., Proteínas com potencial inseticida de sementes de *Clitoria fairchildiana*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia)- Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, **Campos Dos Goytacazes** – RJ. p. 67. 2018.

BEZERRA, R. P.; CONNIFF, A. S.; UVERSKY, V. N. Comparative study of structures and functional motifs in lectins from the commercially important photosynthetic microorganisms. **Biochimie**, v. 201, p. 63–74, out. 2022.

BHANDARI, G. et al. Ecological risk assessment of pesticide residues in soils from vegetable production areas: A case study in S-Nepal. **Science of The Total Environment**, v. 788, p. 147921, set. 2021.

BHARDWAJ, U., PANDEY, N., RASTOGI, M., & SINGH, S. K. (2021). Gist of Zika virus pathogenesis. *Virology*, 560:86-95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.04.008>.

BHATNAGAE, M.R.B; KEATING, M.K et al., Notes from Field: Evidence of Zika Virus Infection in brain and placente tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses- Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 65, 2016.

BHATT, P. et al. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 17–32, 24 nov. 2020.

BONIZZONI, M. et al. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 9, p. 460–468, set. 2013.

BORDALO, M. D., GRAVATO, C., BELEZA, S., CAMPOS, D., LOPES, I., PESTANA, J. L. T. Lethal and sublethal toxicity assessment of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *Beauveria bassiana* based bioinsecticides to the aquatic insect *Chironomus riparius*. **Science of The Total Environment**, v. 698, p. 134155, 1 jan. 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. V. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADY, O. J.; HAY, S. I. The global expansion of dengue: how *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. **Annual Review of Entomology**, v.65, n.1, p.191-208, 2020.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 16(2):113-118, 2007a.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismo de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 16(4):279-293, 2007b.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 16(4):279-293, out-dez, 2007.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 12 abr. 2016.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Vol.53 Nº34: Monitoramento dos casos de arboviroses até a SE 35 de 2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 12p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022>. Acesso em 04 Out. 2022.

BRITO, C. A. A. DE. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585–589, set. 2017.

BRITO, C. A. A. D. (2017). Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 50(5):585-589. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0479-2016>

BRITO FERREIRA, M. L., Pessoa Militao de Albuquerque, M. D. F., Antunes de Brito, C. A., de Oliveira Franca, R. F., Porto Moreira, A. J., de Moraes Machado, M. I., & Solomon, T. (2020). Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: a prospective observational study. **Lancet Neurology**, 19(10), 826-839. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30232-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30232-5).

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. T. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. e75, 18 maio 2007.

BUSTAMANTE AMADOR, J. et al. West Syndrome in Children With Congenital Zika Virus Infection. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. Publish Ahead of Print, 27 jul. 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Febre amarela: Sintomas, Tratamento, Diagnóstico e Prevenção**. 2013/2020. Disponível em<<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>>acessado em: 06 julho 2022).

BRASIL, Secretaria de atenção à saúde, Ministério da Saúde. Febre Amarela. In Guia Para Profissionais da Saúde, 1st ed.; **Ministry of Health of Brazil**: Brasília, Brazil, 2019.

CABRAL, E. L; BARBOSA, D.C.A; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth e Hook. f. ex.s. Moore. **Acta Botanica Brasileira**, v. 17, n.4, p. 609-617, 2003.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.

CARDOSO, C. W., PAPLOSKI, I. A., KIKUTI, M., RODRIGUES, M. S., SILVA, M. M., CAMPOS, G. S., ... & RIBEIRO, G. S. (2015). Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(12): 2274-2276. <https://doi.org/10.3201%2Fcid2112.151167>.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: A Case of Mistaken Identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. XXVI, n. 3, p. 243–262, 1971.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Toxic plant proteins with insecticidal properties. A review of their potential as bioinsecticides. **Toxicon**, 20: 1519-1539. 2002.

CARRINGTON, L. B. et al. Effects of Fluctuating Daily Temperatures at Critical Thermal Extremes on *Aedes aegypti* Life-History Traits. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58824, 8 mar. 2013.

CARVALHO, R. G. et al. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 787–796, 1 set. 2014.

CARVAJAL-LAGO, L., RUIZ-LÓPEZ, M. J., FIGUEROLA, J., & MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J. (2021). Implications of diet on mosquito life history traits and pathogen transmission. *Environmental Research*, 195:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110893>.

CARVALHO, V. L.; LONG, M. T. Insect-Specific Viruses: An overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. **Virology**, v. 557, p. 34–43, maio 2021.

CARVALHO, V. L. et al. Arbovirus outbreak in a rural region of the Brazilian Amazon. **Journal of Clinical Virology**, v. 150-151, p. 105155, jun. 2022.

CAVALCANTI, V. L. R. et al. *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. **Algal Research**, v. 56, p. 102290, jun. 2021.

CDC. **For Healthcare Providers CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/vaccine/hcp/index.html>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Symptoms and What To Do If You Think You Have Dengue**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html>>.

CHAGAS, J.M. Avaliação do Potencial Inseticida de Extratos Salinos de sementes de Seis Espécies de Plantas (Família Fabaceae) Contra *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) L. Em Diferentes Estágios do Ciclo Biológicos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. Natal, p. 74-84. 2016.

CHAMPAKAEW, D. et al. *Angelica sinensis* (Umbelliferae) with proven repellent properties against *Aedes aegypti*, the primary dengue fever vector in Thailand. **Parasitology research**, v. 114, n. 6, p. 2187-2198, 2015.

CHANG, K. et al. Clinical characteristics and risk factors for intracranial hemorrhage or infarction in patients with dengue. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 5, p. 885–892, out. 2021.

CHAVDA, V. P. et al. Ayurvedic and Other Herbal Remedies For Dengue: An Update. **Clinical Complementary Medicine and Pharmacology**, p. 100024, mar. 2022.

CHEDIAK, M. et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 311–321, 29 abr. 2016.

CHELLAPPANDIAN, M., et al. Volatile toxin of *Limonia acidissima* (L.), efeitos de toxicidade de desenvolvimento, repelentes e adulticidas em *Aedes aegypti* (L.), **Toxin Reviews**, 41:1, 119-128, 2022.

CHEN, M.-Y. et al. Chikungunya infection: First autochthonous cases in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 120, n. 7, p. 1526–1530, jul. 2021.

CHITOLINA, R. F. et al. Raw sewage as breeding site to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, culicidae). **Acta Tropica**, v. 164, p. 290–296, 1 dez. 2016.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004543, 3 mar. 2016.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, 1994, 228p.

COON, K. L., BROWN, M. R., & STRAND, M. R. (2016). Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular ecology*, 25(22), 5806–5826. <https://doi.org/10.1111/mec.13877>.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.

COSTA, J.P.C; ALVES, S.M; BELO, M. Teores de rotenona em clones de Timbó (*Derris* Spp. Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de Imagos em *Musca domestica* L. **Acta Amazônica**, p. 563-573, 1999.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005630, 14 jun. 2017.

COUNOTTE, M. J. et al. Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. **PLOS Medicine**, v. 15, n. 7, p. e1002611, 24 jul. 2018.

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus — reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 707–715, 30 ago. 2016.

CÂNDIDO, S. E. et al. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 10, p. 3290–3305, out. 2011.

DAMBACH, P. The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: opportunities and limitations. **Biological Control**, v.150, p.1-33, 2020.

DANG, L.; VAN DAMME, E. J. M. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, v. 117, p. 51–64, set. 2015.

DANIEL, Pete. Toxic Drift: Pesticides and Health in the Post-World War II South. **LSU Press**, 2007.

DAY, J. Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. **Insects**, v. 7, n. 4, p. 65, 18 nov. 2016.

DE ALMEIDA, B. L. et al. Detection and sequencing of Zika virus in normocephalic newborns with congenital Zika infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 114, p. 128–131, jan. 2022.

DEBRAY H, DECOUT D, STRECKER G, SPIK G, MONTREUIL J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem.* 1981;117(1): 41-55. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06300.x.

DE FATIMA VASCO ARAGAO, M. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 353, p. i1901, 13 abr. 2016.

DE LIMA CAVALCANTI, T. Y. V. et al. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969, 5 maio 2022.

DE MORAES, J. C. et al. A case-control study to determine the effectiveness of a tetravalent dengue vaccine in the state of Paraná, Brazil. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 7, p. 100141, 1 mar. 2022.

DE MOURA, Paula Mendonça et al. O Desmatamento e o Crescimento urbano desordenado no estado do Rio de Janeiro: impactos na dinâmica do Dengue. **Cadernos UniFOA**, n. 24, p. 77-85, 2014.

DE OLIVEIRA, A. A. et al. Larvicidal, adulticidal and repellent activities against *Aedes aegypti* L. of two commonly used spices, *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* L. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 17–24, ago. 2021.

DE, S. et al. Seeking heterocyclic scaffolds as antivirals against dengue virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 240, p. 114576, 5 out. 2022.

DI GIOVANNI, F., WILKE, A.B, BEIER, J. C., POMBI, M, MENDOZA-ROLDAN J. A, DESNEUX N, CANALE A, LUCCHIA, DANTAS-TORRES F, OTRANTO D, BENELLI G. Estratégias parasitárias de artrópodes de importância médica e veterinária. **Entomol Gen**, 41(5):511-522, 2021.

DICK, G. W., KITCHEN, S. F., & HADDOW, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

DIENG, H. et al. Aquatain® causes anti-oviposition, egg retention and oocyte melanization and triggers female death in *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, 22 mar. 2022.

DORZABAN, H. et al. Mosquito surveillance and the first record of morphological and molecular-based identification of invasive species *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae), southern Iran. **Experimental Parasitology**, v. 236-237, p. 108235, maio 2022.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

DUGUMA, D.; RUEDA, L. M.; DEBBOUN, M. Mosquito-Borne Diseases. **Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas**, p. 319–337, 2020.

ELAMINE, Y. et al. Nutritional Characteristics of the Seed Protein in 23 Mediterranean Legumes. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 400, 5 fev. 2022.

EVANS-GILBERT, T. Vertically transmitted chikungunya, Zika and dengue virus infections: The pathogenesis from mother to fetus and the implications of co-

infections and vaccine development. **International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 7, n. 3, p. 107–111, set. 2020.

EZZEMANI, W. et al. Design of a multi-epitope Zika virus vaccine candidate – an in-silico study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–10, 23 mar. 2022.

FALLATAH, S. A. B.; KHATER, E. I. M. Potential of medicinal plants in mosquito control. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 40, n. 1, p. 1–26, 1 abr. 2010.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 24 maio 2017.

FARIAS, Davi F. et al. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 585-594, 2010.

FARAJOLLAHI, A.; PRICE, D. C. A Rapid Identification Guide for Larvae of the Most Common North American Container-Inhabiting *Aedes* Species of Medical Importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 29, n. 3, p. 203–221, set. 2013.

FARIAS, LR; COSTA, FT; SOUZA, LA; PELEGRINI, PB; GROSSI-DE-SÁ, MF; NETO, SM; BLOCH, CJ; LAUMANN, RA; NONHA, EF; FRANCO, OL. Isolamento do novo inibidor de  $\alpha$ -amilase de *Carica papaya* com atividade deletéria para *Callosobruchus maculatus*. **Peste. Bioquímica. Fisiol.**, 87, 255-260, 2007.

FELIX, S. F. et al. Chemical Composition, Larvicidal Activity, and Enzyme Inhibition of the Essential Oil of *Lippia grata* Schauer from the Caatinga Biome against Dengue Vectors. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 250, 10 mar. 2021.

FERNANDES, D. A. et al. Ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e102120–e102120, 26 mar. 2021.

FERNANDES, D. A. et al. Ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e102120–e102120, 26 mar. 2021.

FERNANDES, J. N. et al. Revamping Mosquito-borne Disease Control to Tackle Future Threats. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 5, p. 359–368, maio 2018.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. F. M.; SOARES FILHO, A. M.; CARVALHO, A. A. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. **Ciências e Saúde Coletiva**, 14 (3):961-972, 2009.

FERREIRA, F. C. P. DE A. D. M. et al. Vertical transmission of chikungunya virus: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0249166, 23 abr. 2021.

FERREIRA, G. et al. Pathophysiological and molecular considerations of viral and bacterial infections during maternal-fetal and – neonatal interactions of SARS-CoV-2, Zika, and Mycoplasma infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1868, n. 1, p. 166285, jan. 2022.

FERREIRA, R. S. et al. Insect-specific viruses and arboviruses in adult male culicids from Midwestern Brazil. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104561, nov. 2020.

FERREIRA, S. R. et al. The resistance of the cowpea cv. BRS Xiquexique to infestation by cowpea weevil is related to the presence of toxic chitin-binding proteins. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 173, p. 104782, mar. 2021.

FERREIRA-DE-BRITO, A. et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 10, p. 655-658, out. 2016.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H. et al. The Asian tiger mosquito in Brazil: Observations on biology and ecological interactions since its first detection in 1986. **Acta Tropica**, v. 205, p. 105386, 1 maio 2020. FERRO, D. & PEREIRA, A. M. S. Fitoterapia: Conhecimentos tradicionais e científicos, vol. 1. 1 ed. São Paulo: Bertolucci, p. 81-84, 2018.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016 – 2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1233, 30 out. 2020.

FIOCRUZ/IOF. **Dengue: vírus e vetor**. Disponível em:  
<<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>> Acessado em: 9 fev. 2022.

FOLEGATTI, P. M. et al. A single dose of ChAdOx1 Chik vaccine induces neutralizing antibodies against four chikungunya virus lineages in a phase 1 clinical trial. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 30 jul. 2021.

FONTANA, J. D. et al. Accelerating the Morphogenetic Cycle of the Viral Vector *Aedes aegypti* Larvae for Faster Larvicidal Bioassays. *BioMed Research International*, v. 2020, p. 1–9, 29 ago. 2020. FORATTINI, O. P. *Culicidologia médica*, vol. 2: Identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo: **Editora da Universidade de São Paulo**, 2002.

FOSTER, W. A.; WALKER, E. D. Mosquitoes (Culicidae). **Medical and Veterinary Entomology**, p. 261–325, 2019.

FRANÇA, L. P. et al. Piper capitarianum essential oil: a promising insecticidal agent for the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Environmental Science and Pollution Research**, 6 nov. 2020.

FUJIWARA, G. M. et al. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 238–244, maio 2017.

FRÜH, L. et al. Predation on the invasive mosquito *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) by native copepod species in Germany. **Journal of Vector Ecology**, v.44, p.241-247, 2019.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. bras. malariol.* **Doenças trop**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GALLIAN, P. et al. Epidemiology of Chikungunya Virus Outbreaks in Guadeloupe and Martinique, 2014: An Observational Study in Volunteer Blood Donors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005254, 12 jan. 2017.

GALÁN-HUERTA, K. A. et al. The Zika virus disease: An overview. **Medicina Universitaria**, v. 18, n. 71, p. 115–124, abr. 2016.

GAO, S.; SONG, S.; ZHANG, L. Recent Progress in Vaccine Development Against Chikungunya Virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 19 dez. 2019.

GARCIA, G. DE A. et al. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006227, 12 fev. 2018.

GERIS, R. et al. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.37, p.277-376, 2012.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GODAERT, L. et al. Atypical Clinical Presentations of Acute Phase Chikungunya Virus Infection in Older Adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 65, n. 11, p. 2510–2515, 21 set. 2017.

GODOY, R. S. M. et al. Dengue and Zika virus infection patterns vary among *Aedes aegypti* field populations from Belo Horizonte, a Brazilian endemic city. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11, p. e0009839, 2 nov. 2021.

GOUVEA, L. A. et al. Complications and Sequelae in Patients With Congenital Microcephaly Associated With Zika Virus Infection: Two-Year Follow-Up. **Journal of Child Neurology**, v. 36, n. 7, p. 537–544, 7 jan. 2021.

GROBUSCH, M. P.; CONNOR, B. A. Factors impacting severe disease from chikungunya infection: Prioritizing chikungunya vaccine when available. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 49, p. 102391, set. 2022.

GROBUSCH, M. P.; CONNOR, B. A. Factors impacting severe disease from chikungunya infection: Prioritizing chikungunya vaccine when available. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 49, p. 102391, set. 2022.

GUALBERTO CAVALCANTI, N. et al. IL-27 in patients with Chikungunya fever: A possible chronicity biomarker? **Acta Tropica**, v. 196, p. 48–51, 1 ago. 2019.

GUALBERTO CAVALCANTI, N. et al. Increased serum levels of galectin-9 in patients with chikungunya fever. **Virus Research**, v. 286, p. 198062, set. 2020.

GUARDADO, K. et al. Evaluation of Anomalies and Neurodevelopment in Children Exposed to ZIKV during Pregnancy. **Children**, v. 9, n. 8, p. 1216, 12 ago. 2022.

GUTH, S. et al. Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008338, 13 ago. 2020.

HALSTEAD, S. B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 42, n. 5, p. 311–28, 1970.

HALSTEAD, S.; WILDER-SMITH, A. Severe dengue in travellers: pathogenesis, risk and clinical management. **Journal of Travel Medicine**, v. 26, n. 7, 2019.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, n. 1, p. 145–159, 1 nov. 2004.

HARAMBOURE, M. et al. Modelling the control of *Aedes albopictus* mosquitoes based on sterile males release techniques in a tropical environment. **Ecological Modelling**, v. 424, p. 109002, maio 2020.

HARBACH, R., 2021. **Valid Species | Mosquito Taxonomic Inventory**. Disponível em: <<https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/valid-species-list>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

HARDY, J. L; HOUKEJ, KRAMER, L. D; REEVES, W.C., "Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses." **Ann Rev Entomol**. v, 28. p. 229-262, 1983.

HE, L. et al. A multiple-target mRNA-LNP vaccine induces protective immunity against experimental multi-serotype DENV in mice. **Virologica Sinica**, jul. 2022.

HE, Y., GUO, C., L. V, J. et al. Occurrence, sources, and ecological risks of three classes of insecticides in sediments of the Liaohe River basin, China. **Environ Sci Pollut Res**. 28, 62726–62735, 2021.

HEATH, C. J. et al. Evidence of transovarial transmission of Chikungunya and Dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008362, 19 jun. 2020.

HEGDE, S. S.; BHAT, B. R. Dengue detection: Advances and challenges in diagnostic technology. **Biosensors and Bioelectronics**: X, v. 10, p. 100100, maio 2022.

HERCULANO, P. H. Manutenção de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: culicidae) em condições de laboratório: uma revisão sistemática. Mestrado em Entomologia em Saúde Pública) - **Universidade de São Paulo**. São Paulo, p. 15-24. 2020.

HERRERA, T.; CUBILLA-BATISTA, I.; GOODRIDGE, A. Prenatal imaging for the diagnosis of congenital Zika syndrome. **Medicine: Case Reports and Study Protocols**, v. 3, n. 2, p. e0183, fev. 2022.

HERVÉ, Jean Pierre et al. A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana. **Hiléia méd**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 1985.

HONORIO, N. A. et al. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 5, p. 1-3, mai. 2015.

HUTCHINGS, R.W., SALLUM, M.A.M., HUTCHINGS, R.S.G., 2021. Culicidae. Brazilian Fauna Taxonomic Catalog. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

HWANG, A. Y. et al. Effects of non-traditional extraction methods on extracting bioactive compounds from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compared with hot water extraction. **LWT**, v. 110, p. 80–84, ago. 2019.

IFTIKHAR, M. et al. AI- modelling of molecular identification and feminization of wolbachia infected *Aedes aegypti*. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 150, p. 104–111, jan. 2020.

IREKEOLA, A. A. et al. Global prevalence of dengue and chikungunya coinfection: A systematic review and meta-analysis of 43,341 participants. **Acta Tropica**, v. 231, p. 106408, jul. 2022.

ISMAN, M. B. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise? **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 233–249, 7 jan. 2020.

KRAEMER, M. U., SINKA, M. E., DUDA, K. A., MYLNE, A. Q., SHEARER, F. M., BARKER, C. M., MOORE, C. G., CARVALHO, R. G., COELHO, G. E., VAN BORTEL, W., HENDRICKX, G., SCHAFFNER, F., ELYAZAR, I. R., TENG, H. J., BRADY, O. J., MESSINA, J. P., PIGOTT, D. M., SCOTT, T. W., SMITH, D. L., WINT, G. R., HAY, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, 4:1-18. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. [Physiopathology of chronic arthritis following chikungunya infection in man]. **Medecine tropicale: revue du Corps de sante colonial**, v. 72, p. 86-87, 2012.

JAIN, J., DUBEY, S. K., SHRINET, J., & SUNIL, S. (2017). Dengue Chikungunya co-infection: A live-in relationship??. *Biochemical and biophysical research communications*, 492(4), 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.008>.

JIMÉNEZ DE OYA, N. et al. Low Immune Cross-Reactivity between West Nile Virus and a Zika Virus Vaccine Based on Modified Vaccinia Virus Ankara. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 354, 15 mar. 2022.

JINDRA, M.; BITTOVA, L. The juvenile hormone receptor as a target of juvenoid "insect growth regulators". **Archives of Insect Biochemistry & Physiology**, v.103, n.3, p.1-7, 2020.

JOHANSSON, M. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; STAPLES, J. E. The whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 8, p. 482–487, 30 jun. 2014.

JOHARGY, A. Zika Virus Infection: A Global Health Emergency. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 121–124, 22 jan. 2022.

JONES, R. *et al.* Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: a scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. **PLoS ONE**, v.15, n.2, p.1-17, 2020.

JULIANO, S. A. Introdução e Substituição De Espécies Entre Mosquitos: Competição De Recursos Interespecíficos Ou Competição Aparente? **Ecologia**, v.79, nº1, p. 68-255, Jan. 1998.

KALLAS, E. G. *et al.* Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 839–850, jul. 2020.

KAUR, J., KARIYAT, R. Role of Trichomes in Plant Stress Biology. In: Núñez-Farfán, J., Valverde, P. (eds) Evolutionary Ecology of Plant-Herbivore Interaction. **Springer**, Cham. p. 15–35, 31 jul, 2020.

KAUR, R. *et al.* Spontaneous globe rupture: Unusual ophthalmic manifestation with dengue hemorrhagic shock syndrome. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 25, p. 101297, mar. 2022.

KHONGWICHIT, S., CHANSAENROJ, J., CHIRATHAWORN, C., & POOVORAWAN, Y. (2021). Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. **Journal of biomedical science**, 28(1):1-17. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8>.

KHOR, C. C. et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. **Nature Genetics**, v. 43, n. 11, p. 1139–1141, 1 nov. 2011.

KOCK, A. et al. A lentic microcosm approach to determine the toxicity of DDT and deltamethrin on diatom communities. **Environmental Pollution**, v. 312, p. 120037, 1 nov. 2022.

KONNO, K.; MITSUHASHI, W. The peritrophic membrane as a target of proteins that play important roles in plant defense and microbial attack. **Journal of Insect Physiology**, v. 117, p. 103912, ago. 2019.

KOUL, O.; WALIA, S. Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources**, v.4 (49), p.1–30, 2009.

KRAUER, F. et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. **PLOS Medicine**, v. 14, n. 1, p. e1002203, 3 jan. 2017.

KRIL, V., AÏQUI-REBOUL-PAVIET, O., BRIANT, L., & AMARA, A. (2021). New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. **Annual Review of Virology**, 8(1), 327-347. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-102021>.

KRISHNAN, A.; KOSKI, G.; MOU, X. Characterization of microcystin-induced apoptosis in HepG2 hepatoma cells. **Toxicon**, v.173, p.20-26, 2020.

LABIB, B. A.; CHIGBU, D. I. Pathogenesis and Manifestations of Zika Virus-Associated Ocular Diseases. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 6, p. 106, 15 jun. 2022.

LAMALAKSHMI DEVI, E. et al. Adaptation Strategies and Defence Mechanisms of Plants During Environmental Stress. **Medicinal Plants and Environmental Challenges**, p. 359–413, 2017.

LAMBRECHTS L, SCOTT TW, GUBLER DJ. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4(5), 2010 - 646, 2010.

LEDERMANN, Jeremy P. et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3188, 2014.

LEE, K. A. et al. Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 615–621, abr. 2014.

LEEMANS, M. et al. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 9 dez. 2019.

LEQUIME, S., PAUL, R. E., & LAMBRECHTS, L. (2016). Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. **PLoS pathogens**, 12(5), e1005548. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>

LI, M.X. et al. Repellent, larvicidal and adulticidal activities of essential oil from Dai medicinal plant *Zingiber cassumunar* against *Aedes albopictus*. **Plant Diversity**, v. 43, n. 4, p. 317–323, ago. 2021.

LIMA, A.; DOS REIS, S.; DE SOUZA, C. Phytocystatins and their Potential to Control Plant Diseases Caused by Fungi. *Protein & Peptide Letters*, v. 22, n. 2, p. 104–111, 28 jan. 2015.

LIMA, Maria Goretti Araújo de et al. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

LOISEAU, P. M.; LE BRAS, J. [New drugs against parasitic diseases]. **La Revue du praticien**, v. 57, n. 2, p. 175-182, 2007.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. de A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. 2 ed. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda**, p. 291, 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, v.1, ed.5, 2008.

LUNA, J.S; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M.C.; MENDONCA, F.A.C.; BIEBERA, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.97, p. 199–206, 2005.

LUTZ, A. Reminiscencias da febre amarella no Estado de São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 24, n. 3, p. 127–160, out. 1930.

LUTZ, C.; TAI, M. H. H.; SANTOS, A. H.; SILVA, H. H. G. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103(2):214- 215, 2008.

LWANDE, O. W. et al. Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 2, 26 set. 2019.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X. et al. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 624–634, nov. 2017.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L.X.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E.P.; Heredia, J.B. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. **J. Funct. Foods**. 38, 624–634, 2017.

MAFRA-NETO, A.; DEKKER, T. Novel odor-based strategies for integrated management of vectors of disease. **Current Opinion in Insect Science**, v. 34, p. 105–111, ago. 2019.

MAIA, L. M. S. et al. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 3, p. 437–442, 18 fev. 2019.

MAJOR, C. G. et al. Risk Estimation of Sexual Transmission of Zika Virus—United States, 2016–2017. **The Journal of Infectious Diseases**, 2 abr. 2021.

MANZOOR, K. N. et al. The global emergence of Chikungunya infection: An integrated view. **Reviews in Medical Virology**, 24 ago. 2021.

MARBÁN-CASTRO, E. et al. Zika virus infection in pregnant women and their children: A review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 265, p. 162–168, out. 2021.

MARCONDES, Carlos Brisola. Entomologia médica e veterinária. In: Entomologia médica e veterinária. **Atheneu**, 2001.

MARTIN, J. et al. WHO working group meeting to amend WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines. **Vaccine**, maio 2022.

MARTINEZ, M. et al. Phytocystatins: Defense Proteins against Phytophagous Insects and Acari. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1747, 20 out. 2016.

MASMEJAN, S., MUSSO, D., VOUGA, M., POMAR, L., DASHRAATH, P., STOJANOV, M., ... & BAUD, D. (2020). Zika virus. *Pathogens*, 9(11):1-14. <https://doi.org/10.3390%2Fpathogens9110898>.

MANNINO, M. C. et al. Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. **J. Fungi**, v.5, p.1-9, 2019.

MEDEIROS-SOUSA, ANTÔNIO, R. et al. Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an urban park: larval habitats and temporal variation. **Acta tropica**, v. 150, p. 200-209, 2015.

MELO, I. R. S. et al. CICPI, a cysteine protease inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has antifungal activity against *Candida tropicalis* by inducing disruption of the cell surface. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1115–1124, 15 jul. 2019.

MELO, N., WOLFF, G.H., COSTA-DA-SILVA, A.L., ARRIBAS, R., TRIANA, M. F., GUGGER, M., STENSMYR, M. C. Geosmina atrai mosquitos *Aedes aegypti* para locais de oviposição. **Current Biology**, v. 30(1), ed.5, p.127-134, 2020.

MELO, N., WOLFF, GH, COSTA-DA-SILVA, AL, ARRIBAS, R., TRIANA, MF, GUGGER, M., ... STENSMYR, MC. Geosmin Attracts *Aedes aegypti* Mosquitoes to Oviposition Sites. **Current Biology**, v. 30, n. 1, p. 127-134.e5, 6 jan. 2020.

MERLE, H. et al. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. **Journal Français d’Ophtalmologie**, v. 41, n. 6, p. e235–e243, jun. 2018.

MINELLI, A.; BOXSHALL, G.; FUSCO, G. An introduction to the biology and evolution of arthropods. *In*: **Arthropod Biology and Evolution**, pp. 1-15. Heidelberg: Springer Berlin, 2013. 532p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Monitoramento dos casos de arbovirose até a semana epidemiológica 24 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, Secretaria de Vigilância em Saúde Volume, 53, N.º 24 | Jun. 2022

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika. **Semana Epidemiológica**, 52 de 2020.

MIRANDA, M. R. A. et al. Chemical Modifications of Vicilins Interfere with Chitin-Binding Affinity and Toxicity to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) Insect: A Combined In Vitro and In Silico Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 20, p. 5596–5605, 28 abr. 2020.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, mar. 2015.

MORABITO, K. M.; GRAHAM, B. S. Zika Virus Vaccine Development. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_10, p. S957–S963, 15 dez. 2017.

MOSTAFA, S., WANG, Y., ZENG, W., JIN, B. Plant Responses to Herbivory, Wounding, and Infection. **International Journal of Molecular Sciences**. 23(13):7031, 2022.

MOTA, G. S. et al. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189263, 27 dez. 2017.

MULATIER, M., BOULLIS, A. VEGA-RÚA, A. Pistas semioquímicas de oviposição para o controle de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti*: estado da arte e estrutura proposta para sua validação. **Vetores de parasitas**. 15 , 228, 2022.

MULDERIJ-JANSEN, V. et al. Understanding risk communication for prevention and control of vector-borne diseases: A mixed-method study in Curaçao. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008136, 13 abr. 2020.

MUNTASIR et al. Natural larvicide mixed lime leaf extract and galangal rhizome to mortality *Aedes aegypti* larvae. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102274, jan. 2022.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn. against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera:Culicidae). **Bioresource Technology**, v. 98(1), p.198–201, 2007.

MURUGESAN, A. K.; GUNASAGARAN, K. S. Purification and characterization of a synergistic bioactive lectin from *Pleurotus flabellatus* (PFL-L) with potent antibacterial and in-vitro radical scavenging activity. **Analytical Biochemistry**, v. 635, p. 114450, dez. 2021.

MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. Dengue Virus. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**, p. 281–359, 2020.

MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. Dengue Virus. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**, p. 281–359, 2020.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, jan. 2015.

MUTHENENI, S. R. et al. Dengue burden in India: recent trends and importance of climatic parameters. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1–10, jan. 2017.

MYERS, R. M.; CAREY, D. E. Concurrent Isolation from Patient of Two Arboviruses, Chikungunya and Dengue Type 2. **Science**, v. 157, n. 3794, p. 1307–1308, 15 set. 1967.

NADIM, S. S. et al. Impact of venereal transmission on the dynamics of vertically transmitted viral diseases among mosquitoes. **Mathematical Biosciences**, v. 325, p. 108366, jul. 2020.

NAIK, S.; KUMAR, S. APPLICATIONS OF PLANT LECTINS IN BIOTECHNOLOGY AND THERAPEUTICS. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 4, p. e4224, 1 fev. 2022.

NAIK, S.; KUMAR, S. APPLICATIONS OF PLANT LECTINS IN BIOTECHNOLOGY AND THERAPEUTICS. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 4, p. e4224, 1 fev. 2022.

NAIR, K. R. et al. Detection of Circulating Dengue Virus Serotypes in a Tertiary Care Centre in Central Kerala, 2016. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 01, p. 2669–2678, 10 jan. 2019.

NASR, M.; SENDI, J. J.; MOHARRAMIPOUR, S.; ZIBAE, A. Avaliação do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. como fonte de tóxico e inibidor de parâmetros fisiológicos em traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). J. Saudi Soc. **Agrícola. Sci.** 16, 184-190, 2017.

NDENGA, B. A. et al. Characteristics of *Aedes aegypti* adult mosquitoes in rural and urban areas of western and coastal Kenya. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189971, 19 dez. 2017.

NDIBUAGU, E. O.; CHIME, P. E.; NWEZE, S. O. Knowledge of Zika Virus Disease Prevention Methods, among Female Caregivers That Bring Babies for Immunization in a Teaching Hospital, **Southeast Nigeria. Health**, v. 13, n. 11, p. 1410–1430, 2021.

NEGATU, B.; DUGASSA, S.; MEKONNEN, Y. Environmental and Health Risks of Pesticide Use in Ethiopia. **Journal of Health and Pollution**, v. 11, n. 30, 28 maio 2021.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, 9, 255-262 (1988).

NICOLETTI, M. New solutions using natural products. **Insect-Borne Diseases in the 21st Century**, p. 263–351, 2020.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415–415, 24 out. 2013.

NUNES, N. N. S. et al. A novel cysteine proteinase inhibitor from seeds of *Enterolobium contortisiliquum* and its effect on *Callosobruchus maculatus* larvae. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 100876, mar. 2021.

NUNES, M. R. T., FARIA, N. R., DE VASCONCELOS, J. M., GOLDING, N., KRAEMER, M. U., DE OLIVEIRA, L. F., ... & DA COSTA VASCONCELOS, P. F. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>.

OLLANKETO, M. et al. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 2, p. 158–163, 1 ago. 2002.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; DE PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; DE LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98(13), p. 2549–2556, 2007.

OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Febre amarela. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/node/40>>. Acessado em: 9 fev. 2022.

O'NEILL, S. L. et al. Scaled deployment of Wolbachia to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. **Gates Open Research**, v. 2, p. 36, 13 ago. 2019.

PANDEYA, A. et al. Dengue encephalitis featuring “double-doughnut” sign - A case report. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 78, p. 103939, jun. 2022.

PARE, G. et al. Genetic risk for dengue hemorrhagic fever and dengue fever in multiple ancestries. *EBioMedicine*, v. 51, p. 102584, jan. 2020.

PAREYN, F. G. C. et al. *Anadenanthera colubrina* (angico). In: CORADIN, L. et al. (Ed.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: **Plantas para o futuro: Região Nordeste. Brasília**, DF: MMA,. p. 740-745. 2018.

PARTHIBAN, E. et al. Mosquito larvicidal activity of *Annona reticulata* extract and its lethal impacts on allelochemicals detoxifying enzymes in wild population dengue vector, *Aedes aegypti*. **International Journal of Pest Management**, p. 1–16, 29 nov. 2021.

PARTHIBAN, E. et al. Purification, characterization of mosquito larvicidal lectin from *Annona muricata* and its eco-toxic effect on non-target organism. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 357–366, dez. 2020.

PATHAK, V.; MOHAN, M. A notorious vector-borne disease: Dengue fever, its evolution as public health threat. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 8, n. 10, p. 3125, 2019.

PATTNAIK, A.; SAHOO, B. R.; PATTNAIK, A. K. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 266, 31 maio 2020.

PAUL, S., DAS, S. Natural insecticidal proteins, the promising bio-control compounds for future crop protection. **Nucleus**, 64, 7–20, 2021.

PAVELA, R. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 247–258, set. 2014.

PAVONI, L. et al. Green Micro- and Nanoemulsions for Managing Parasites, Vectors and Pests. **Nanomaterials**, v. 9, n. 9, p. 1285, 9 set. 2019a.

PAVONI, L. et al. Microemulsions: An effective encapsulation tool to enhance the antimicrobial activity of selected EOs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p. 101101, out. 2019b.

PEREIRA, A. M. S. et al. Formulário Fitoterápico da Farmácia da Natureza. 3 ed. **São Paulo: Bertolucci**, p. 42-43, 2020.

PEREIRA, B. A. DA S. *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. Disponível em: <<http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/06/21/anadenanthera-peregrina-l-speg/>>.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V; LEYVA, A.; MORAES, M.E.A; MORAES, M.O (2006) Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **L Mol Nat Prod** 2:197-2011.

PÉREZ-STAPLES, D.; DÍAZ-FLEISCHER, F.; MONTOYA, P. The Sterile Insect Technique: Success and Perspectives in the Neotropics. **Neotropical Entomology**, v.50, n.2, p.172-185, 2021.

PIELNAA, P., AL-SAADAWA, M., SARO, A., DAMA, M. F., ZHOU, M., HUANG, Y., HUANG, J., & XIA, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>.

PIPLANI, M. et al. Plant-based larvicidal agents: An overview from 2000 to 2018. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 92–103, abr. 2019.

PLUEMPANUPAT, S.; KUMRUNGSEE, N.; PLUENMPANUPAT, W.; NGAMKITPINYO, K.; CHAVASIRI, W.; BULLANGPOTI, V.; KOUL, O. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial Crops and Products** 44: 653-658, 2013.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, 37(6)813-816, 2003.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. Zika Vaccine Development: Current Status. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 12, p. 2572–2586, dez. 2019.

POMBI, M.; MONTARSI, F. Mosquitoes (Culicidae). Reference Module in **Biomedical Sciences**, 2020.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; BARROSO, L. C. B. C.; PAIVA, P. M. G. Effect of acetylcholinesterase *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and activities in: *Aedes aegypti*. Archives of Insect. **Biochemistry and Physiology**, v.79(3), p.135–152. 2012.

PORTILLO, A.; RUIZ-ARRONDO, I.; OTEO, J. A. Arthropods as vectors of transmissible diseases in Spain. Medicina Clínica (English Edition), v. 151, n. 11, p. 450–459, 14 dez. 2018.

POULIN, B. et al. Long-term persistence and recycling of *Bacillus thuringiensis* israelensis spores in wetlands sprayed for mosquito control. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 243, p. 114004, 15 set. 2022.

POWERS, A. M. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, 1 jan. 2018.

PRAKASH, A. S., KORMATH, A., MEETHAL, K. V. Identification of plant extracts inhibiting trypsin-like larval gut proteases of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae. 2455-4758, 2020.

PRAKASH, A. S., KORMATH, A., MEETHAL, K. V. Identification of plant extracts inhibiting trypsin-like larval gut proteases of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae. **International Journal of Entomology Research**. v 5, n. 3, 2020.

PROW, N. A. et al. A vaccinia-based single vector construct multi-pathogen vaccine protects against both Zika and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 26 mar. 2018.

QUICKE, KENDRA M. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 1, p. 83–90, jul. 2016.

QUINTANS, M. D. S.; BUENO, A. C.; CARDOSO, C. A. A. Microcephaly caused by or associated with congenital infections in the last 20 years in Brazil: a systematic review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, 2022.

QURESHI, A. I. Dengue virus infection. **Dengue Virus Disease**, p. 1–7, 2020.

RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J. Teratogen update: Zika virus and pregnancy. **Birth Defects Research**, 23 ago. 2020.

RATSITORAHINA, M. et al. Outbreak of Dengue and Chikungunya Fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1135–1137, jul. 2008.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 913–920, set. 2010.

REISINGER, E. C. et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. **The Lancet**, v. 392, n. 10165, p. 2718–2727, dez. 2018.

REZENDE, H. V. Síntese e caracterização de um novo metalo-inseticida baseado em nicotina para controle do *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). 2013.

REZENDE-TEIXEIRA, P. et al. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118983, 1 maio 2022.

ROBERT, M. A.; STEWART-IBARRA, A. M.; ESTALLO, E. L. Climate change and viral emergence: evidence from Aedes-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 40, p. 41–47, fev. 2020.

ROBERTSON, S. Module 8: Yellow fever. the immunological basis for immunization. WHO, Global Programme for Vaccines and Immunization, **Geneva**, 1993.

ROBINSON, Marion C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.

ROBISON, A. et al. Comparison of Chikungunya Virus and Zika Virus Replication and Transmission Dynamics in *Aedes aegypti* Mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 869–875, 1 ago. 2020.

RODHAIN, F. Yellow Fever: A Brief History of a Tropical Virosis. **La Presse Médicale**, p. 104132, jun. 2022.

RODRIGUES et al. Larvicidal and Enzymatic Inhibition Effects of *Annona muricata* Seed Extract and Main Constituent Annonacin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 112, 26 jul. 2019.

RODRIGUES, A. M. et al. Larvicidal activity of *Annona mucosa* Jacq. extract and main constituents rolliniastatin 1 and rollinicin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Industrial Crops and Products**, v. 169, p. 113678, out. 2021.

RODRIGUES, L. M. R., QUEIROZ-VOLTAN, R. B., GUERREIRO-FILHO, O. Anatomical changes on coffee leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. Garcae. **Summa Phytopathol** 41(4):256–261, 2015.

RODRIGUES-ALVES, M. L., MELO-JÚNIOR, O. A. DE O., SILVEIRA, P., MARIANO, R. M. DA S., LEITE, J. C., SANTOS, T. A. P., SOARES, I. S., LAIR, D. F., MELO, M. M., RESENDE, L. A., DA SILVEIRA-LEMO, D., DUTRA, W. O., GONTIJO, N. DE F., ARAUJO, R. N., SANT'ANNA, M. R. V., ANDRADE, L. A. F., DA FONSECA, F. G., MOREIRA, L. A., & GIUNCHETTI, R. C. Historical Perspective and Biotechnological Trends to Block Arboviruses Transmission by Controlling *Aedes aegypti* Mosquitos Using Different Approaches. *Frontiers in Medicine*, 7, 2020.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; VILLAMIL-GÓMEZ, W. E.; FRANCO-PAREDES, C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 3, p. 177–179, maio 2016.

RODRÍGUEZ-SIFUENTES, L., MARSZALEK, J. E., CHUCK-HERNÁNDEZ, C., SERNA-SALDÍVAR, S. O. Legumes Protease Inhibitors as Biopesticides and Their Defense Mechanisms against Biotic Factors. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. 8 May 2020.

ROQUES, L. et al. Dynamics of *Aedes albopictus* invasion Insights from a spatio-temporal model. 24 set. 2021.

ROQUES, P. et al. Effectiveness of CHIKV vaccine VLA1553 demonstrated by passive transfer of human sera. **JCI Insight**, v. 7, n. 14, 22 jul. 2022.

ROSENBERG, A. Z. et al. Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 1, p. 43–48, jan. 2017.

ROY, S. K., & BHATTACHARJEE, S. (2021). Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, 67(10), 687-702. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>.

RODZAY, R., & ZUHARAH, W. F. (2021). The determination of effective concentration of acethonilic Ipomoea cairica leaves extract against laboratory and field strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquito larvae. *Tropical biomedicine*, 38(3), 446–452. <https://doi.org/10.47665/tb.38.3.087>.

RUEDA, L. M. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*, v. 589, n. 1, p. 1, 3 ago. 2004.

ROSSI DA SILVA K, RIBEIRO DA SILVA W, SILVA BP, ARCOS AN, DA SILVA FERREIRA FA, SOARES-DA-SILVA J, et al. New traps for the capture of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) eggs and adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 15(4): p. 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008813>

RÜCKERT, C.; EBEL, G. D. How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? **Trends in parasitology**, v. 34, n. 4, p. 310–321, 1 abr. 2018.

RYAN, P. A. et al. Establishment of Mel Wolbachia in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland, Australia. **Gates Open Research**, v. 3, p. 1547, 8 abr. 2020.

SABOIA-VAHIA L, BORGES-VELOSO A, MESQUITA-RODRIGUES C, CUERVOP, DIAS-LOPES G, BRITTO C, et al., Perfis de tripsina como serina peptidase nos estágios de ovo, larva e pupa de *Aedes albopictus*. **Parasitas e Vetores**. 6(1):50, 2013.

SADEGHIEH, T. et al. Yellow fever virus outbreak in Brazil under current and future climate. **Infectious Disease Modelling**, v. 6, p. 664–677, 1 jan. 2021.

SAEED, A. et al. In-silico Studies Calculated a New Chitin Oligomer Binding Site Inside Vicilin: A Potent Antifungal and Insecticidal Agent. **Dose-Response**, v. 20, n. 2, p. 155932582211082, abr. 2022.

SAEED, A.; RAFIQ, Z.; SAEED, Q.; et al. Caracterização funcional de uma potente proteína ligante de quitina antimicrobiana e inseticida de sementes de *Iberis umbellata* L. **Pak J Bot.** ;53(4): 1515 – 1523, 2021.

SAEED, O.; ASIF, A. Dengue virus disease; the origins. **Dengue Virus Disease**, p. 9–16, 2020.

SALES, G. M. P. G. et al. Treatment of chikungunya chronic arthritis: A systematic review. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 1, p. 63–70, jan. 2018.

SAMPIERI, C. L.; MONTERO, H. Breastfeeding in the time of Zika: a systematic literature review. **PeerJ**, v. 7, p. e6452, 19 fev. 2019.

SÁ, G. C. S., BEZERRA, P. V. V., DA SILVA, M. F. A., DA SILVA, L. B., BARRA, P. B., & UCHÔA, A. F. Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides an alternative for its management?. *Journal of Pest Science*, (2022):1-20, 2022a. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01507-2>.

SÁ, G. C. S.; SILVA, L. B.; BEZERRA, P. V. V.; SILVA, M. F. A.; INACIO, C. L. S.; PAIVA, W. S.; SILVA, V. P. M. E.; CORDEIRO, L. V.; OLIVEIRA, J. W. F.; SILVA, M. S.; LIMA, E. O.; MOREIRA, F. J. C.; ROCHA, H. A. O.; BARRA, P. B.; XIMENES, M. F. F. M.; UCHOA, A. F. *Tephrosia toxicaria* (Sw.) Pers. extracts: Screening by examining aedicial action under laboratory and field conditions along with its antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial activities. **PLoS One**, 2022b.

SANTHOSH, S. B; RAGAVENDRAN, C; NATARAJAN, D. Spectral and HRTEM analyses of Annona muricata leaf extract mediated silver nanoparticles and its larvicidal efficacy against three mosquito vectors *Anopheles speplesi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.153, p.184-190,2015.

SARMA, N. et al. The Economic Burden of Malaria: Revisiting the Evidence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 14 out. 2019.

SARWAR, M.; RASOOL, B. Seasonal Prevalence and Phenomenal Biology as Tools for Dengue Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) Management. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022.

SASAKI, D. Y. et al. Effects of proteinase inhibitor from *Adenanthera pavonina* seeds on short- and long term larval development of *Aedes aegypti*. **Biochimie**, v. 112, p. 172–186, maio 2015.

SAWICKA, B., SKIBA, D., UMACHANDRAN, K., & DICKSON, A. Plantas alternativas e novas. Preparação de Fitofarmacêuticos para a Gestão de Distúrbios, 491-537, 2021.

SCOTT, T. W., G. G. CLARK, P. H. AMERASINGHE, L. H. LORENZ, P. REITER and J. D. EDMAN. 1993. Detection of multiple blood feeding patterns in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histological technique. **J. Med. Entomol.** 30:94-99.

SENGUL DEMIRAK, M. S.; CANPOLAT, E. Plant-Based Bioinsecticides for Mosquito Control: Impact on Insecticide Resistance and Disease Transmission. **Insects**, v. 13, n. 2, p. 162, 3 fev. 2022.

SENTHIL-NATHAN, S. A Review of Resistance Mechanisms of Synthetic Insecticides and Botanicals, Phytochemicals, and Essential Oils as Alternative Larvicidal Agents Against Mosquitoes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 25 fev. 2020.

ŞENGÜL DEMIRAK, M. Ş.; CANPOLAT, E. Plant-Based Bioinsecticides for Mosquito Control: Impact on Insecticide Resistance and Disease Transmission. **Insects**, v. 13, n. 2, p. 162, 3 fev. 2022.

SHAH, J. M.; JOSEPH, J. T. Envolvimento da Regulação Epigenética na Defesa das Plantas durante o Estresse Biótico. 2022.

SHAMSI, T.N.; PARVEEN, R.; AHMAD, A.; SAMAL, R.R.; KUMAR, S.; FATIMA, S. Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. **Acta Ecol. Sin.**, 38, 325–328, 2018.

SHARHRIARI, M.; SAHEBZADEH, N.; ZIBAE, A. Efeito do óleo essencial de *Teucrium polium* (Lamiaceae) nas atividades de enzimas digestivas e reservas energéticas de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Invertebr. Sobreviver. J**, 14, 182-189, 2017.

SHARHRIARI, M.; SAHEBZADEH, N.; ZIBAE, A.; KHANI, A.; SENTHIL-NATHAN, S. Resposta metabólica de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) ao óleo essencial de Ajwain e timol. **Toxin Rev.**, 36, 204-209, 2017.

SHARMA, S. K.; JAIN, S. Chikungunya: A rheumatologist's perspective. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 21, n. 3, p. 584–601, 12 fev. 2018.

SIERRA, B. et al. OSBPL10, RXRA and lipid metabolism confer African-ancestry protection against dengue haemorrhagic fever in admixed Cubans. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006220, 27 fev. 2017.

SILALAH, C. N. et al. Insecticide Resistance Profiles and Synergism of Field *Aedes aegypti* from Indonesia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 6(6): e0010501, June 6, 2022.

SILVA, E. F. E et al. Ações voltadas a cobertura vacinal contra Febre Amarela a partir de atividades prática de epidemiologia. **Revista Pró-UniverSUS**, v. 10, n. 1, p. 110–118, 30 jun. 2019.

SILVA, I. G, et al. Ciclo evolutivo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Rev. patol. trop**, v. 22, n. 1, p. 43-8, 1993.

SILVA, L. L. DE S. et al. Effects of a solid formulation containing lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds on egg hatching and development of *Aedes aegypti* larvae.

**Acta Tropica**, v. 214, p. 105789, 1 fev. 2021.

SILVA-INACIO, C. L., PAIVA, A. A. P. D., ARAÚJO, J. M. G. D., & XIMENES, M. D. F. F. D. M. (2020). Ecological relationships of *Haemagogus spegazzinii* (Diptera: Culicidae) in a semiarid area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 53:1-8. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0502-2020>

SILVA, M. R. M. DA; JÚNIOR, E. R. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105419, 1 dez. 2020.

SILVA, R. F. et al. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review.

**Microchemical Journal**, v. 175, p. 107184, abr. 2022.

SILVA, R. G. G; VASCONCELOS, I. M; ACRÍSIO FILHO, J. U. B; CARVALHO, A. F; SOUZA, T. M; GONDIM, D. M. F; VARELA, A. L. N; OLIVEIRA, J. T. A. A torta de mamona contém um inibidor de tripsina que apresenta atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* e inibe as proteases do intestino médio das larvas do mosquito da dengue. **Ind. Culturas Prod.** 70, 48-55, 2015.

SILVA, R. L. et al. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, p. 114568, abr. 2022.

SILVÉRIO, M. R. S. et al. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 31 jul. 2020.

SILVEIRA, L. T. C., TURA, B., & SANTOS, M. (2019). Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC infectious diseases*, 19(1), 1-8.

<https://doi.org/10.1186%2Fs12879-019-4369-5>

SINGH, B. et al. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 858–870, 21 nov. 2016.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** 1999;299: 152-178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

SKALINSKI, L. M. et al. The triple epidemics of arboviruses in Feira de Santana, Brazilian Northeast: Epidemiological characteristics and diffusion patterns. **Epidemics**, v. 38, p. 100541, mar. 2022.

SLIFKA, D. K. et al. Development of a next-generation chikungunya virus vaccine based on the HydroVax platform. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 7, p. e1010695, 5 jul. 2022.

SOARES, T. S., WATANABE, R. M., LEMOS, F. J., TANAKA, A. S. Caracterização molecular de genes que codificam enzimas do tipo tripsina de larvas de *Aedes aegypti* e identificação de enzimas digestivas. **Gene**. 489(2):70-75, 2011.

SOCHA, W. et al. Vector-Borne Viral Diseases as a Current Threat for Human and Animal Health—One Health Perspective. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 11, p. 3026, 27 maio 2022.

SOCHA, W. et al. Vector-Borne Viral Diseases as a Current Threat for Human and Animal Health—One Health Perspective. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 11, p. 3026, 27 maio 2022.

SOHAIL, A. et al. Stochastic Analysis Of A Deterministic And Seasonally-Forced Sei Model For Improved Disease Spread Simulation. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 17, n. 04, p. 1750067, 6 fev. 2017.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, out. 2009.

SOLIS-SANTOYO F, RODRIGUEZ AD, PENILLA-NAVARRO RP, SANCHEZ D, CASTILLO-VERA A, LOPEZ-SOLIS AD, et al. Resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* de Tapachula, México: variação espacial e resposta ao uso histórico de inseticidas. **PLoS Negl Trop Dis**, 15(9): e0009746, set 27, 2021.

SOONWERA, M. et al. Combinations of plant essential oils and their major compositions inducing mortality and morphological abnormality of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Heliyon**, v. 8, n. 5, p. e09346, maio 2022.

SPINOZZI, E. et al. Apiaceae essential oils and their constituents as insecticides against mosquitoes—A review. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113892, nov. 2021.

SRIDHAR, K. et al. Application of high-pressure and ultrasound technologies for legume proteins as wall material in microencapsulation: New insights and advances. **Trends in Food Science & Technology**, v. 127, p. 49–62, set. 2022.

STROTHER, E. A.; BARRETT, A. D. T. Yellow Fever Virus (Flaviviridae). **Encyclopedia of Virology**, p. 891–898, 2021.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597–611, 3 set. 2019.

SYAFRUDIN, M.; KRISTANTI, R. A.; YUNIARTO, A., HADIBARATA, T., RHEE, J., AL-ONAZI, W. A., ALGARNI, T. S.; ALMARRI, A. H.; AL-MOHAIMEED, A. M. Pesticides in drinking water - a Review. **Int J Env Res Pub He**, 18(2):468–483, 2021.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.149(3), p. 300–306, 2009.

TABACHNICK, W. J. "Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence." International Journal of Environmental **Research and Public Health**. V.10, n.1, p. 249- 277, 2013.

TAUIL, Pedro Luiz. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 773-774, 2014.

TAVEIRA, L. A. et al. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. In: Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*.

Ribeirão Preto. Secretaria de Saúde. **Divisão de Controle de Vetores e Animais Peçonhentos**, 2001.

TEIXEIRA, M. DA G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1307–1315, out. 2005.

TEIXEIRA, Maria da Glória; BARRETO, Maurício Lima; GUERRA, Zouraide. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TESLA, B. et al. Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 285, n. 1884, p. 20180795, 15 ago. 2018.

THOMAS, A. X. et al. ANKLE2 -related microcephaly: A variable microcephaly syndrome resembling Zika infection. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 9, n. 8, p. 1276–1288, 24 jul. 2022.

THOMPSON, D. et al. Immunological implications of diverse production approaches for Chikungunya virus-like particle vaccines. **Vaccine**, v. 40, n. 22, p. 3009–3017, maio 2022.

THONGWAT, D. et al. Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 3, p. 222–226, mar. 2017.

TIBEBU, B. Defense Mechanisms of Plants to Insect Pests: From Morphological to Biochemical Approach. **Trends Tech Sci Res**. 2(2): 555584, 2018.

TOWNSON, H. The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). viii + 509 pp. Hard cover £50. ISBN 0-412-40180-0. **Bulletin of Entomological Research**, v. 83, n. 2, p. 307–308, 1 jun. 1993.

TUDORAN, A., NORDLANDER, G., KARLBERG, A., PUENTES, A. Uma das principais pragas de insetos florestais, o gorgulho do pinheiro *Hylobius abietis*, é

mais suscetível a cepas de *Bacillus thuringiensis* direcionadas a Diptera do que a Coleoptera. **Manag. de Pragas. Sci.**, 77, pp. 1303-1315, 2021.

TULLY, D., & GRIFFITHS, C. L. (2021). Dengvaxia: The world's first vaccine for prevention of secondary dengue. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 9:1-8. <https://doi.org/10.1177/25151355211015839>.

UCHÔA, A. F. et al. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 169–178, fev. 2006.

UTARINI, A. et al. Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2177–2186, 10 jun. 2021.

**Vacina da dengue do Butantan tem eficácia de 79,6%, mostram primeiros resultados da fase 3.** Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/vacina-da-dengue-do-butantan-tem-eficacia-de-796-mostram-primeiros-resultados-da-fase-3>>. Acesso em: 14 jan. 2023.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. DA. Dengue: teorias e práticas. [s. l.] SciELO - **Editora FIOCRUZ**, 2015.

VAN DER LINDEN, V. et al. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 47, p. 1343–1348, 2 dez. 2016.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutri properties of plant lectins. **Toxicon**, 44: 385–403, 2004.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(2):275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000–2016. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 295–301, maio 2016.

VELAN, I. et al. Oviposition responses of gravid *Aedes aegypti* Linn. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to natural organic infusions under laboratory condition. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, p. 101853, dez. 2021.

VERMA, P. et al. Liver Pays Dengue Toll in Body Along with Wide Range of Gastrointestinal Complications Strongly Associated with DENV Serotype 2 Infection in Children. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 12, p. S62, 2022.

VIKTOROV, A. G. Genetic Methods of Insect Control: History and Current State. **Russian Journal of Biological Invasions**, v.12, n.2, p.167-175, 2021.

VU, D. M.; JUNGKIND, D.; ANGELLE DESIREE LABEAUD. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, jun. 2017.

WALKER, T. et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450–453, ago. 2011.

WALLIN, J., KARJALAINEN, AK, SCHULTZ, E., JARVISTO, J., LEPPANEN, M., VUORI, K. M. Abordagem do peso da evidência na avaliação dos riscos ecotoxicológicos de solos sulfatados ácidos nos estuários dos rios do Mar Báltic. **Sci. Ambiente Total**. 508, 452-461, 2015.

WANG, W.-H. et al. Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 6, mar. 2020.

WARD, D. et al. Sero-epidemiological study of arbovirus infection following the 2015–2016 Zika virus outbreak in Cabo Verde. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11719, 9 jul. 2022.

WARSAME, A. O.; O’SULLIVAN, D. M.; TOSI, P. Seed Storage Proteins of Faba Bean (*Vicia faba* L): Current Status and Prospects for Genetic Improvement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 48, p. 12617–12626, 7 nov. 2018.

WELLEKENS, K., BETRAINS, A., DE MUNTER, P., & PEETERMANS, W. (2022). Dengue: current state one year before WHO 2010-2020 goals. *Acta clinica Belgica*, 77(2), 436–444. <https://doi.org/10.1080/17843286.2020.1837576>.

WESTBY, K. M.; JULIANO, S. A.; MEDLEY, K. A. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Has Not Become the Dominant Species in Artificial Container Habitats in a Temperate Forest More Than a Decade After Establishment. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 2, p. 950–955, 19 out. 2020.

WHETSON, P. A. REDE BD. Métodos de entrega de toxinas peptídicas e proteicas no controle de insetos. **Toxi con** 49:579-59. 2007.

WHO SCIENTIFIC GROUP ON ARTHROPOD-BORNE AND RODENT-BORNE VIRAL DISEASES; ORGANIZATION, W. H. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases : **report of a WHO scientific group** [meeting held in Geneva from 28 February to 4 March 1983]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>>. Acesso em: 13 mar. 2022.

WHO – World Health Organization. **World Malaria Report**, p. 66, 2009.

WHO. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/WHOPES /IC /96. Geneva: **WHO**, p. 69, 1996.

WHO. **Vacina contra a dengue: documento de posicionamento da OMS** – setembro de 2018 [Internet]. Genebra; 2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274315/WER9336.pdf?ua=1>>.

WILDER-SMITH, A. et al. Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 157–164, 30 mar. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012-2020. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Geneva: WHO; 2012. 43p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>.

WROBEL, M.H., & MLYNARCZUK, J. Inseticidas cloro-orgânicos (DDT) e organofosforados (malation) prejudicam a função motora do colo do útero bovino. **Toxicologia e Farmacologia Aplicada**, 427, 115667, set de 2021.

WULIANDARI, J. R. et al. Frequency of kdr mutations in the voltage-sensitive sodium channel (VSSC) gene in *Aedes aegypti* from Yogyakarta and implications for Wolbachia-infected mosquito trials. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, 24 ago. 2020.

World Health Organization. A Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017–2026; World Health Organization: **Geneva, Switzerland**, 2017.

XIMENES, M. D. F. F. M, DE ARAÚJO GALVÃO, J. M., INACIO, C. L. S., E SILVA, V. P. M., DO NASCIMENTO PEREIRA, R. L., PINHEIRO, M. P. G., ... & GOMES, C. E. S. (2020). Arbovirus expansion: New species of culicids infected by the Chikungunya virus in an urban park of Brazil. *Acta Tropica*, 209:1-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.10553>.

XAVIER-FILHO J, CAMPOS FAP, ARY MB, SILVA CP, CARVALHO MMM, MACEDO MLR, et al. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **J Agric Food Chem**. 1989;37(4): 1139-1143.  
doi: 10.1021/jf00088a071.

YALWALA, S. et al. Comparative efficacy of existing surveillance tools for *Aedes aegypti* in Western Kenya. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, p. 301–307, 27 nov. 2015.

YANG, Y.J; DAVIES, D. M. Tripsina e quimotripsina durante a metamorfose em *Aedes aegypti* e propriedades da quimotripsina. **Revista de fisiologia de insetos**. 17(1):117-131, 1971.

YEASMIN, M. et al. Safety and immunogenicity of Zika virus vaccine: A systematic review of clinical trials. **Reviews in Medical Virology**, 20 ago. 2022.

ZHAO, Z. et al. Co-Immunization With CHIKV VLP and DNA Vaccines Induces a Promising Humoral Response in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 24 mar. 2021.

ZOHDY, S. et al. Detection of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations in Southern Alabama Following a 26-yr Absence and Public Perceptions of the Threat of Zika Virus. **Journal of Medical Entomology**, 5 abr. 2018.

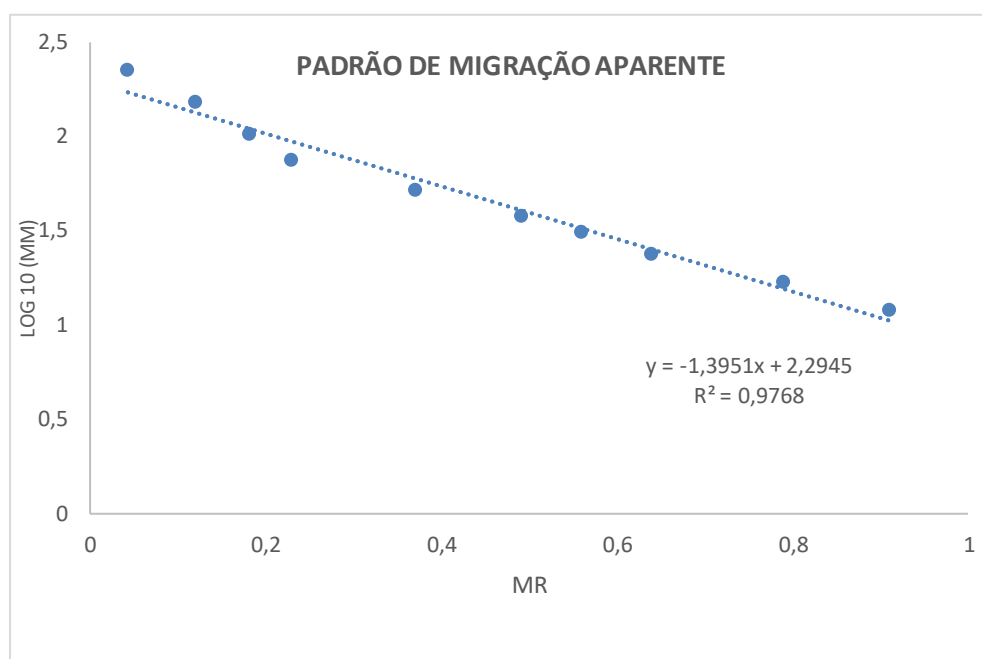
## ANEXOS

Anexo 1 – Determinação da mobilidade relativa de cada banda proteica do marcador para obtenção da equação da reta que permitirá a estimativa das massas moleculares das proteínas do extrato aquoso a quente de *A. colubrina*.

| Massa (kDa) | Mr   | log 10 (MM) |
|-------------|------|-------------|
| 225         | 0,04 | 2,35        |
| 150         | 0,12 | 2,18        |
| 102         | 0,18 | 2,01        |
| 76          | 0,23 | 1,88        |
| 52          | 0,37 | 1,72        |
| 38          | 0,49 | 1,58        |
| 31          | 0,56 | 1,49        |
| 24          | 0,64 | 1,38        |
| 17          | 0,79 | 1,23        |
| 12          | 0,91 | 1,08        |

(Mr) mobilidade relativa das bandas proteicas no gel considerando o comprimento total do gel de 8,5 cm = 1. Aplicando a regra de 3 para a migração relativa a cada proteína encontraremos seu Mr.

Anexo 2 - Equação da reta para estimativa das massas moleculares das proteínas do extrato aquoso de Angico



## Apêndice 1 – Artigos Publicados como Coautora

Journal of Pest Science  
<https://doi.org/10.1007/s10340-022-01507-2>

### REVIEW



## Arbovirus vectors insects: are botanical insecticides an alternative for its management?

Giulian César da Silva Sá<sup>1</sup> · Pedro Vitor Vale Bezerra<sup>1</sup> · Melissa Farias Alves da Silva<sup>1</sup> ·  
 Leidiane Barboza da Silva<sup>1</sup> · Patrícia Batista Barra<sup>2</sup> · Maria de Fátima Freire de Melo Ximenes<sup>3</sup> ·  
 Adriana Ferreira Uchôa<sup>1</sup>

Received: 4 August 2021 / Revised: 5 April 2022 / Accepted: 11 April 2022  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

### Abstract

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are insect vectors of epidemiologically important arboviruses owing to their behavior, physiology, morphology, and proximity to humans, which require incisive strategies to contain their spread. The failure of current arbovirus management plans and lack of fully effective treatments suggest that vector control by botanical insecticides could be an effective and safe strategy. Botanical insecticides are obtained from renewable sources and have complex chemical compositions, different modes of action, and selective toxicity for target organisms. In this review, we present the main control strategies for insects belonging to the genera *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* and discuss the possibility of using botanical insecticides in the integrated management of vectors. Numerous botanical insecticide formulations are presented, and their potential modes of action during the immature stages include damage to the egg exocorionic network and abnormal disruption of embryos, which result from deficiencies in egg chitinization, impairment of larval morphology, and inhibition or differential expression of enzymes, promoting changes in the digestive tract epithelium and reduced larval mobility, and impairment of external surfaces or the respiratory system of pupae, altering pupal swimming patterns. In adult insects, botanical insecticides can promote incomplete ecdysis, in addition to dysfunction of olfactory receptors, food traffic, and reproductive function. Thus, broad-spectrum botanical insecticides can be used to control the different stages of insect development. The contributions of nanotechnology to vector control should be further explored to enhance the insecticidal activity and stability of botanical insecticides under different conditions.

**Keywords** Natural products · Plant preparations · Insecticidal activity · Nanoinsecticides · Integrated vector management

## From the application of active teaching methods to significant learning in Cellular and Molecular Biology: exploring possibilities with Problem Based Learning

*Da aplicação de metodologias ativas à aprendizagem significativa em Biologia Celular e Molecular: explorando possibilidades com Aprendizagem Baseada em Problemas*

Giulian César da Silva Sá<sup>1,2\*</sup>, Leidiane Barboza da Silva<sup>1,2</sup>, Elizeu Antunes dos Santos<sup>1</sup>, Adriana Ferreira Uchôa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), campus Natal-RN, Brazil.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT), Natal-RN, Brazil.

\*e-mail: [giuliancesarsa@gmail.com](mailto:giuliancesarsa@gmail.com)

Support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil)

### Abstract

Cellular and Molecular Biology contents are discussed in high school integrated to discipline Biology. However, the success of these reflections in higher education is compromised by the unavailability or restriction of the application of active teaching methods, because the students have little familiarity with terms used and these contents are not yet fully discussed, aiming at significant learning. This Teaching Research was the result of a graduate teaching practice and explored the possibility that Problem-Based Learning (PBL) facilitates the significant acquisition of themes in Cellular and Molecular Biology by students from a public institution of higher education in northeastern Brazil. This graduate teaching practice provided to graduate student the opportunity to experience, learn and test innovative teaching and research techniques, and to build new skills. After PBL employment, students acquired competences that would probably not be developed in other common activities with the same effectiveness, and students with learning difficulties in Cellular and Molecular Biology contents or in relationships with their classmates have improved their performance and affectivity. Thus, we suggest the PBL as a pedagogical support to teaching practice, for contributing to making students active in the teaching-learning process and improve the perception of the concreteness of the studied knowledge.

**Keywords:** Problem Based Learning; Significant Learning; Active Teaching Methods.

## RESEARCH ARTICLE

# *Tephrosia toxicaria* (Sw.) Pers. extracts: Screening by examining aedicial action under laboratory and field conditions along with its antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial activities



Giulian César da Silva Sá<sup>1,2</sup>, Leidiane Barboza da Silva<sup>1,2</sup>, Pedro Vitor Vale Bezerra<sup>1,2</sup>, Melissa Alves Farias da Silva<sup>1,2</sup>, Cássio Lázaro Silva Inácio<sup>3</sup>, Wesley de Souza Paiva<sup>4</sup>, Virgínia Penélope Macedo e Silva<sup>3</sup>, Laís Vilar Cordeiro<sup>5</sup>, Johnny Wyllys de Freitas Oliveira<sup>6</sup>, Marcelo Sousa Silva<sup>6</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>5</sup>, Francisco José Carvalho Moreira<sup>7</sup>, Hugo Alexandre de Oliveira Rocha<sup>4</sup>, Patrícia Batista Barra<sup>8</sup>, Maria de Fátima Freire de Melo Ximenes<sup>3</sup>, Adriana Ferreira Uchôa<sup>1,2\*</sup>

**1** Department of Cellular Biology and Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, **2** Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, **3** Department of Microbiology and Parasitology, Laboratory of Entomology Research, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, **4** Department of Biochemistry, Laboratory of Biotechnology of Natural Polymer, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, **5** Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Mycology, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, **6** Department of Clinical and Toxicological Analysis, Laboratory of Immunoparasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil, **7** Laboratory of Seeds Plant Health, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Sobral, Ceará, Brazil, **8** Department of Biomedical Sciences, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil

\* [afuchoa@ufrnet.br](mailto:afuchoa@ufrnet.br)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Sá GCS, da Silva LB, Bezerra PV, da Silva MAF, Inácio CLS, Paiva WS, et al. (2023) *Tephrosia toxicaria* (Sw.) Pers. extracts: Screening by examining aedicial action under laboratory and field conditions along with its antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial activities. PLoS ONE 18(1): e0275835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275835>

**Editor:** Ahmed Ibrahim Hasaballah, Al-Azhar University, EGYPT

**Received:** March 16, 2022

**Accepted:** September 24, 2022

**Published:** January 11, 2023

**Copyright:** © 2023 Sá et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The address of the repositories of the experimentally obtained data used to compose the graphs and tables of the article are as follows: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21305070> <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21225341.v1>

**Funding:** This work was supported in part by a resource funded by the National Council for Scientific and Technological Development - CNPQ,

## Abstract

An increase in the incidence of arboviral, microbial and parasitic infections, and to disorders related to oxidative stress has encouraged the development of adjuvant therapies based on natural formulations, such as those involving plant extracts. Thus, to expand the repertoire of the available therapeutic options, this study aimed to describe the versatility of *Tephrosia toxicaria* (Sw.) (Pers., 1807) extracts for the control of arbovirus vectors, as well as their antioxidant, antileishmanial, and antimicrobial potential. Among the aqueous and hydroethanolic extracts obtained, the hydroethanolic extract from roots (RHA) was identified as the most active larvicide extract demonstrating, respectively, the lowest lethal concentration (mg/mL) for 50%, 90% and 99% of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (S., 1894) larvae, observed at 24 h (0.33, 0.84 and 1.80; 0.32, 0.70 and 1.32) and 48 h (0.17, 0.51 and 1.22; 0.26, 0.47 and 0.78) post-exposure. Field assays revealed that RHA (0.84 mg/mL) is a potential oviposition deterrent, reducing egg-laying by approximately 90%. RHA (0.1 mg/mL) also exhibited antioxidant activity for the following tests: total antioxidant capacity (286.86 mg AAE/g), iron (87.16%) and copper (25.64%) chelation, and superoxide scavenging (10%). In the cell culture assays, RHA (0.1 mg/mL) promoted regeneration of metabolic activity (92% cell viability) in cells exposed to oxidative stress. Furthermore, RHA displayed

## Apêndice 2 – Artigo Derivado da Dissertação Submetido para Publicação

Wiley Authors | Submission

My Submissions Adriana ▼

Pest Management Science

JOURNAL HOME AUTHOR GUIDELINES EDITORIAL CONTACT

Powered by Atypon RxX

### Submission Overview

This manuscript has been submitted to the editorial office for review. Changes cannot be made during editorial review, but you can view the information and files you submitted, below.

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                          |         |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------|
| Article Type     | Research Article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                          |         |
| Title            | EFFICACY AND SAFETY OF ANGICO ( <i>Anadenanthera colubrina</i> ) SEED EXTRACT AGAINST <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> , UNDER LABORATORY AND FIELD CONDITIONS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                          |         |
| Manuscript Files | Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Type of File             | Size    |
|                  | <a href="#">Silva et al. PMS Manuscript.docx</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Main Document - MS Word  | 85.8 KB |
|                  | <a href="#">Fig_1.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Figure                   | 1.5 MB  |
|                  | <a href="#">Fig_2.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Figure                   | 2 MB    |
|                  | <a href="#">Fig_3.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Figure                   | 3.9 MB  |
|                  | <a href="#">Fig_4.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Figure                   | 4.9 MB  |
|                  | <a href="#">Fig_5.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Figure                   | 1.9 MB  |
|                  | <a href="#">Fig_6.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Figure                   | 161.3 K |
|                  | <a href="#">Table 1.docx</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Table                    | 14.4 KB |
|                  | <a href="#">Table 2.docx</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Table                    | 14.3 KB |
|                  | <a href="#">Table 3.docx</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Table                    | 14.3 KB |
|                  | <a href="#">Table 4.docx</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Table                    | 14.2 KB |
|                  | <a href="#">Silva et al. PMS Cover Letter.docx.pdf</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Cover letter / Comments  | 106.6 K |
|                  | <a href="#">Graphical Abstract Text.docx</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Graphical Abstract Text  | 12.3 KB |
|                  | <a href="#">Graphical Abstract Image.jpg</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Graphical Abstract Image | 99.4 KB |
| Abstract         | <p><b>BACKGROUND:</b> <i>Aedes aegypti</i> (L. 1762) and <i>Aedes albopictus</i> (S. 1894) are insect vectors of etiological from numerous epidemiologically important arboviruses. Current arboviruses management strategies suggest chemical insecticides for its control, but this strategy is associated with several limitations, encouraging the development of more effective and environmentally safe options, such as botanical insecticides. This study describes the aedicial potential of <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) seed extra (EAQA) against <i>Ae. aegypti</i> and <i>Ae. albopictus</i>, under laboratory and field conditions, in addition to cytotoxic safety.</p> <p><b>RESULTS:</b> EAQA showed larvicidal and pupicidal activities, compromising behavioral and morphological aspects of larvae and pupae in lethal concentrations (mg/mL) for 50% and 90% of <i>Ae. aegypti</i> and <i>Ae. albopictus</i> larvae, observed at 24h (0.16 and 0.94; 0.36 and 1.28) and 48h (0.002 and 0.26; 0.06 and 0.1 post-exposure, and <i>Ae. aegypti</i> and <i>Ae. albopictus</i> pupae, observed at 24h (0.50 and 1.50; 1.13 and 2.1; 48h (0.37 and 1.04; 0.83 and 1.34), respectively. EAQA showed ovicidal activity, affecting the egg hatch both species around 73%. Under field conditions, EAQA acts as an attractive agent for oviposition of <i>A. aegypti</i>. EAQA comprises carbohydrates, proteins and phenolic compounds, and does not interfere with metabolic activity of HepG2 and 3T3 cell lines, or with development of <i>Ceriodaphnia dubia</i> (R. 1894) or <i>Mysidopsis juniae</i> (S. 1979) microcrustaceans, suggesting its safety for these models.</p> <p><b>CONCLUSION:</b> EAQA is a safe and promising insecticidal extract to be considered in the management of different stages of <i>Ae. aegypti</i> and <i>Ae. albopictus</i> life cycle.</p> |                          |         |