

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DA BIODIVERSIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL
SUSTENTÁVEL – PRODER

ATIVIDADE INSETICIDA DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE
TAMBORIL (*Enterolobium contortisiliquum* (VELL.) MORONG) SOBRE O
***Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

FRANCISCO BERNARDO DE BARROS

CRATO

2023

FRANCISCO BERNARDO DE BARROS

**ATIVIDADE INSETICIDA DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE
TAMBORIL (*Enterolobium contortisiliquum* (VELL.) MORONG) SOBRE O
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional Sustentável (PRODER) da Universidade Federal do Cariri – UFCA, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Desenvolvimento Regional Sustentável.

Linha de Pesquisa: Meio Ambiente.

Sublinha: Controle de pragas agrícolas e urbanas, vetores de doenças ao homem e animal, manejo agroecológico de pragas e inventários da entomofauna.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Roberto de Azevedo

CRATO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.
Universidade Federal do Cariri.
Sistema de Bibliotecas

B277a Barros, Francisco Bernardo de.
Atividade inseticida dos extratos das sementes de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (VELL.) MORONG) sobre o *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) / Francisco Bernardo de Barros. – 2023.
75 f.: il. color.30 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Cariri, Mestrado em Desenvolvimento Regional Sustentável (PRODER), Crato, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Roberto de Azevedo.

1. Sustentabilidade. 2. Extratos vegetais. 3. Mosquito vetor. 4. Moléculas bioativas. I. Título.

CDD 363.70526

Bibliotecária: Glacínésia Leal Mendonça
CRB 3/ 925

FRANCISCO BERNARDO DE BARROS

ATIVIDADE INSETICIDA DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE TAMBORIL
(*Enterolobium contortisiliquum* (VELL.) MORONG) SOBRE O *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional Sustentável (PRODER) da Universidade Federal do Cariri – UFCA, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Desenvolvimento Regional Sustentável.

Linha de Pesquisa: Meio Ambiente.

Sublinha: Controle de pragas agrícolas e urbanas, vetores de doenças ao homem e animal, manejo agroecológico de pragas e inventários da entomofauna

Aprovado em: 21/06/2023

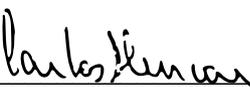
BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO ROBERTO DE AZEVEDO
Data: 10/08/2023 15:06:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Roberto de Azevedo - Orientador.
Universidade Federal do Cariri (PRODER/UFCA)

Documento assinado digitalmente
 ESTELITA LIMA CANDIDO
Data: 10/08/2023 13:43:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Estelita Lima Cândido - Membro Interno - UFCA
Universidade Federal do Cariri (PRODER/UFCA)


Prof. Dr. Carlos Henrique Morais de Alencar - Membro Externo - UFC
Universidade Federal do Ceará

*Dedico esse trabalho as mulheres da
minha vida: minha filha, Emily Lorena, minha
esposa, Liziene Silva e a minha mãe, Creuza Bernardo.*

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Liziene Silva, pela paciência, compreensão por eu passar tantas e tantas horas dedicado com o desenvolvimento desse trabalho e incentivo para sempre lutar pelos meus objetivos.

A minha filha Emilly, a maior razão da minha perseverança.

Aos meus pais, pelo esforço na minha educação e formação do meu caráter e, pelo incentivo a sempre seguir em frente.

A minha irmã, Cícera Keliciane de Barros, egressa do Mestrado em Desenvolvimento Regional Sustentável - PRODER, por todo apoio e conselhos.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Roberto de Azevedo, pelos valiosos ensinamentos, paciência e compreensão com meus atrasos no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu companheiro de pesquisas e de laboratório, Cicero dos Santos Leandro, pela parceria, amizade e, por me ajudar a carregar o fardo da vida de pai, professor, estudante e pesquisador.

Ao professor Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior, pelo suporte e permissão de uso do Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular – LABEM, UFCA.

A doutoranda Antônia Railene Souza Rodrigues, pela disponibilidade em me acompanhar no preparo dos meus extratos.

Aos meus colegas de curso, Leôncio, Rubens, Marcos, Renata e Priscila, pela parceria e troca de ideias.

Ao professor Dr. José Galberto Martins da Costa, pela permissão do uso do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri – URCA.

A UFCA, pelo espaço cedido para a realização da pesquisa que originou esse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado.

A todos(as) os(as) professores(as) do PRODER, pelos ensinamentos e incentivos.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”.

Jean Cocteau

RESUMO

Os inseticidas químicos sintéticos constituem a principal forma de controle do *Aedes aegypti*. Porém, seu uso apresenta diversas limitações, dentre elas, a toxicidade ambiental, risco à saúde humana e seleção de populações de insetos resistentes aos inseticidas. Tais fatores favorecem a crescente busca por substâncias naturais com propriedades inseticidas. Esse estudo avaliou a atividade inseticida dos extratos brutos das sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) sobre ovos e larvas do *A. aegypti* e, verificou o perfil fitoquímico e a presença de lectinas no extrato. *E. contortisiliquum* apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil. Suas sementes são conhecidas pela toxicidade, propriedades medicinais e proteínas bioativas. A extração dos compostos bioativos foi realizada em solução salina de NaCl 0,15 M, pela sua capacidade de solubilizar estas moléculas. Para o preparo do extrato bruto, vinte gramas do pó obtido da trituração das sementes foram homogeneizados por 4h a 25°, em 200 mL da solução salina. Os ovos de *A. aegypti* foram obtidos por meio de captura com armadilhas do tipo ovitrampa. Após as eclosões, as larvas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura de 25±1°C, umidade relativa do ar de 70±10% e fotofase de 12 horas. Para os ensaios com ovos e larvas de *A. aegypti*, o extrato bruto foi utilizado na forma crua (Raw Crude Extract - RCE) e fervida (Boiled Crude Extract - BCE) a 100° C por 5 min. Foram testadas as concentrações de 4,68; 9,37; 18,75; 28,13; 37,13 e 46,89 mg/mL, tendo a água destilada como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicada. Os testes de atividade larvicida foram realizados na câmara B.O.D. Os dados foram submetidos à análise de variância, Teste de Shapiro-Wilk, Teste de Tukey e análise Log-Probit para determinar as CL₅₀ e ₉₀ dos extratos. O BCE apresentou melhores resultados sobre os ovos do que o RCE, conseguindo impedir a eclosão das larvas de 81,66% ± 10,40% dos ovos tratados, na concentração de 46,89 mg/mL. O aumento da concentração melhorou os resultados do BCE contra os ovos. As respectivas CL₅₀ e ₉₀, foram definidas em 35,95 e 52,67 mg/mL, respectivamente. Nos testes com larvas, as concentrações de 46,89 e 37,13 mg/mL, para RCE e BCE, causaram 100% de mortalidade em 24 horas de exposição. O aumento da concentração melhorou a ação de RCE e BCE. A mortalidade larval nas demais concentrações teve acréscimo com o aumento do tempo de exposição para 48 h. A concentração e o tempo isolados, bem como sua interação são fatores significativos para a atividade larvicida dos extratos (p<0,001). Por apresentar melhor eficiência total (E=72,77), RCE, com 48 h de exposição é o extrato mais promissor sobre as larvas. 10,86 mg/mL de RCE com 48 h de exposição é a menor dose capaz de matar 90% das larvas (CL₉₀). Em RCE, a presença de lectinas e os metabólitos secundários: flavonóides, xantonas e fenóis, foram detectadas. Os resultados demonstram o potencial dos extratos das sementes de *E. contortisiliquum* na ação ovicida e larvicida sobre o *A. aegypti*.

Palavras-chave: Sustentabilidade. Extratos vegetais. Mosquito vetor. Moléculas bioativas.

ABSTRACT

Synthetic chemical insecticides are the main way to control *Aedes aegypti*. However, its use has several limitations, including environmental toxicity, risk to human health and selection of insecticide-resistant insect populations. Such factors favor the growing search for natural substances with insecticidal properties. This study evaluated the insecticidal activity of crude extracts of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) seeds on eggs and larvae of *A. aegypti* and verified the phytochemical profile and the presence of lectins in the extract. *E. contortisiliquum* has a wide geographic distribution in Brazil. Its seeds are known for their toxicity, medicinal properties, and bioactive proteins. The extraction of the bioactive compounds was performed in 0.15 M NaCl salt solution, for its ability to solubilize these molecules. To prepare the crude extract, twenty grams of the powder obtained from crushing the seeds were homogenized for 4 hours at 25°, in 200 mL of saline solution. *A. aegypti* eggs were obtained by capture with ovitrap-type traps. The larvae were hatched and kept in a B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) with a temperature of 25±1°C, relative humidity of 70±10% and a 12 hour photophase. For tests with eggs and larvae of *A. aegypti*, the crude extract was used in raw form (Raw Crude Extract - RCE) and boiled (Boiled Crude Extract - BCE) at 100° C for 5 min. Concentrations of 4.68; 9.37; 18.75; 28.13; 37.13 and 46.89 mg/mL, with distilled water as a negative control. Assays were performed in triplicate. Larvicidal activity tests were performed in the B.O.D. The data were submitted to analysis of variance, Shapiro-Wilk Test, Tukey Test and Log-Probit analysis to determine the LC₅₀ and ₉₀ of the extracts. BCE showed better results on eggs than RCE, managing to prevent the hatching of larvae in 81.66% ± 10.40 of treated eggs, at a concentration of 46.89 mg/mL. Increased concentration improved RCE's results against eggs. The respective LC₅₀ and ₉₀ were set at 35.95 and 52.67 mg/mL, respectively. In tests with larvae, concentrations of 46.89 and 37.13 mg/mL, for RCE and BCE, caused 100% mortality in 24 hours of exposure. Increased concentration improved RCE and BCE action. Larval mortality at other concentrations increased with increasing exposure time to 48 h. Concentration and time alone, as well as their interaction are significant factors for the larvicidal activity of the extracts (p<0.001). Due to its better total efficiency (E=72.77), RCE, with 48 h of exposure, is the most promising extract on larvae. 10.86 mg/mL of RCE after 48 h of exposure is the lowest dose capable of killing 90% of the larvae (LC₉₀). In RCE, the presence of lectins and secondary metabolites: flavonoids, xanthones and phenols, were detected. The results demonstrate the potential of *E. contortisiliquum* seed extracts in the ovicidal and larvicidal action on *A. aegypti*.

Keywords: Mosquito vector, Plant extracts, Phytochemistry, Secondary metabolites.

LISTA DE SIGLAS

ACE - Agentes de Combate às Endemias.

ACS - Agentes Comunitários de Saúde.

ANA - Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico.

ANOVA - Análise de variância.

AP - Amapá.

B.O.D. - Biochemical Oxygen Demand.

BTI - *Bacillus thuringiensis israelenses*.

CCAB - Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade.

CL₅₀ - Concentração Letal para matar 50% das amostras.

CLTI - Inibidor de tripsina tipo Kunitz isolado das sementes de *Cassia leiandra*.

cMOL - Lectina Coagulante de *Moringa oleifera*.

DE - Dengue Hemorrágica.

EcTI - Inibidor de Tripsina de *Enterolobium contortisiliquum*.

ELISA - Do inglês Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay.

FUNASA - Fundação Nacional da Saúde.

KDa - Kilo-Daltons (unidade de medida para massa molecular).

LaBEM - Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular.

LEA - Laboratório de Entomologia Agrícola.

LPPN - Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais.

MuBL - Lectina da entrecasca de *Myracrodruon urundeuva*.

MuHL - Lectina das sementes de *Myracrodruon urundeuva*.

ODM - Objetivos do Desenvolvimento do Milênio.

ODS - Objetivos do Desenvolvimento Sustentável.

ONU - Organização das Nações Unidas.

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde.

PIACD - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue.

pH - Potencial Hidrogeniônico.

PRODER - Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional Sustentável.

RMC - Região Metropolitana do Cariri.

RN - Rio Grande do Norte.

RPM - Rotações por Minuto.

SCD - Síndrome do choque da dengue.

SE - Semana Epidemiológica.

SGB - Síndrome de Guillain-Barré.

TE - Taxa de Eclosão.

UF - Unidade Federativa.

UFCA - Universidade Federal do Cariri.

URCA - Universidade Regional do Cariri.

WSMoL - Lectina solúvel em água de *Moringa oleifera*, do inglês Water Soluble *Moringa oleifera* lectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Região dorsal dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	18
Figura 2 - Diferenças anatômicas presentes nas cabeças de machos e fêmeas do <i>A. aegypti</i>	19
Figura 3 - Ciclo biológico do <i>A. aegypti</i>	20
Figura 4 - Frequência de dengue no mundo	22
Figura 5 - Países e territórios em que casos de chikungunya foram detectados desde 2020 .	23
Figura 6 - Locais que apresentam casos atuais e casos antigos de Zika	25
Figura 7 - Dimensões do Desenvolvimento Sustentável	28
Figura 8 - Os 17 objetivos de Desenvolvimento Sustentável	28
Figura 9 - Principais tipos de flavonóides	36
Figura 10 - <i>E. contortisiliquum</i> . A) Árvore; B) Fruto; C) Sementes	37

Manuscrito

Figura 1 - Atividade ovicida (%) dos extratos cru – RCE (A) e fervido – BCE (B) de <i>E. contortisiliquum</i> . Resultados expressos em média ± desvio padrão	56
Figura 2 - Atividade larvicida (%) do extrato cru – RCE durante 24 (A) e 48 h (B) e do extrato fervido – BCE durante 24 (C) e 48 h (D) de <i>E. contortisiliquum</i>	58

Apêndices

Figura 1 - Espécime de <i>E. contortisiliquum</i> do qual as sementes foram coletadas. Crato-CE, 2022	69
Figura 2 - Sementes de <i>E. contortisiliquum</i> com tegumento	70
Figura 3 - Eclosão das larvas	71
Figura 4 - Preparo do ensaio ovicida: Palheta de eucatex envolvida com papel filtro, positiva para a presença de ovos de <i>A. aegypti</i> A); Recortes do papel contendo ovos B); Ensaio em triplicata com copos contendo ovos e extrato bruto C); Secagem de ovos após exposição ao extrato bruto D)	73
Figura 5 - Ensaio larvicida com o extrato. Crato-CE, 2022	74
Figura 6 - Mudanças de coloração na análise fitoquímica do extrato	75

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1 - Médias e desvios padrões da atividade ovicida de RCE e BCE 57

Tabela 2 - Médias da atividade larvicida, eficiência total (E) % e concentrações inibitórias mínimas (CL₅₀ e ₉₀) dos extratos de *E. contortisiliquum* (RCE e BCE) durante 24 e 48 h sobre o *A. aegypti*. 59

Apêndices

Tabela 1 - Identificação de antocianinas, antocianidinas e flavonóides pela mudança de coloração. Crato-CE, 2022. 72

Tabela 2 - Identificação de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas pela observação da mudança de cor. Crato-CE, 2022. 73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 <i>Aedes aegypti</i>	18
3.2 Doenças transmitidas pelo <i>A. aegypti</i>	21
3.2.1 dengue	21
3.2.2 chikungunya	23
3.2.3 zika	24
3.2.4 febre amarela	25
3.3 O desenvolvimento sustentável e o combate ao <i>A. Aegypti</i>	26
3.4 Medidas de combate ao <i>A. Aegypti</i>	29
3.5 O potencial inseticida das sementes	32
3.5.1 Inibidores de proteases	33
3.5.2 Lectinas	34
3.5.3 Metabólitos secundários	35
3.6 <i>E. contortisiliquum</i>	37
4 REFERÊNCIAS	40
5 CAPÍTULO II: RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 Manuscrito	50
6 CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6.1 Conclusões gerais	67
6.2 Perspectivas de investigações futuras	67
7 ANEXOS	68
7.1 Comprovante de submissão do artigo	68
8 APÊNDICES	69
8.1 Metodologia estendida	69
8.2 Resultados detalhados da análise fitoquímica	74
REFERÊNCIA DA METODOLOGIA ESTENDIDA	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A ordem Diptera pertence à classe Insecta, uma das maiores e mais diversas, contendo cerca de 150 mil espécies identificadas. Essa ordem é muito abrangente e está presente em habitats variados de todos os continentes (CHAGAS, 2016).

Algumas destas espécies realizam hematofagia e podem transmitir vetores de agentes infecciosos para o ser humano, como é o exemplo do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), principal vetor da dengue, febre amarela, Zika e Chikungunya (SILVA *et al.*, 2019). Essas são as principais arboviroses endêmicas brasileiras. Somente em 2019, cerca de R\$ 2 bilhões foram empregados no combate a estas doenças (PINHEIRO *et al.*, 2020).

Mesmo com investimentos, foram detectados 1.450.270 casos prováveis de dengue, 174.517 casos de Chikungunya, até a 52ª Semana Epidemiológica (SE) e 9.204 casos de Zika até a 48ª (SE) do ano de 2022 no Brasil, e ainda foram contabilizados 1.016 óbitos em decorrência da dengue e 94 óbitos relacionados à Chikungunya, e uma morte associada à Zika, registrada no estado de Goiás (BRASIL, 2023).

A proliferação do *A. aegypti* e o conseqüente aumento de casos das arboviroses no Brasil está associada a problemas socioambientais da dinâmica das cidades. Destas, a grande maioria foi concebida sem o devido planejamento urbano e a infraestrutura não é adequada para o rápido crescimento populacional (ALMEIDA *et al.*, 2020). Soma-se a estes fatores a baixa cobertura de saneamento básico e a ausência de campanhas eficientes de controle vetorial (SILVA *et al.*, 2019).

A forma mais simples de se combater a disseminação do *A. aegypti* é pela eliminação dos criadouros. Quando esta medida não é suficiente para o controle do mosquito, é necessário o uso de inseticidas. No Brasil, o Ministério da Saúde distribuiu em 2023 às Unidades Federativas (UF), pastilhas do larvicida Espinosade para aplicação em depósitos de água. Para pontos estratégicos, foram distribuídos uma combinação dos inseticidas Clotianidina 50% + Deltametrina 6.5%. A combinação de Imidacloprido 3% + Praletrina 0,75% foi distribuída para a aplicação espacial (BRASIL, 2023).

A resistência aos inseticidas empregados no controle dos mosquitos é um desafio para à saúde pública, uma vez que o uso de inseticidas sintéticos ao longo de vários anos tem favorecido a seleção de populações de mosquitos resistentes (AFFELDT *et al.*, 2016; POSSEL, 2019; SILVA, 2019).

Diante dos problemas que o *A. aegypti* têm causado na saúde pública e, o recorrente surgimento de populações destes mosquitos, resistentes aos inseticidas disponíveis, é indispensável que novas opções seguras e eficientes para o combate deste vetor estejam disponíveis.

Neste sentido, as plantas e seus constituintes surgem como potenciais alternativas para o controle sustentável do mosquito. O Brasil é um país com rica flora e que fornece espécimes para muitos estudos que buscam obter moléculas para o desenvolvimento de novos produtos (ALMEIDA, 2015). Vários estudos utilizando extratos de plantas atestaram a capacidade das plantas de combater o *A. aegypti* (FARIAS *et al.*, 2010; AGRA-NETO *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2015; BILAL *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2020; TABOSA *et al.*, 2020; ALKENANI *et al.*, 2022). Estes resultados podem ser explicados pelo fato das plantas possuírem muitos compostos bioativos, como os metabólitos secundários e proteínas que atuam em mecanismos de defesa contra os insetos (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Entre as proteínas, as lectinas são capazes de reconhecer e se ligar a carboidratos livres ou presentes em glicoconjugados. Estas proteínas se destacam, dentre outras finalidades, pelas evidências de sua atividade inseticida (FREITAS *et al.*, 2011). As lectinas podem ser encontradas em todas as partes dos vegetais, mas as sementes se sobressaem pela facilidade na obtenção e grandes concentrações dessas proteínas. Apesar disso, as sementes ainda são relativamente pouco estudadas, quando comparadas a outros constituintes vegetais como folhas, cascas e raízes (CHAGAS, 2016).

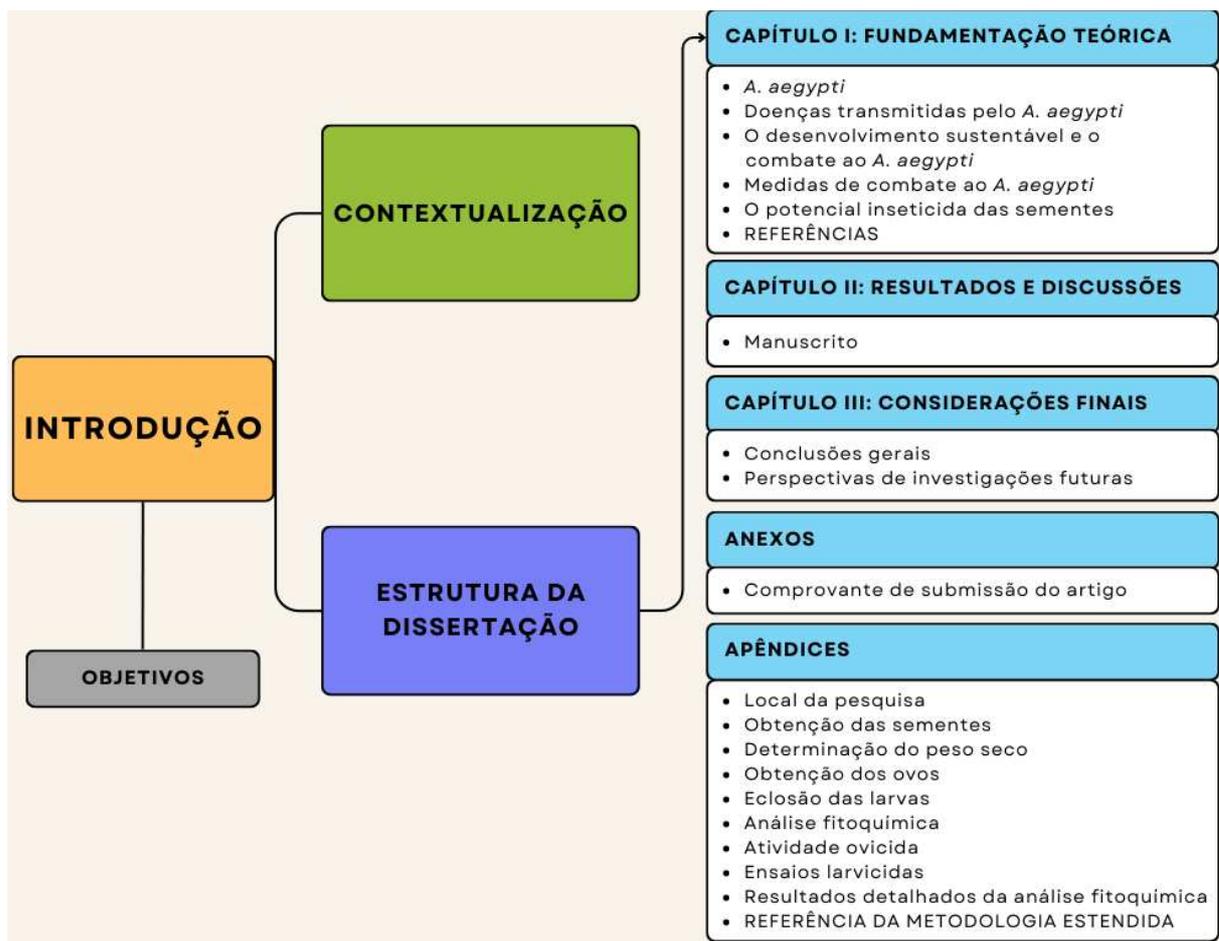
A facilidade de obtenção e a grande diversidade de sementes presentes na flora brasileira justificam a necessidade de mais estudos com a finalidade de testar seus extratos. Aliado a isso, alguns estudos demonstraram a eficácia dos extratos de sementes contra o *A. aegypti* (FARIAS *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2017; TABOSA *et al.*, 2020).

Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* Vell. Morong) é uma espécie arbórea muito presente no sertão brasileiro, cujas sementes são conhecidas pelo seu caráter tóxico. Saponinas (RAPOSO *et al.*, 2008), inibidores de tripsina (JÚNIOR *et al.*, 2017) e proteínas bioativas (LIMA *et al.*, 2007), estão presentes nas sementes dessa espécie. A combinação destes fatores confere as sementes de *E. contortisiliquum* o caráter citotóxico, inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antiparasitário e inseticida (ARAÚJO, 2007; LIMA *et al.*, 2007; MATLOUB *et al.*, 2018; TABOSA *et al.*, 2020).

O fato de *E. contortisiliquum* ser uma espécie ainda pouco estudada, suas sementes apresentarem um grande potencial toxicológico, e especialmente, possuir forte ação contra insetos, serviram de motivação para realização desta pesquisa.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação foi organizada em três capítulos: Fundamentação Teórica, Resultados e Discussões e Considerações Finais. Posteriormente aos capítulos, são apresentados os anexos e os apêndices. Neste último, consta os Materiais e Métodos de forma detalhada (Metodologia Estendida) como complemento à metodologia descrita no artigo publicado com os resultados da pesquisa. Consta ainda, resultados detalhados de alguns testes, que foram abordados de forma mais objetiva no artigo. O fluxograma a seguir descreve a organização da dissertação.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade inseticida dos extratos salinos das sementes de *E. contortisiliquum* sobre o mosquito *A. aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

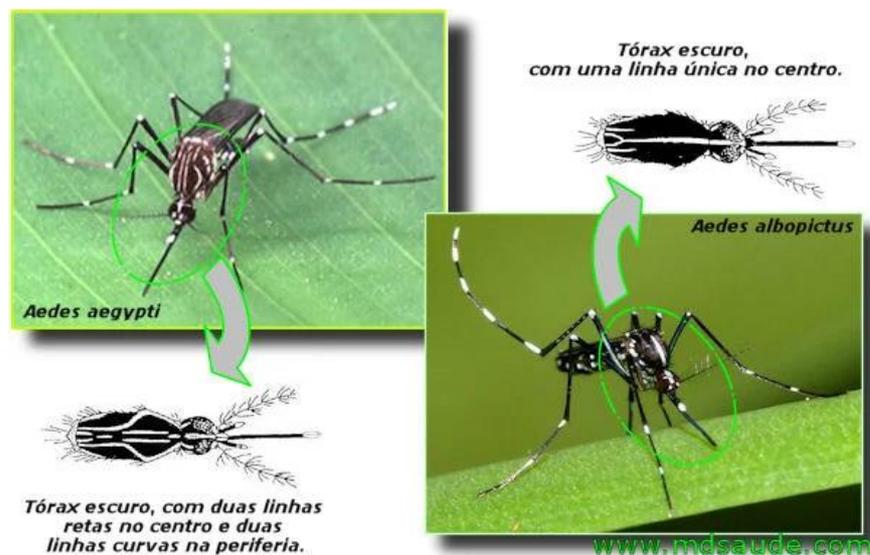
- Realizar a prospecção fitoquímica qualitativa e o teste de hemaglutinação;
- Investigar a presença de lectinas e metabólitos secundários nos extratos;
- Analisar a participação de proteínas bioativas nos extratos, antes e após desnaturação por aquecimento em banho maria;
- Determinar as concentrações letais mínimas (CL₅₀) e máximas (CL₉₀) dos extratos sobre ovos e larvas de *A. aegypti*.

3 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti*, juntamente com o *Aedes albopictus* Skuse ocupam posição de destaque dentro do gênero *Aedes*, que apresenta centenas de espécies cosmopolitas (CHAGAS, 2016). As fêmeas destas duas espécies são vetores da dengue, sendo que a primeira também transmite a febre amarela no Brasil (SILVA *et al.*, 2008). Apesar da semelhança morfológica entre as duas espécies, ambas podem ser facilmente identificadas através da visualização da disposição de listras na região dorsal dos mesmos como evidenciado na Figura 1.

Figura 1 – Região dorsal dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*



Fonte: <https://www.mdsauade.com/doencas-infecciosas/fotos-mosquito-dengue/>. Acesso em: 16 de junho. 2022.

O *A. albopictus* possui importância médica por transmitir a dengue na Ásia, mas é considerado vetor secundário nesse mesmo continente e em outras partes do mundo (CATÃO, 2012). Esta espécie possui uma distribuição geográfica mais abrangente do que o *A. aegypti*, já que é encontrado em ambientes suburbanos, rurais e silvestres. Além disso, é capaz de parasitar, além de humanos, bovinos, anfíbios, répteis e aves (GÓMEZ, *et al.*, 2022).

O *A. aegypti* é predominante em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma espécie oriunda do continente africano (BARRETO; TEIXEIRA, 2008), tendo sua introdução no continente americano ainda no período da colonização por meio das embarcações que chegavam desse continente (AFFELDT *et al.*, 2016; SILVA, 2019). No Brasil, a introdução do mosquito *A. aegypti* aconteceu, provavelmente, através dos navios negreiros que chegavam do continente africano (SILVA *et al.*, 2008). Os primeiros relatos de dengue no país surgiram entre

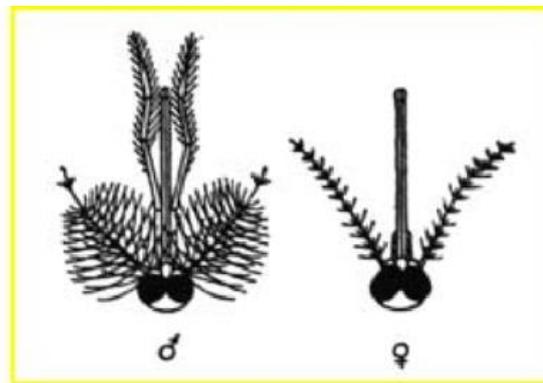
o final do século XIX e início do século XX, em Curitiba/PR e Niterói/RJ respectivamente, época em que a febre amarela era a doença transmitida pelo *A. aegypti* que mais preocupava (RIZZI *et al.*, 2017).

Apesar do longo tempo de prevalência do mosquito no país e das sucessivas epidemias de dengue e febre amarela, foi apenas em 1955, após campanha nacional para erradicação do mosquito que o Brasil conseguiu alcançar este objetivo (SILVA *et al.*, 2008). Novas epidemias foram registradas a partir de 1986 no Rio de Janeiro e algumas capitais do Nordeste, devido à reintrodução do mosquito no país entre 1981 e 1982 (RIZZI *et al.*, 2017).

O mosquito *A. aegypti* mede cerca de 1 cm, possui cor preta com listras brancas no corpo e nas pernas, sua picada não dói e nem coça, o adulto vive em média 45 dias e tem o hábito de picar no começo das manhãs e à tarde (SILVA *et al.*, 2008).

São artrópodes integrantes da ordem Díptera e da família Culicidae e tal qual outros integrantes dessa família, pode transmitir agentes patogênicos para os humanos, através da hematofagia realizada pelas fêmeas (CHAGAS, 2016). A Figura 2 apresenta as principais diferenças entre as estruturas presentes na cabeça de ambos os sexos dessa espécie, distinções estas que auxiliam na identificação.

Figura 2 - Diferenças anatômicas presentes nas cabeças de machos e fêmeas do *A. aegypti*.



Fonte: Syarifah *et al.* (2008)

A hematofagia constitui uma ingestão protéica necessária para que os ovos sejam formados (BRASIL, 2001) e é por meio da ingestão de sangue humano que a fêmea pode ingerir o agente etiológico de algumas arboviroses (SILVA *et al.*, 2008).

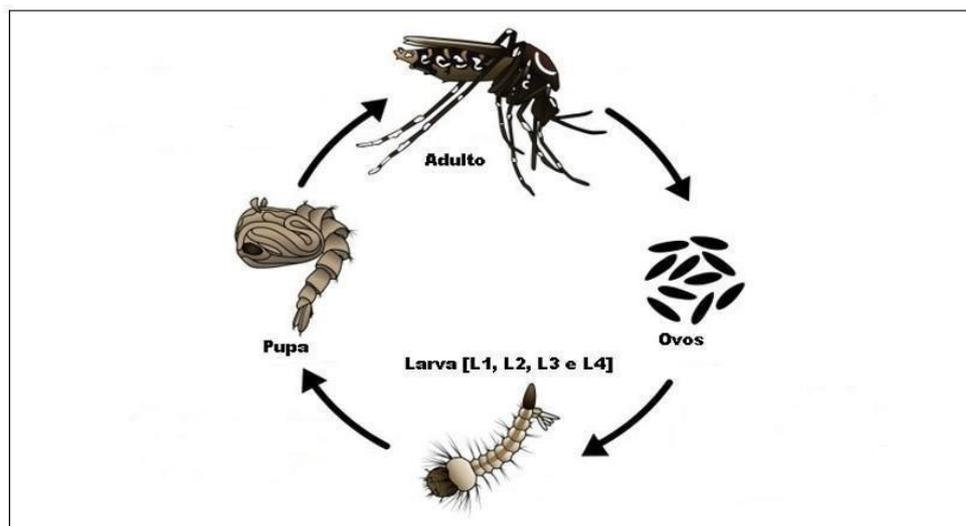
Semelhante aos machos deste mosquito, as fêmeas também se alimentam de seiva, no entanto, devido forte adaptação do mosquito ao convívio humano, a espécie se tornou

antropofílica, com forte predileção pelo sangue humano (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; CATÃO, 2012).

A adaptação do *A. aegypti* aos ambientes urbanos resultou na preferência pela postura dos ovos em criadouros artificiais como latas, vidros, vasos, caixas d'água e pneus (CATÃO, 2012). A fêmea põe ovos de 4 a 6 vezes ao longo de sua vida, sendo em média 100 ovos em cada postura (CATÃO, 2012). Nesses insetos, a temperatura tem forte papel no número de ovos em cada postura (CALADO; SILVA, 2002).

O desenvolvimento dos mosquitos acontece através de metamorfose completa (Holometabolia). O ciclo de vida do *A. aegypti* compreendendo quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvais), pupa e adulto (BRASIL, 2001). A Figura 3 demonstra de forma objetiva uma representação do ciclo biológico do *A. aegypti*.

Figura 3- Ciclo biológico do *A. aegypti*



Fonte: <https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>. Acesso em: 16 de junho. 2022.

Os ovos do *A. aegypti* são pequenos, medem cerca de 1 mm de comprimento e apresentam contorno alongado e fusiforme. As fêmeas depositam nas paredes internas dos criadouros, entre 1 e 5 mm da superfície da água, sendo que inicialmente são brancos, mas em pouco tempo adquirem a cor negra brilhante (BRASIL, 2001).

Em condições adequadas de umidade e temperatura, após 48 horas o desenvolvimento do embrião estará completo. O ovo então, adquire forte resistência aos fatores ambientais e a dissecação, resistindo por cerca de 450 dias até eclodir as larvas em condições de umidade adequadas (BRASIL, 2001; CATÃO, 2012).

A fase larval do *A. aegypti* é um período de crescimento e alimentação, principalmente de matéria orgânica presente na parede e no fundo do reservatório (BRASIL, 2001). O corpo

da larva é dividido em cabeça, tórax e abdome (SILVA, 2008). O desenvolvimento larval apresenta 4 fases: L1, L2, L3 e L4 e dura no máximo 5 dias (CATÃO, 2012; CHAGAS, 2016). Ao final da fase L4, por metamorfose, inicia-se o estágio de pupa, etapa em que o *A. aegypti* não se alimenta e permanece imerso na água. É a fase em que ocorre a metamorfose para o estágio adulto, durando de 2 a 3 dias (COSTA, 2001; CATÃO, 2012).

O mosquito adulto vive de 30 a 35 dias e após emergir da água, durante 24 horas, já pode acasalar. Uma única inseminação do cruzamento com um macho é suficiente para fecundar todos os ovos da fêmea durante todo o seu período de vida (CATÃO, 2012). Para que ocorra o desenvolvimento dos ovos, antes de cada postura é necessário que ocorra o repasto sanguíneo, com um intervalo de 3 dias entre a hematofagia e a postura dos ovos. Como nem sempre a fêmea adquire sangue suficiente de uma única pessoa, a mesma costuma picar mais de um hospedeiro, o que aumenta as chances de disseminação de vírus para humanos (BRASIL, 2001).

3.2 Doenças transmitidas pelo *A. aegypti*

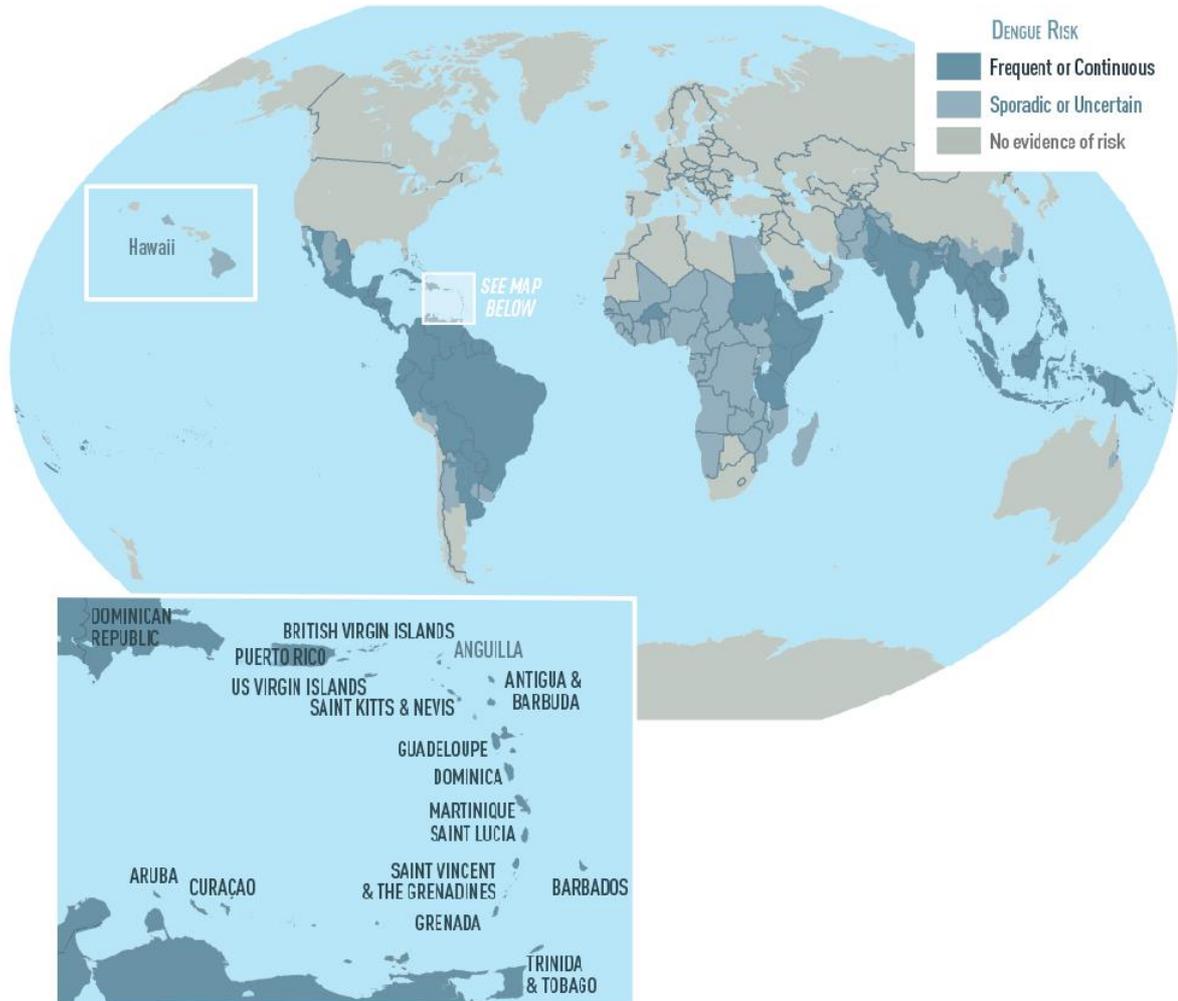
O mosquito *A. aegypti* possui importância médica por ser vetor de vírus causadores de sérias arboviroses em humanos. É o caso da dengue, que é causada pelos sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que pertencem à família Flaviviridae. (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Recentemente um novo sorotipo associado à dengue foi descoberto na Malásia, o DENV 5 (MUSTAFA *et al.*, 2015). Chikungunya, Zika e febre amarela também são veiculadas para humanos através da picada destes mosquitos. No caso da Febre amarela, outras espécies de mosquitos do gênero *Haemagogus* também transmitem a doença na sua forma silvestre (BRASIL, 2001; CHAGAS, 2016).

3.2.1 dengue

A dengue é uma doença infecciosa de abrangência em regiões tropicais do mundo, como pode ser observado na Figura 4. O primeiro registro de epidemia de dengue no Brasil, comprovada em laboratório, data de 1982 em Boa Vista (RO), quando na ocasião, foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Com a epidemia controlada, o sorotipo DENV-1 foi reintroduzido no país no ano de 1986, na cidade de Nova Iguaçu (RJ). Na mesma cidade, na década de 1990, o sorotipo DENV-2 foi introduzido no

Brasil. Esses dois sorotipos se espalharam para todos os estados brasileiros à medida que o *A. aegypti* se estabelecia nestes estados nos anos posteriores (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Figura 4- Frequência de dengue no mundo



Fonte: <https://www.cdc.gov/dengue/areaswithrisk/around-the-world.html>. Acesso em: 16 de junho. 2022.

A dengue pode ocorrer nas formas clássica e hemorrágica. Na forma clássica, os sintomas são febre alta, cefaléia, mialgia, prostração, dor retro-orbitária, artralgia e náusea (RIZZI *et al.*, 2017). Estes sintomas podem durar de 5 a 6 dias, com variação de 2 a 12 dias (CHAGAS, 2016). Já na dengue hemorrágica (DH), além dos sintomas da dengue clássica tem-se a presença de hemorragias (CATÃO, 2012). É uma infecção mais agressiva em que a resposta imune do paciente é capaz de provocar síndrome do choque da dengue (SCD). A dengue hemorrágica ou, dengue grave, é a forma da doença em que a presença do vírus leva o sistema imunológico da vítima a induzir uma reação inflamatória exacerbada que altera a

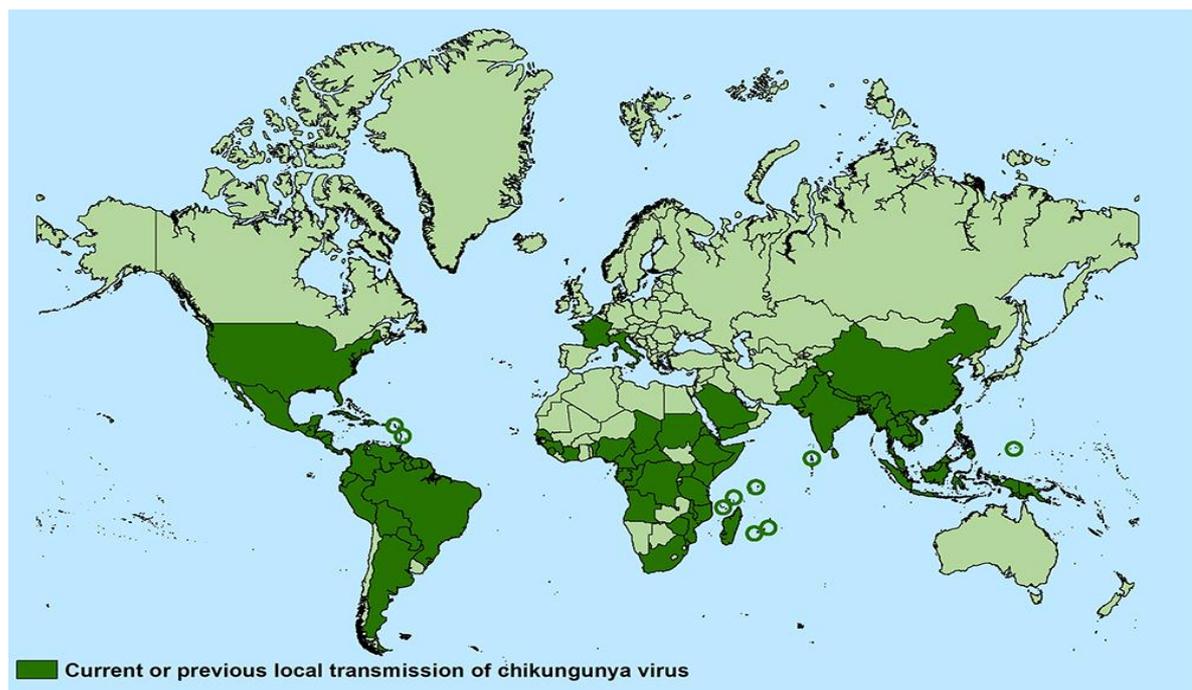
atividade coagulatória humana, resultando em hemorragias. Costuma acontecer quando o indivíduo é infectado uma segunda vez, por um sorotipo diferente (CHAGAS, 2016).

Em 2016, um novo sorotipo do vírus da dengue foi identificado e nomeado DENV-5 (SANTOS, 2016). O sorotipo 2 é mais propenso a desencadear a dengue hemorrágica. Estes 4 sorotipos são responsáveis por, somente no ano de 2022, o registro de 1.450.270 casos prováveis em todo o país, com 1.016 óbitos confirmados e outras 109 mortes sob investigação (BRASIL, 2023). Estima-se que anualmente, a nível mundial, a doença cause cerca de 50 milhões de infecções, representando um sério problema de saúde pública (RIZZI *et al.*, 2017).

3.2.2 *chikungunya*

A chikungunya é provocada pelo vírus (CHIKV), um Alfavírus originário da África que foi isolado pela primeira vez em 1952, na Tanzânia. No Brasil, o vírus foi detectado em pacientes infectados pela forma autóctone em setembro de 2014 na cidade de Oiapoque (AP). Desde então, têm sido registrados casos da doença em todo o país (HONÓRIO *et al.*, 2015). Observa-se na Figura 5 o mapa com os países e territórios em que casos de chikungunya já foram reportados.

Figura 5 - Países e territórios em que casos de chikungunya foram detectados desde 2013



Fonte: CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/index.html>. Acesso em: 18 de junho, 2022.

O nome chikungunya tem origem do dialeto makonde, um dos dialetos falados no sudeste da Tanzânia, e significa "curvar-se para frente ou contorcer-se", uma referência aos movimentos corpóreos feitos por alguns pacientes, como consequência das fortes dores nas articulações (SOUZA *et al.*, 2020)

A doença não manifesta sintomas em cerca de 25% dos pacientes. Na forma sintomática, os sintomas duram de 7 a 15 dias e incluem febre, erupção cutânea, cefaléia, fotofobia e artralgia incapacitante (PIALOUX *et al.*, 2007).

Mesmo após a recuperação da infecção aguda, para 10 a 12% dos pacientes, sintomas como dores, rigidez e edemas nas articulações podem durar de meses até anos (CHAGAS, 2016). Estudos demonstram que em aproximadamente 5% dos pacientes, este quadro pode evoluir para artrite reumatóide (PIALOUX *et al.*, 2007).

No Brasil, em 2022, até a SE 52 foram contabilizados 174.517 casos, com 94 óbitos confirmados e outras 15 mortes sob investigação. Destas mortes, 39 ocorreram no estado do Ceará (BRASIL, 2023).

3.2.3 zika

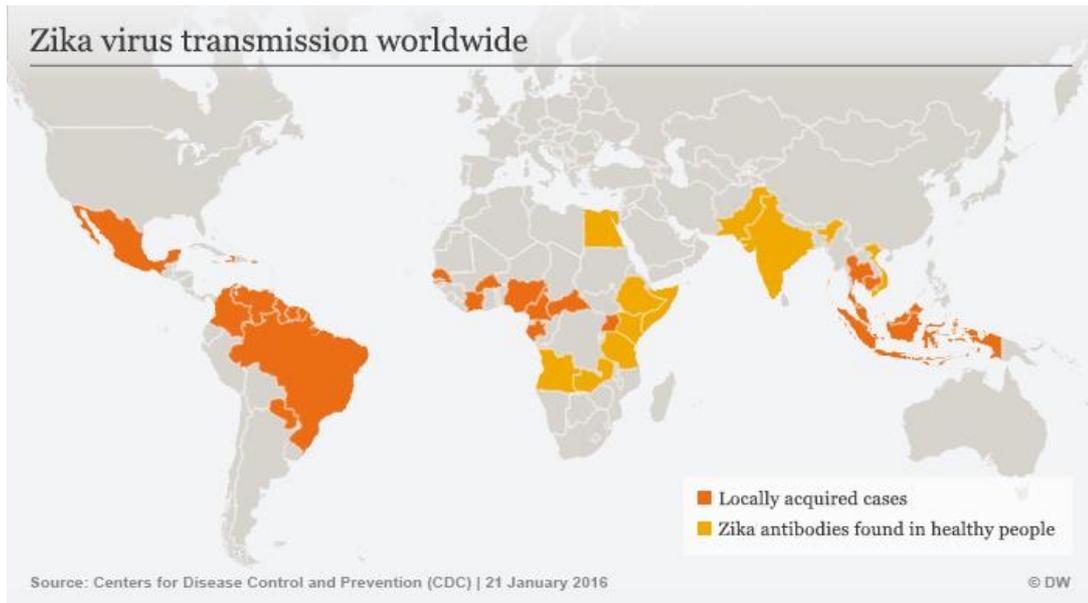
É provocada pelo vírus Zika (ZIKV), um Flavivirus da família Flaviviridae isolado pela primeira vez em 1947, mediante amostra de sangue de um macaco Rhesus na floresta zika, em Uganda (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015).

A infecção não causou grandes preocupações fora do continente africano até o ano de 2007 quando cerca de 73% da população da ilha Yap na Micronésia, foram acometidos por um grande surto de zika (DUFFY *et al.*, 2009; CHAGAS, 2016).

No Brasil, os primeiros casos da zika foram notificados no ano de 2014, em vários centros urbanos do Nordeste brasileiro, se espalhando ao longo do ano de 2015 para outros municípios do país (HEUKELBACH *et al.*, 2016). Ainda em 2015 o Ministério da Saúde estimou em cerca de 1,3 milhão de casos suspeitos. No mesmo ano o ZIKV foi isolado de um paciente da cidade de Natal (RN), o que comprovou a circulação do vírus no país (HEUKELBACH *et al.*, 2016).

Tal como outras arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*, esta doença apresenta prevalência em países ou regiões tropicais, como apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Locais que apresentam casos atuais e casos antigos de Zika



Fonte: CDC. Disponível em: <https://www.dw.com/en/who-expects-zika-virus-to-spread-through-americas-except-canada-and-chile/a-19002259>. Acesso em: 18 de junho, 2022.

Os sintomas da zika incluem febre baixa, dor de cabeça, dores leves nas articulações, manchas vermelhas na pele, prurido e vermelhidão nos olhos (RIZZI *et al.*, 2017). Apesar de que a doença não costuma evoluir para quadros graves, foram relatados casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB), em pacientes da Polinésia Francesa e nas epidemias recentes no Rio Grande do Norte e na Bahia (Brasil) (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015).

A relação entre a infecção pelo vírus Zika com casos de microcefalia em neonatos foi confirmada em 2015 pelo Ministério da Saúde. Na ocasião, pesquisadores identificaram a presença do vírus em amostras de sangue e tecidos de um recém-nascido que apresentava microcefalia e outras malformações congênitas (BRASIL, 2015).

O Brasil contabilizou 9.204 casos prováveis de infecções pelo vírus Zika no ano de 2022 (BRASIL, 2023). Esses dados demonstram que o vírus ainda representa grave risco à saúde pública e reforça a necessidade do combate ao mosquito vetor.

3.2.4 febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa endêmica das florestas tropicais da América e África que costuma causar surtos e epidemias isoladas (VASCONCELOS, 2003).

É causada por um vírus da família Flaviridae. Se apresenta nas formas urbana (que tem o *A. aegypti* como vetor) e silvestre (vírus transmitido por mosquitos do gênero *Haemagogus*) (CHAGAS, 2016).

No Brasil a forma urbana foi erradicada mediante vacinação, ainda assim o país possui a maior área de transmissão da doença na forma silvestre do mundo. A circulação desse vírus na população permite a possibilidade de o vírus da forma silvestre migrar para o *A. aegypti* através de pessoas infectadas (CHAGAS, 2016).

Um surto entre 2016 e 2017 provocou o aumento do número de casos da doença no Brasil. Na ocasião, cerca de 772 casos foram registrados, contabilizando 262 óbitos (MOREIRA *et al.*, 2020).

Entre 2022, até a SE 50, foram notificados 158 casos suspeitos da doença em humanos, mas sem nenhuma confirmação. No entanto, no mesmo período foram notificados 686 casos envolvendo primatas não-humanos, com 0,3% dos casos apresentando conformação laboratorial da doença (BRASIL, 2023).

Apesar de haver vacina eficaz na prevenção desta doença, tem-se percebido uma queda no número de doses aplicadas em decorrência da baixa adesão popular. O crescimento na disseminação de notícias falsas em perfis de redes sociais, que geram medo na população, estão relacionados com a redução na quantidade de doses aplicadas (SACRAMENTO; PAIVA, 2020).

3.3 O desenvolvimento sustentável e o combate ao *A. Aegypti*

A dengue e as demais arboviroses veiculadas pelo mosquito *A. aegypti* costumam ter sua ocorrência em países tropicais (JOHANSEN; DO CARMO, 2012) como no Brasil. No entanto, o fator climático não é o único fator determinante para estas doenças terem se tornado endêmicas desse país. Nesse contexto, Carmo (2009) argumenta que o processo de urbanização do país, com infraestrutura inadequada e abastecimento de água e coleta de lixo deficitária, favoreceu a proliferação de criadouros do mosquito vetor.

Uma vez estabelecido e com plenas condições para procriação, fatores como a baixa adesão popular às campanhas de combate ao vetor e a resistência aos inseticidas disponíveis, explicam a dificuldade das autoridades em erradicar essas doenças. Dessa forma, pode-se afirmar que “a gênese” desse problema se encontra no desenvolvimento insustentável do Brasil.

Segundo Feil; Schreiber (2017) a palavra sustentabilidade é um termo que representa a preocupação com a qualidade do sistema que engloba meio ambiente e ser humano e, avalia

suas propriedades e características que abrangem três aspectos: ambiental, social e econômico. Porém, para se compreender como estas preocupações surgiram e como a sustentabilidade tem papel crucial no combate às arboviroses, é preciso entender que o ser humano mantém uma relação antiga e muito próxima com o meio ambiente. As implicações dessa relação são indesejáveis para ambos, pois a humanidade sempre buscou atender às suas demandas, mas sem pensar em consequências (CORREIA; DIAS, 2017).

Segundo Vianna (2015), a partir da segunda metade do século XX vários estudiosos começaram a manifestar preocupação com o futuro do planeta e da humanidade, em decorrência da exploração desenfreada do meio ambiente pelo ser humano. Como resultado, foram realizadas conferências e publicações que objetivavam alertar a humanidade para as futuras consequências das ações humanas no meio ambiente. Dentre estas conferências e documentos, Sachs (2012) aponta a Conferência de Estocolmo em 1972, o relatório “Nosso Futuro Comum” (Our Common Future) pela Comissão Brundtland, e a Eco 92, ou “Rio 92”, como reflexos destas preocupações. Logo, pode-se afirmar que os ideais voltados para a sustentabilidade deram origem ao chamado: Desenvolvimento sustentável.

Inicialmente, a ideia de desenvolvimento sustentável foi entendida como o desenvolvimento de uma sociedade capaz de satisfazer as suas necessidades sem comprometer a sobrevivência das gerações futuras (BROWN, 1981; WCED, 1987). Segundo esse pensamento, o crescimento econômico deve levar em consideração três dimensões, apontadas por Sachs (2009) como: dimensão social, ecológica e econômica. A Figura 7 demonstra como estas dimensões se sobrepõem.

Figura 7 - Dimensões do Desenvolvimento Sustentável.



Fonte: http://www.energiasrenovaveis.com/images/upload/manual_boas_praticas_EE.pdf. Acesso em: 16 de junho. 2022

Uma iniciativa diretamente ligada aos ideais do desenvolvimento sustentável teve início no ano 2000 e denominava-se: Objetivos do Desenvolvimento do Milênio (ODM). Tratou-se de um projeto liderado pela Organização das Nações Unidas (ONU) que contou com o apoio dos governos de mais de 180 países (UNITED NATIONS, 2014). A iniciativa era organizada em um conjunto de metas que buscava atingir oito objetivos voltados para o desenvolvimento social e a erradicação da pobreza extrema no mundo, entre os anos de 2000 até 2015 (SOUZA, 2015).

Nem todas as metas dos ODM puderam ser atingidas a nível global, mas os avanços promovidos no Brasil com o intuito de atingi-las produziram significativo progresso em muitos aspectos do desenvolvimento social (SOUZA, 2015). Exemplo disso diz respeito ao objetivo 1 (Acabar com a fome e a miséria) e ao objetivo 6 (Combater a AIDS, a malária e outras doenças), pois o país se tornou referência mundial nas políticas de enfrentamento a AIDS, conseguiu controlar a malária, diminuiu a incidência dos casos de tuberculose e criou programas de enfrentamento contra a dengue (ODM-BRASIL, 2015). Em relação ao combate à dengue, embora tenham ocorrido avanços, os números recentes revelam que esta e outras arboviroses ainda prevalecem forte em todo país (LEANDRO *et al*, 2020).

Após o fim da iniciativa dos ODM, através da publicação do documento: “Transformando o nosso mundo: a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável” foram apresentados ao mundo os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) (Figura 8). Essa nova iniciativa surgiu com o objetivo de dar continuidade à experiência positiva obtida com os ODM, contemplando 17 objetivos que, pela proposta, devem ser atingidos até 2030 (UNDP, 2016).

Figura 8 - Os 17 objetivos de Desenvolvimento Sustentável



Fonte: <https://www.ufms.br/ufms-vincula-projetos-de-pesquisa-objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel-ods-da-onu/>. Acesso em: 16 de junho, 2022.

Destaca-se que, na perspectiva da erradicação das arboviroses veiculadas pelo *A. aegypti*, atingir as metas dos ODS mostra-se essencial para essa finalidade. Nesse sentido, os objetivos 1, 3, 4, 6, 10, 11 e 15, lidam diretamente com os fatores que favorecem a proliferação desse mosquito. Como exemplo, podemos citar as políticas de promoção à saúde, educação, acesso à água e saneamento, formação de cidades sustentáveis e inteligentes, e o uso sustentável dos recursos naturais para a obtenção de produtos aliados no combate ao vetor, como diretrizes defendidas pelos ODS supracitados.

Sachs (2009) defende o uso de recursos naturais de forma sustentável, promovendo a formação das chamadas sociedades de biomassa, em que o uso consciente dos recursos naturais deve se fazer presente, utilizando ao máximo as ciências de ponta. Dessa forma, os objetivos dessa pesquisa vão de encontro com os princípios do desenvolvimento sustentável ao buscar uma alternativa que faz uso de recursos naturais no combate ao *A. aegypti*, cujo controle tem se mostrado desafiador.

3.4 Medidas de combate ao *A. aegypti*

O Brasil possui um longo histórico de políticas e ações no intuito de erradicar o mosquito *A. aegypti*. Há registros destas medidas sendo implementadas ainda no começo do século XX, quando entre os anos de 1902 a 1907, o Sanitarista Oswaldo Cruz era diretor geral de saúde pública (cargo equivalente ao do atual ministro da saúde). A estratégia adotada foi a formação de brigadas que objetivavam identificar casos de febre amarela no país e eliminar focos do vetor (SILVA *et al.*, 2020).

Os resultados dos esforços no combate do *A. aegypti* foram positivos e, em 1955, o mosquito foi erradicado do país. Para isso, foi fundamental a parceria estabelecida com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), mediante o programa de erradicação do *A. aegypti* (SILVA *et al.*, 2020).

As ações desenvolvidas foram bem-sucedidas no combate ao vetor, porém, falhas na vigilância epidemiológica culminaram na reintrodução deste inseto no país em meados de 1976 (SILVA *et al.*, 2020).

Com a criação da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) em 1990, ficou sob a responsabilidade da mesma coordenar as ações de combate à dengue. A partir daquele momento, o Ministério da Saúde e a FUNASA elaboraram e executaram várias ações voltadas para o controle da dengue no Brasil, como o Plano de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa) em 1996; o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) em 2001; Programa

Nacional de Controle da Dengue (PNCD) em 2002. Todos com baixo ou nenhum avanço significativo no combate do mosquito (FERREIRA *et al.*, 2009).

Atualmente, o controle do mosquito é realizado pelos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e pelos Agentes de Combate às Endemias (ACE), mediante visitas domiciliares, nas quais, são realizadas buscas por criadouros do mosquito e de objetos acumuladores de água parada que possuam potencial para se tornarem foco de mosquitos do *A. aegypti*. Quando encontrado, o foco é eliminado e, em seguida, dados são coletados para auxiliar no traçado das ações de combate às arboviroses (SANTOS *et al.*, 2016).

No Brasil, dentre as quatro principais arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*, apenas contra a zika não há vacinas disponíveis no momento. Contra a febre amarela, uma vacina é utilizada na prevenção da doença. Contra a dengue e a chikungunya, há vacinas aprovadas (ANVISA, 2023; SCHNEIDER *et al.*, 2023).

Apesar dos investimentos em vacinas, o controle do mosquito vetor tem sido a primeira medida adotada com a finalidade de prevenir estas doenças (CHAGAS, 2016). Trata-se de impedir que a reprodução do vetor aconteça, por meio da eliminação dos criadouros. Para isso, estratégias como o uso de inseticidas químicos, armadilhas, insetos estéreis, mosquiteiros e feromônios, vêm sendo implementadas (WERMELINGER; FERREIRA, 2013). Além dessas estratégias, é fundamental também o incentivo à população para adoção de medidas de controle mecânico, tais como: o uso de telas em portas e janelas e, a proteção individual (uso de repelentes e roupas protetoras) (ZARA *et al.*, 2016).

Ações educativas também vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos no Brasil, objetivando tornar a população aliada no combate ao *A. aegypti*. Nesse sentido, Alecrim *et al.* (2016) destaca que apenas levar conhecimento sobre os cuidados com o vetor não produz uma mudança significativa no comportamento das pessoas. É necessário então, que haja uma reformulação das ações educativas, para tornar estas medidas mais efetivas.

A baixa adesão da população às ações de combate ao vetor torna as estratégias de manejo ambiental e a utilização de produtos biológicos e químicos, no Brasil e em outros países, as principais medidas voltadas para a eliminação do mosquito (LIMA *et al.*, 2021).

No que diz respeito ao manejo químico, o uso de larvicidas sintéticos é medida importante no controle das populações do *A. aegypti* (SOMBIÉ *et al.*, 2019; PINEDA-CORTEL *et al.*, 2019). Porém, devido à alta demanda essas substâncias são propensas a resistência do mosquito, além da possibilidade de afetarem espécies não-alvo e de se acumularem no ambiente e contaminar o solo e as águas fluviais (GOMES, 2014; PINEDA-CORTEL *et al.*, 2019;

MOYES *et al.*, 2017; ALKENANI *et al.*, 2022). Estas limitações demandam o uso racional destas substâncias, além da busca de alternativas mais sustentáveis contra o vetor.

Os riscos e desvantagens do uso de inseticidas no combate ao *A. aegypti*, requerem o uso de produtos que apresentem alta prevalência contra o vetor e baixa toxicidade para os demais organismos. Devem também oferecer rentabilidade e sustentabilidade ambiental (CHAGAS, 2016; SILVA *et al.*, 2017).

Na tentativa de reduzir esses riscos, o uso inteligente de inseticidas contra o *A. aegypti* torna-se uma possibilidade. Os mosquitos dispersores dessas substâncias vêm sendo utilizados com sucesso na forma experimental. A técnica consiste em atrair as fêmeas do vetor até recipientes tratados com o regulador de crescimento piriproxifeno. As partículas do inseticida grudam nas fêmeas e caem na água dos criadouros no momento da oviposição, o que provoca a mortalidade das larvas (DEVINE *et al.*, 2009; ABAD-FRANCH *et al.*, 2015)

O controle biológico é outra abordagem alternativa ao uso dos inseticidas. Nesse contexto, o uso dos esporos letais da bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI - Sumitomo Corporation®) é um método alternativo aos inseticidas convencionais contra as larvas do *A. aegypti*. Trata de um inseticida biológico específico para a ordem Diptera (CARVALHO *et al.*, 2020) e, portanto, menos agressivo contra os demais organismos. O produto encontra-se disponível no Brasil.

Quanto ao uso do BTI, Zara *et al.*, (2016) destaca que não há evidências suficientes de que esse método isolado possa impactar na mortalidade do vetor em longo prazo. É possível que este produto seja melhor aproveitado quando utilizado em sinergia. Esta proposta foi testada no estudo realizado por Carvalho *et al.*, (2020), onde foi verificada a mortalidade das larvas do *A. aegypti* pelo uso do BTI em associação com a predação das mesmas pelas ninfas de libélulas (Ordem Odonata) e os resultados foram promissores.

Ainda sobre o controle biológico do *A. aegypti*, outros dois métodos se encontram disponíveis atualmente, sendo eles: o uso da bactéria simbiote de insetos do gênero *Wolbachia* (ZARA *et al.*, 2016) e o uso de peixes larvófagos. Essa última alternativa apresenta limitações, como a necessidade de o criadouro de larvas precisar ser um tanque de grandes proporções (NETO *et al.*, 2019).

O saneamento básico uma relevante ferramenta de saúde pública, visto que a ausência do mesmo está relacionada a sérias enfermidades como: febre tifóide, febre paratifóide, poliomielite, hepatite A, leptospirose, esquistossomose, difilobotríase, filariose, malária e as arboviroses (febre amarela, dengue, chikungunya e zika) (DEY *et al.*, 2019). Dessa forma, o

investimento em saneamento básico pode ser um importante aliado no controle da proliferação do *A. aegypti*.

A coleta de lixo é outro fator importante no combate às arboviroses. Diversos materiais presentes nos resíduos urbanos podem servir de criadouros para reprodução do *A. aegypti* nos períodos de chuva, como pneus abandonados, que podem facilmente acumular água (SOBRAL *et al.*, 2019).

Com relação a saneamento básico, coleta de lixo e distribuição de água tratada, Tauil (2001) afirma que quando estes serviços se encontram ausentes ou são ineficientes, tem-se como consequência o aumento dos criadouros do mosquito.

De acordo com a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA, 2020), no Brasil, estes serviços ainda apresentam carências, pois 83,6% da população conta com abastecimento de água; 53,2% dispõe de coleta de esgoto e 98,8% da população urbana possui serviço de coleta de resíduos domiciliares.

Almeida *et al.* (2020) destaca que a urbanização no Brasil ocorreu de forma desordenada e sem planejamento, o que tem causado problemas como a falta de abastecimento de água e de esgotamento sanitário, além de ocupações irregulares. Estas características têm provocado um crescimento urbano das cidades brasileiras com características propícias para o estabelecimento de mosquitos vetores. Os dados da ANA podem ser reflexo desse crescimento desorganizado.

3.5 O potencial inseticida das sementes

Ao longo dos anos, várias substâncias potencialmente tóxicas para insetos foram obtidas a partir das plantas (BARBOSA *et al.*, 2014; FARIAS *et al.*, 2014; CHAGAS, 2016; MACEDO *et al.*, 2015). Delas, vários constituintes vegetais podem ser utilizados, porém, as folhas são frequentemente mais estudadas, de modo que, as sementes, embora ricas em metabólitos secundários e proteínas, ainda são pouco estudadas (BARBOSA *et al.*, 2014).

Para a obtenção do extrato vegetal, vários solventes podem ser utilizados como extratores, tais como etanol, metanol, hexano, clorofórmio, dentre outros. A extração salina tem sido empregada em estudos que objetivam solubilizar proteínas (AGRA-NETO *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2014; CHAGAS, 2016; ALVES *et al.*, 2020). Esse método é vantajoso por favorecer a extração de proteínas globulinas, como é o caso das lectinas, que são conhecidas por sua diversidade de usos biotecnológicos. Essas proteínas são encontradas em boas quantidades nas sementes de leguminosas (SILVA *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Farias *et al.*, (2010), os extratos aquosos de quinze sementes de plantas leguminosas tiveram sua ação inseticida testada contra o *A. aegypti*. Todos os extratos demonstraram ação larvicida, sendo que os extratos de *Amburana cearensis*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Dioclea megacarpa* e *Piptadenia moniliformis* mataram 100% das larvas após três horas de exposição.

Em estudo feito por Barbosa *et al.*, (2014), vinte extratos de sementes demonstraram ação contra o *A. aegypti*. Recentemente, Chagas (2016) analisou a atividade dos extratos salinos das sementes de *Prosopis juliflora* DC, *Adenanthera pavonina* L., *Clitoria fairchildiana* Howard, *Delonix regia* Bojer, *Canavalia ensiformis* DC e *Leucaena leucocephala* (Lam.) Wit. e confirmou as ações ovicida, larvicida e pupicida.

A efetividade das sementes contra insetos está relacionada com a sua constituição, uma vez que apresentam diversas moléculas de interesse científico, como os inibidores de proteases, as lectinas e os metabólitos secundários.

3.5.1 Inibidores de proteases

Gomes *et al.* (2016) aponta a evolução das plantas como o segredo para sua efetividade contra insetos. Elas precisaram desenvolver ao longo do tempo mecanismos de defesa contra o ataque de potenciais herbívoros, como é o caso dos insetos. Entre estes mecanismos de defesa, os inibidores moleculares se destacam. São proteínas/enzimas encontradas em diversos seres vivos e que desempenham funções variadas na estrutura das plantas. Nelas, atuam tanto na resposta contra fatores abióticos, como na defesa contra insetos-praga (CHAGAS, 2016).

Os intestinos dos insetos constituem uma fonte de alvos moleculares para os inibidores presentes no organismo dos vegetais. Na sua constituição se encontra a matriz peritrófica, uma membrana que separa o conteúdo do lúmen do intestino, das células digestivas epiteliais de revestimento do intestino médio. Esta membrana está presente nos insetos de um modo geral e possui na sua constituição, várias substâncias que são alvo destes inibidores (AMORIM, 2007).

Dentre estes inibidores podem-se destacar as quitinases, que são moléculas presentes em uma série de organismos, a exemplo das plantas. Elas têm sido testadas no combate ao *A. aegypti*, pelo fato de serem capazes de clivar a quitina, um polissacarídeo estrutural abundante no exoesqueleto dos insetos (DUKARIYA; KUMAR, 2020). Esta molécula tem papel importante na integridade e permeabilidade da matriz peritrófica (LEHANE, 1997). Proteínas que se ligam à quitina possuem o potencial de alterar propriedades físicas da mesma, causando a morte dos insetos.

Também tem sido estudada a atividade sinérgica entre as quitinases e outros compostos. Acredita-se que elas potencializam a ação inseticida ao provocar fissuras no exoesqueleto dos insetos. Isso permite uma melhor difusão do inseticida (RAMÍREZ-SUERO *et al.*, 2019).

Tripsina e quimotripsina são as enzimas digestivas mais abundantes em larvas de *A. aegypti*. Essas moléculas tornam-se importantes aliadas no combate do *A. aegypti* pela sua capacidade de se ligar e inibir a atividade digestiva dos insetos (SASAKI *et al.*, 2015).

Extratos de plantas que apresentam inibidores de tripsina e quimotripsina são uma opção no combate ao *A. aegypti*. Como exemplo, podemos citar a *Adenantha pavonina* Linn. As sementes desta planta apresentam tais inibidores e os extratos das mesmas apresentaram potencial tóxico contra o *A. aegypti* (SASAKI *et al.*, 2015).

No trabalho realizado por Dias *et al.*, (2017), o inibidor de tripsina CLTI obtido das sementes de *Cassia leiandra* Benth. foi purificado e testado contra larvas de *A. aegypti*. No estudo, foi detectada a atividade larvicida por inibição de proteases larvais.

Já no estudo realizado por Chagas (2016), todas as sementes apresentaram proteínas com potencial bioativos, como lectinas, proteínas ligantes à quitina e inibidores de enzimas digestivas (tripsina e quimiotripsina), o que justifica os resultados positivos.

No trabalho realizado por Farias *et al.* (2010) foram detectados inibidores de tripsina e outras moléculas importantes nas sementes estudadas que podem ser apontadas como responsáveis pela ação inseticidas dos extratos testados.

Em decorrência dos excelentes resultados verificados nos estudos citados, Farias *et al.* (2010) alerta para a importância de se estudar melhor as sementes na perspectiva de prospectar novos compostos viáveis contra o *A. aegypti*.

Como demonstrado em várias pesquisas, as sementes podem ser importantes aliadas contra os insetos. NASCIMENTO *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2015; CHAGAS, 2016; BILAL *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2020; CAVALCANTI *et al.*, 2021,

3.5.2 Lectinas

As lectinas são proteínas componentes do metabolismo primário dos vegetais que desempenham vários papéis nestes organismos, entre eles, a defesa do vegetal contra herbívoros. Contra os insetos, as lectinas são capazes de alterar a fisiologia desses animais, o que leva à morte pelo mal funcionamento do organismo. Estas características tornam as lectinas moléculas com importante ação inseticida (DE CONINCK; VAN DAMME, 2021).

Trata-se de proteínas capazes de se ligar de maneira específica a mono e polissacarídeos. Como as lectinas podem se ligar à quitina, importante polissacarídeo componente do exoesqueleto dos insetos, são capazes de interferir na sua fisiologia (BARROS *et al.*, 2020). Uma característica importante das lectinas é que elas provocam hemaglutinação quando em contato com eritrócitos, o que permite detectá-las por técnicas que utilizam este princípio (FARIAS *et al.*, 2010).

No estudo de Paiva *et al.*, 2011, foram estudadas as lectinas presentes nas sementes de *Opuntia ficus indica* Cladodes. (OfIL) e de *Moringa oleífera* Lam. (WSMoL e cMOL), no qual foi comprovado que essas duas lectinas são capazes de matar cupins da espécie *Nasutitermes corniger*. Recentemente, WSMoL e cMOL foram testadas e novamente demonstraram a capacidade de matar o mosquito *A. aegypti* (COELHO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2021).

As lectinas de *M. oleífera* são, provavelmente, as mais bem estudadas no combate ao *A. aegypti*. As sementes desta espécie são ricas em lectinas. No trabalho de Agra-Neto *et al.* (2014) a atividade larvicida de duas lectinas, bem como dos extratos das sementes de *M. oleífera* (WSMoL e cMOL), foi confirmada em larvas de 4^o instar.

Recentemente, excelentes resultados também foram obtidos no trabalho realizado por Alves *et al.* (2020) que confirmaram a atividade ovicida contra *A. aegypti* da WSMoL e de outras duas lectinas: MuBL e MuHL, ambas purificadas a partir dos extratos das sementes de *Myracrodruon urundeuva* Bark. e *Myracrodruon urundeuva* Heartwood. As lectinas foram capazes de provocar alterações e deformações na superfície dos ovos tratados após 48 e 72 h de exposição.

Para Silva *et al.* (2019), os bons resultados com os estudos utilizando as lectinas contra insetos tornam as mesmas boas candidatas para serem utilizadas como inseticida natural.

3.5.3 Metabólitos secundários

As moléculas bioativas obtidas através de extratos de plantas sempre se destacaram por serem úteis aos interesses humanos, principalmente na medicina e no controle de pragas, ou por fornecerem estruturas que podem atuar como modelo para a criação de novas substâncias (SOARES *et al.*, 2015).

As moléculas produzidas pelos vegetais são classificadas como metabólitos primários ou secundários. Os metabólitos primários estão associados a funções estruturais, plásticas e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários desempenham funções não

relacionadas com o crescimento da planta, mas são importantes na defesa destas contra herbívoros e patógenos. Atuam ainda, na promoção de atividades que visam a atração de insetos e na interação inseto/planta ou simbiose com microrganismos (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

É possível classificar os metabólitos secundários em quatro grupos distintos: os ácidos graxos, ou policetídeos, os terpenos, os alcalóides e os compostos fenólicos (DEWICK, 2002).

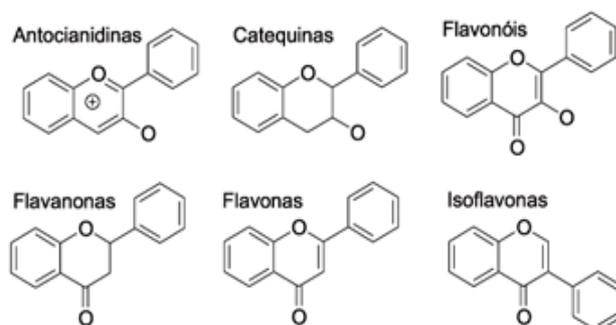
Por não estarem associados ao desenvolvimento vegetal, os metabólitos secundários costumam estar presentes em baixas concentrações em determinados grupos de plantas. Eles possuem estrutura complexa e de baixo peso molecular e são conhecidos por suas atividades biológicas marcantes (BERG *et al.*, 2017).

Sobre os usos e atividades dos metabólitos secundários, Soares *et al.* (2015) afirmam que, pelo fato de atuarem na defesa dos vegetais, essas moléculas são amplamente estudadas e utilizadas contra doenças e pragas, mais precisamente, contra fungos, bactérias e insetos.

As sementes, além de serem ricas em proteínas e enzimas bioativas, também são fonte de metabólitos secundários. Nesse sentido, no estudo realizado por Goyal *et al.* (2019), as atividades ovicida, larvicida, pupicida, adulticida, repelente e inibidora de crescimento, foram confirmadas para os ensaios utilizando extratos de sementes, os quais a presença de metabólitos secundários foi atestada por análise fitoquímica.

Metabólitos secundários foram encontrados nos extratos aquosos das sementes estudadas por Farias *et al.* (2010), sendo detectados: taninos, fenóis, flavonas, flavonóides, xantonas, saponinas e alcalóides. triterpenos e alcalóides foram encontrados nos extratos das sementes estudadas por Barbosa *et al.* (2014), ocasião em que se obteve resultado positivo para a atividade larvicida contra o *A. aegypti*. A Figura 9 apresenta a estrutura química dos principais metabólitos secundários.

Figura 9 - Principais tipos de flavonóides



Fonte: Março *et al.* (2008)

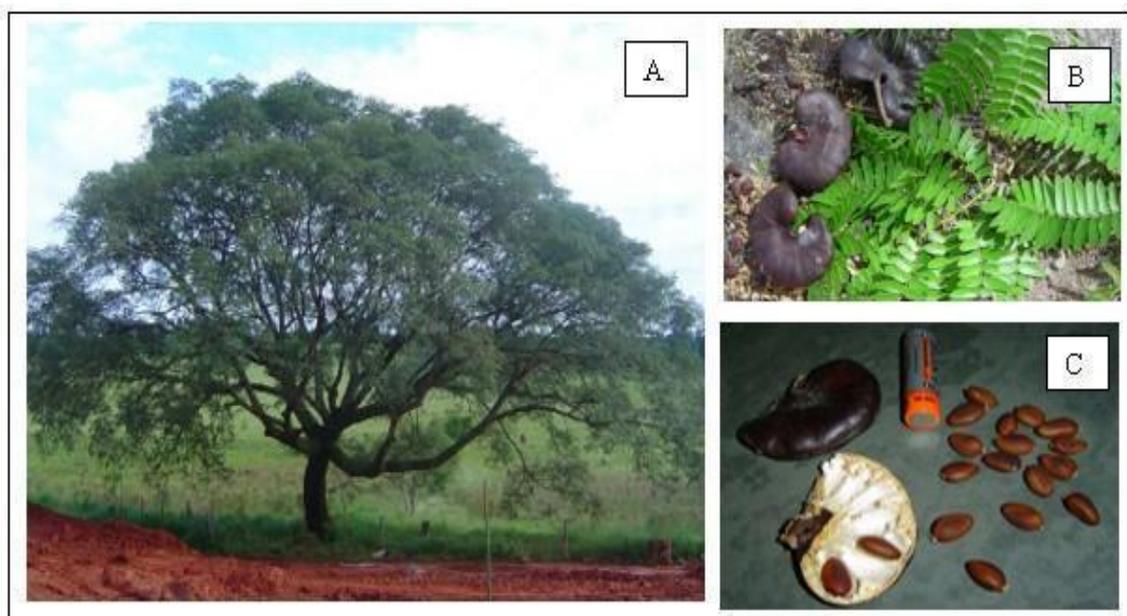
No estudo realizado por Chagas (2016), os extratos salinos das sementes de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. apresentaram atividade ovicida, larvicida e pupicida, com um posterior estudo fitoquímico revelando a presença de amins, terpenos e alcalóides nos mesmos, sendo que os alcalóides já são conhecidos de longa data pela sua ação inseticida, como afirma Moura e Schlichting (2007).

Uma vez que, mesmo estando presentes em baixas concentrações nos vegetais, os metabólitos secundários são abundantes e se encontram em praticamente todas as plantas, o que as tornam organismos interessantes na luta contra o *A. aegypti*.

3.6 *E. contortisiliquum*

Pertencente à Família Leguminosae e subfamília Mimosoideae, esta espécie é conhecida popularmente como tamboril, orelha de macaco, orelha de negro, timbó, timbaúva, tambaré, pacará e ximbó (Figura 10). Apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, mas também é encontrada em outros países como Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Peru e Uruguai. É uma espécie arbórea de rápido crescimento e grande porte, chegando a atingir de 20 a 35 metros. É considerada pouco exigente no que diz respeito ao solo, podendo ser encontrada em composições florestais variadas e em florestas com sucessão secundária avançada. A floração dessa espécie ocorre entre meados de setembro e novembro (LORENZI, 2008).

Figura 10 - *E. contortisiliquum*. A) Árvore; B) Fruto; C) Sementes.



Fonte: <https://www.arvores.brasil.nom.br/new/tamboril/index.htm>. Acesso em: 16 de jun. 2022.

E. contortisiliquum é uma espécie ótima para o reflorestamento de áreas degradadas e de preservação permanente devido ao seu rápido crescimento, uma vez que pode crescer até 4 metros em dois anos. Devido a essas características, é utilizada também na arborização de praças e canteiros centrais (ARAÚJO; SOBRINHO; 2011). É uma espécie bem adaptada à região Nordeste, sendo prevalente na Caatinga, ocorrendo desde o litoral até o sertão.

Possui uma copa ampla e frondosa, que proporciona sombra durante os períodos de insolação, servindo de abrigo para animais na fuga do calor da Caatinga. O tronco é lenhoso, com a madeira macia e pouco resistente, sendo apropriada para a fabricação de barcos e canoas, além de móveis, caixotes, brinquedos, dentre outras finalidades. As folhas dessa espécie são compostas do tipo bipenadas, apresentando de 2 a 7 jugas de pinas. As flores se apresentam em capítulos globosos de cerca de 4 mm, que surgem em cachos terminais. A vagem que abriga as sementes possui coloração preta e é bem resistente, rígida e coriácea, indeiscente e tem um formato que lembra uma orelha, justificando o nome popular de “orelha-de-macaco” (LORENZI, 2008).

As sementes de *E. contortisiliquum* apresentam dormência, promovida pela impermeabilidade do tegumento à água. Isso garante a sobrevivência da espécie por longo período de tempo, mas dificulta sua germinação mesmo quando os fatores ambientais são favoráveis. Dessa forma, é necessário, para que ocorra a germinação natural, que aconteça uma escarificação do tegumento por meio de microrganismos, alternâncias de temperatura e a participação de animais (EIRA *et al.*, 1993).

Em animais, a ingestão das sementes pode provocar intoxicação aguda, que pode evoluir para degeneração e necrose hepática. Em caprinos, foi relatado diarreia e aborto decorrente da ingestão das sementes de *E. contortisiliquum*. As saponinas presentes nas sementes desta espécie mostraram-se tóxicas para os macrófagos e para células de linfoma murino de cobaias (RAPOSO *et al.*, 2008). No trabalho de Raposo *et al.* (2008), cobaias também se mostraram suscetíveis ao aborto quando alimentadas com as favas dessa espécie.

Na medicina tradicional esta espécie é usada principalmente para combater parasitas e gonorreia. Além disso, os óleos essenciais das suas sementes têm demonstrado atividade antimicrobiana (MATLOUB *et al.*, 2018). As sementes dessa espécie são ricas em enterolobina, uma proteína de 52,9 KDa, a qual lhe é atribuída às atividades citotóxica, citolítica, inflamatória e inseticida (LIMA *et al.*, 2007).

Em vegetais superiores, são raros os achados de proteínas e peptídeos capazes de promover a lise celular de eritrócitos. A enterolobina tem essa capacidade, juntamente com a

tionina, isolada de *Pyralia tubera*, crotina, isolada das sementes de *Croton tiglium* e a gumeferina, presente nas sementes de *Enterolobium gummiferum* (ARAÚJO, 2007). Gumeferina e enterolobina são proteínas semelhantes estruturalmente e atuam de maneira semelhante. Ambas formam poros nas membranas de eritrócitos e outras células, provocando lise celular por perda de conteúdo citoplasmático (ARAÚJO, 2007).

As sementes de *E. contortisiliquum* possuem ainda um poderoso inibidor de tripsina (EcTI) que apresenta potencial anti-inflamatório e antioxidante (JÚNIOR *et al.*, 2017). No trabalho realizado por Tabosa *et al.*, (2020) foi observado que o EcTI interfere no desenvolvimento larval do *A. aegypti*, retardando o seu crescimento. O mesmo trabalho verificou ainda que, quando combinada com a toxina de *Bacillus thuringiensis*, a ação da mesma contra as larvas foi potencializada três vezes. Além disso, testes de toxicidade em *Artemia* sp. evidenciaram a não toxicidade para este microcrustáceo.

4 REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA E.; FERRAZ, G.; PADILLA-TORRES, S. D.; LUZ, S. L. B. Mosquito-disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003702, 2015.
- AFFELDT, P. E. S.; MACIEL, L. T. R.; BOZO, L. S. O.; ALVES, A. P. S. M.; COELHO, F. A. M.; AKISUE, G.; COELHO, M. D.G. Avaliação da atividade inseticida de látex e extratos vegetais frente culicídeos. **Revista Biociências**, v. 22, n. 1, p. 61-67, 2016.
- AGRA-NETO, A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D. L.; LUZ, L. A.; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-SANTOS, M. A. V.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.
- ALKENANI, N.A., AL-SOLAMI, H.M., ALGHAMDI, A.G., ULLAH, I., JAVEED, K., DAR, S.A., AHMED, M.M.M., 2022. Effect of botanicals on Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Specialusis Ugdymas**. v. 1, n. 2, p. 1503-1514.
- ALMEIDA, L. S.; COTA, A. L. S.; RODRIGUES, D. F. Saneamento, Arboviroses e Determinantes Ambientais: impactos na saúde urbana. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 10, p. 3857-3868, 2020.
- ALMEIDA, T. S. S. D. **Caracterização físico química do fruto e susceptibilidade antimicrobiana do óleo de *Licania rigida* Benth (oititica)**. Dissertação. (Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais). Universidade Federal de Campina Grande - UFCG. 2015. 76p.
- ALECRIM, J. S.; COTTA, A.; CASTRO, J. M. Relação entre as Ações de Prevenção da Dengue e o Impacto Causado sobre os Casos Notificados no Município de Ipatinga entre os anos de 2009 e 2010. **Journal of Health Sciences**, v. 18, n. 4, p. 286-90, 2016.
- ALVES, R. R.; SOARES, T.; BENTO, E. F.; ROLDAN-FILHO, R. S.; SOUZA, B. S.; LIMA, M. K.; NASCIMENTO, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; SÁ, A. R.; LIMA, T. A.; GONÇALVES, G. G. A.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Ovicidal lectins de *Moringa oleifera* e *Myracrodruon urundeuva* causam alterações na superfície coriônica e penetram nos embriões dos ovos do *Aedes aegypti*. **Ciência do Manejo de Pragas**, v. 76, n. 2, p. 730-736, 2020.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa aprova nova vacina contra a dengue**. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>. Acesso em 04 de julho de 2023.
- AMORIM, T. M. L. **Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de *Erythrina velutina* em enzimas digestivas e membrana peritrofica de larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2007. 83p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

ANA - Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. **Panorama do saneamento no Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://www.ana.gov.br/saneamento/panorama-do-saneamento/panorama>>. Acesso em: 12 agosto de 2020.

ARAÚJO, A. C. M.; SOUZA, M. V. Análise da expressão enterolobiana em sementes e calos vegetais de *Enterolobium contortisiliquum*. 60p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

ARAÚJO, A. P.; SOBRINHO, S. P. Germinação e produção de mudas de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 581-588, 2011.

BARBOSA, P. B. B. M.; OLIVEIRA, J. M.; CHAGAS, J. M.; RABELO, L. M. A.; MEDEIROS, G. F.; GIODANI, R. B.; SILVA, E. A.; UCHÔA, A. F.; XIMENES, M. F. F. M. Avaluation of seeds from plants found in the caatinga biofilm for the control *Aedes aegypti*. **Parasitology Reserch**, v. 113, n. 10, p. 3565-3580, 2014.

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

BARROS, A. C. A.; SILVA, T. P.; SANTOS, A. G.; QUEIROZ, S. F.; GOMES, F. S. Lectinas: purificação, mecanismos de ação inseticida e potencial biotecnológico. *In*: PRATA, E. G. (org.). **Biologia: Desafios, Habilidades e Competências no Ensino de Biologia**. Guarujá-Sp: Científica Digital, 2020, Cap. 9, p. 127-137.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 7º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017, 386p.

BILAL, H.; AKRAM, W.; HASSAN, S. A.; DIN, S. (2017). Citrus seed oils efficacy against larvae of *Aedes aegypti*. **Journal of arthropod-borne diseases**, v. 11, n. 3, p. 427-440, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 03. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001, 75p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>. Acesso em: 12 maio de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas epidemiológicas 1 a 52, 2022. Brasília, DF: **Boletim epidemiológico** (54). Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/#:~:text=Situa%C3%A7%C3%A3o%20epidemiol%C3%B3gica%20de%202022&text=At%C3%A9%20a%20SE%2052%20de,para%20o%20mesmo%20per%C3%ADodo%20analisa do>. Acesso em: 04 de julho de 2023.

BROWN, L. **Building a Sustainable Society**. Washington, DC: World watch Institute, 1981. 433p.

CALADO, D. C.; SILVA, M. A. N. Influência da temperatura sobre a longevidade, fecundidade e atividade hematofágica de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Diptera, Culicidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 1, p. 93-98, 2002.

CARMO, R. L. Urbanization, water and health in Brazil: Aspects of dengue fever epidemics. **XXVI International Population Conference**. IUSSP. Marrakech, 2009.

CARVALHO, G.; COZZER, G. D.; REZENDE, R. S.; DAL MAGRO, J.; SIMÕES, D. A. Efeito sinérgico do BTI e predação sobre a mortalidade de larvas do mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762). **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 17, n. 1, p. 10-16, 2020.
CATÃO, R. C. **Dengue no Brasil: abordagem geográfica na escala nacional**, 01. Ed, São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. 169 p.

CAVALCANTI, V. L. R.; COSTA, R. M. P. B.; PONTUAL, E. V.; ANDRADE, A. F.; ALVES, L. C.; PORTO, A. L. F.; BEZERRA, R. P. *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. **Algal Research**, v. 56, n. 1, p. 102290. 2021.

CHAGAS, J. M. **Avaliação do potencial inseticida de extratos salinos de sementes de seis espécies de plantas (família Fabaceae) contra *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera)**. 2016. 122 p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRGN. Natal - RN. 2016.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. D. S.; LIMA, V. L. D. M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. D. S. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 01, p. 01- 22, 2017.

CORREIA, M. L. A.; DIAS, E. R. Desenvolvimento sustentável, crescimento econômico e o princípio da solidariedade intergeracional na perspectiva da justiça ambiental. **Planeta Amazônia: Revista Internacional de Direito Ambiental e Políticas Públicas**, n. 8, p. 63-80, 2017.

COSTA, M. A. R. **A Ocorrência do *Aedes aegypti* na Região Noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí – 1999, na perspectiva da Geografia Médica**. 2001. 214p. Dissertação (Mestrado Institucional em Geografia). Universidade Estadual Paulista - Faculdade Estadual de Educação Ciências e Letras de Paranavaí, Presidente Prudente.

DE CONINCK, T.; VAN DAMME, E. J. The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, v. 313, n. 1, p. 111096. 2021.

DEVINE, G. J.; PEREA, E. Z.; KILLEEN, G. F.; STANCIL, J. D.; CLARK, S. J.; MORRISON, A. C. Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 28, p. 1530-4, 2009.

DEWICK, P. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Hoboken, New Jersey. EUA: John Wiley & Sons Ltd. 2ª ed, 2002, 507p.

DEY, N. C.; PARVEZ, M.; ISLAM, M. R.; MISTRY, S. K.; LEVINE, D. I. Effectiveness of a community-based water, sanitation, and hygiene (WASH) intervention in reduction of diarrhea among under-five children: Evidence from a repeated cross-sectional study (2007–2015) in rural Bangladesh. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 222, n. 8, p. 1098-1108. 2019.

DIAS, L. P.; OLIVEIRA, J. T.; BEZERRA, L. C. R.; SOUSA, D. O.; COSTA, H. P.; ARAUJO, N. M. S.; CARVALHO, A. F. U.; TABOSA, P. M. S.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; VASCONCELOS, I. M. A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 57, n. 6, p. 228-238, 2017.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B.; Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 01, p. 2536-2543, 2009.

DUKARIYA, G.; KUMAR, A. Distribution and biotechnological applications of chitinase: A review. **International Journal of Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology**, v. 8, n. 01, p. 17-29, 2020.

EIRA, M. T. S.; FREITAS, R. W. A.; MELLO, C. M. C. Superação da dormência de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. – Leguminosae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n. 2, p. 177-181, 1993.

FARIAS, D. F.; CAVALHEIRO, M. G.; VIANA, M. P.; QUEIROZ, V. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, S. M.; CARVALHO, A. F. U. 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.

FEIL, A. A.; SCHREIBER, D. Sustentabilidade e desenvolvimento sustentável: desvendando as sobreposições e alcances de seus significados. **Cadernos Ebape. BR**, v. 15, n. 3, p. 667-681, 2017.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. D. F. M.; SOARES FILHO, A. M.; CARVALHO, A. A. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 3, p. 961-972, 2009.

FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; FILHO, J. D. B. M.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, J. S. Correlações entre atividade inseticida e resistência à proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose. **Comunicata Scientiae**, v. 21, n. 01, p. 34-41. 2011.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Impactos na saúde e no Sistema Único de Saúde decorrentes de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado**. Brasília:

Fundação Nacional de Saúde, 2010. 246p. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/estudosPesquisas_ImpactosSaude.pdf. Acesso em: 20. agosto de 2021.

GOYAL, M.; SHINDE, L.; BAYAS, R. Study of chemical composition and larvicidal efficacy of secondary metabolites from aromatic phytoextracts against dengue vector: *Aedes aegypti* (Linn)(Diptera: Culicidae). **International Journal of Mosquito Research**, v. 6, n. 1, p. 26-33, 2019.

GOMES, P. R. B.; SILVA, A. L. S.; PINHEIRO, H. A.; CARVALHO, L. L.; LIMA, H. S.; SILVA, E. F.; SILVA, R. P.; LOUZEIRO, C. H.; OLIVEIRA, M. B.; FILHO, V. E. M. Evaluation of the larvicidal effect of the essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) against the mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 597-604, 2016.

GOMES, W. **Uso de inseticida (organofosforado) no combate à dengue e os possíveis danos à saúde pública na área urbana de Foz do Iguaçu – PR**. 2014. 42f. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental em Municípios) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

GÓMEZ, M.; MARTINEZ, D.; MUÑOZ, M.; RAMÍREZ, J. D. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission? **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-13. 2022.

HEUKELBACH, J.; ALENCAR, C. H.; KELVIN, A. A.; DE OLIVEIRA, W. K.; CAVALCANTI, L. P. G. Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 2, p. 116-120, 2016.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de saúde pública**, v. 31, n. 05, p. 906-908, 2015.

JOHANSEN, I. G.; DO CARMO, R. L. Dengue e falta de infraestrutura urbana na Amazônia brasileira: o caso de Altamira (PA). **Novos Cadernos NAEA**, v. 15, n. 1, p. 179-208, 2012.
JÚNIOR, O. A. T.; RIGHETTI, R. F.; REIS, R. A.; OLIVEIRA, B. T. M.; OLIVA, L. V.; PRADO, C. M.; SARAIVA, B. M. R.; LEICK, E. A.; PINHEIRO, N. M.; LOBO, Y. A.; MARTINS, M. D. A.; OLIVA, M. L. V.; TIBÉRIO, I. D. F. L. C. A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates pulmonary mechanics, inflammation and remodeling induced by elastase in mice. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 403-410, 2017.

LEANDRO, C. S.; BARROS, F. B.; CÂNDIDO, E. L.; AZEVEDO, F. R. Reduction of dengue incidence in Brazil in 2020: control or sub notification of cases due to COVID-19?. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e76891110442, 2020.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 525-550, 1997.

LIMA, C. M. R.; ZANOTTA, P. J.; RICART, C. A.; & SOUSA, M. V. D. Presence of the cytolytic protein enterolobin in different developmental stages of *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 163-170, 2007.

- LIMA, E. O.; RODRIGUES, F. A. C.; BUTAKKA, C. M.; MIYAZAKI, R. D.; CERQUEIRA, L. L. M.; MARIOTTO, S. Avaliação do polimorfismo na enzima esterase em populações naturais de *Aedes aegypti* na Chapada de Guimarães, Mato Grosso. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 18539-18552, 2021.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum; 2008. 352 p.
- LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n.04, p. 785-788, 2015.
- MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 2015.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- MATLOUB, A. A.; MOHAMMED, R. S.; ELSOUDA, S. S.; EL-HALLOUTY, S. M.; GOMAA, E. Z.; HASSAN, A. A. Phytochemical and biological studies on *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong Pericarps. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 9, p.2768-2778, 2018.
- MOREIRA, E. C. M.; CRUZ NETO, M. S.; FECURY, A. A.; DENDASCK, C. V.; DIAS, C. A. G. M. ; ARAÚJO, M. H. M.; MORAES, J. S.; SANTOS, D. L.; SOUZA, K. O.; SILVA, I. R.; PINHEIRO, M. C. N.; OLIVEIRA, E. The impacts of yellow fever on public health: general aspects and its implications in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e755998014, 2020.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, n. 5, p. 783-787, 1977.
- MOURA, V. M.; SCHLICHTING, C. L. R.; Alcalóides, Piretróides e Rotenóides: inseticidas naturais como uma alternativa ecológica sustentável. **Revista Uningá**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 37-44, 2007.
- MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. 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, 2015.
- MOYES, C.L., VONTAS, J., MARTINS, A. J., NG, L.C., KOOU, S.Y., DUSFOUR, I., RAGHAVENDRA, K., JOÃO PINTO, J., CORBEL, V., DAVID, J.P., WEETMAN, D., 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 1, p. e0005625.
- NASCIMENTO, J. C. D.; DAVID, J. M.; BARBOSA, L. C.; DE PAULA, V. F.; DEMUNER, A. J.; DAVID, J. P.; CONSERVA, L. M.; JUNIOR, J. C. F.; GUIMARÃES, E.

F. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC.(Piperaceae). **Pest management science**, v. 69, n. 11, p. 1267-1271, 2013.

NETO, T. S. C.; RAMIREZ, M. T. P.; GALINDO, V. R.; HERCULANO, L. F. S.; CAMPELLO, M. V. M. Levantamento de potenciais criadouros de *Aedes aegypti* no Campus do Itaperi da Universidade Estadual do Ceará. **Revista da Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 13, n. 1, p. 43-48, 2019.

ODM-BRASIL. Objetivos do Desenvolvimento do Milênio. **O Brasil e os ODM**. 2015. Disponível em: <http://www.odmbrasil.gov.br/o-brasil-e-os-odm>. Acesso em: 13 de set. 2021.

PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, IF. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L. A.; COELHO, L. C. B. B. NAPOLEÃO, T.H. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.

PIALOUX, G.; GAÛZÈRE, B.A.; JAURÉGUIBERRY, S.; STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic of arbovirose. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.5, p.319-27, 2007.

PINEDA-CORTEL, M.R.B.; CABANTOG, R.J.R.; CAASI, P.M.; CHING, C.A.D.; PEREZ, J.B.S.; GODISAN, P.G.M.; LATORRE, C.M.G.; LUCERO, D.R.; SALONGA, R.B. Larvicidal and ovicidal activities of *Artocarpus blancoi* extracts against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 120-124, 2019.

PINHEIRO, T. F.; ALVES, J. B.; SILVA, Y. R. N. O impacto financeiro das arboviroses oriundas do *Aedes aegypti* no Brasil: uma projeção para 2019. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 30757-30767, 2020.

POSSEL, R. D. **Atividade inseticida e repelente de plantas do cerrado no controle alternativo do mosquito *Aedes aegypti***. 113p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2019.

RAMÍREZ-SUERO, M.; VALERIO-ALFARO, V.; BERNAL, J. S.; RAMÍREZ-LEPE, M. Synergistic effect of chitinases and *Bacillus thuringiensis israelensis* spore-toxin complex against *Aedes aegypti* larvae. **The Canadian Entomologist**, v. 143, n. 2, p. 157-164, 2011.

RAPOSO, J. B.; CORREA, F. R.; GUIM, T. N.; SCHUCH, I. D.; GRECCO, F. B.; FERNANDES, C. G. Intoxicação aguda e abortos em cobaias pelas favas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 593-596, 2008.

RIZZI, C. B.; RIZZI, R. L.; PRAMIU, P. V.; HOFFMANN, E.; CODEÇO, C. T. Considerações sobre a dengue e variáveis de importância à infestação por *Aedes aegypti*. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 13, n. 24, p. 24 - 40, 2017.

ROQUE, A. D. A.; ROCHA, R. D. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Lagoinhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42. 2010.

SACHS, I. **Caminhos para o desenvolvimento sustentável**. Organização: Paula Yone Stroh. Rio de Janeiro: Ed. Garamond, 2009, 96 p.

SACHS, J. D. From millennium development goals to sustainable development goals. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2206-2211, 2012.

SACRAMENTO, I.; PAIVA, R. Fake news, WhatsApp e a vacinação contra febre amarela no Brasil. **MATRIZES**, v. 14, n. 1, p. 79-106, 2020.

SANTOS, D. G. **Importância da participação popular nas estratégias de controle da dengue no Brasil**. 2016. 28p. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília.

SANTOS, G. A. C. D.; ROSA, J. D. S.; MATOS, E. C. O. D.; SANTANA, M. E. D. Dengue: Prevenção, controle e cuidados de enfermagem - Revisão Integrativa da Literatura 2008-2013. **Revista brasileira de ciências da saúde**, v. 20, n. 1, p. 71-78, 2016.

SASAKI, D. Y.; JACOBOWSKI, A. C.; SOUZA, A. P.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L.; MACEDO, M. L. R. Effects of proteinase inhibitor from *Adenantha pavonina* seeds on short-and long term larval development of *Aedes aegypti*. **Biochimie**, v. 112, n. 05, p. 172-186, 2015.

SCHNEIDER, M.; NARCISO-ABRAHAM, M.; HADL, S.; MCMAHON, R.; TOEPFER, S.; FUCHS, U.; WRESSNIGG, N. Safety and immunogenicity of a single-shot live-attenuated chikungunya vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 401, n. 6, p. 2138-2147, 2023.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 4, n. 6, p. 163-175, 2008.

SILVA, L. L. S.; FERNANDES, K. M.; MIRANDA, F. R.; SILVA, S. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; NAPOLEÃO, T. H.; MARTINS, G. F.; PAIVA, P. M. G. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, n. 01, p. 109583, 2019.

SILVA, R. V. **Análise fitoquímica e atividade inseticida de *Annona montana* sobre *Aedes aegypti***. 87p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2019.

SILVA, T. I.; ALVES, A. C. L.; AZEVEDO, F. R. de; MARCO, C. A.; SANTOS, H. R.; ALVES, W. S. Efeito larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 2, p. 256-260, 2017.

SILVA, T. R. B.; COSTA, P. F. F.; SANTOS, S. L. Perigos no uso de agrotóxicos pela saúde pública no controle vetorial do *Aedes aegypti* (perigos no uso de agrotóxicos pela saúde pública). **Revista Movimentos Sociais e Dinâmicas Espaciais**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2020.

SOARES, F. S. C.; SOARES, M. S.; FERNANDES, F. L.; VISÔTTO, L. E.; PIRES, E. M. Inseticidas botânicos: extração, identificação de metabólitos secundários e aplicação no controle de pragas. *In*: VISOTTO, L.E.; FERNANDES, F. L.; FILHO, S. C.; LOPES, E. A.; AQUINO, L. A.; FERNANDES, M. E. S.; GOOD GOD, P. I. V.; RUAS, R. A. A.; JÚNIOR, J. M. S. (editores). **Avanços e Tecnologias Aplicadas à Pesquisa na Produção Vegetal**. UFV, 2015, Cap. 10, p. 219-252.

SOBRAL, M. F. F.; SOBRAL, A. I. G. D. P. Casos de dengue e coleta de lixo urbano: um estudo na cidade do Recife, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 1075-1082, 2019.

SOMBIÉ, A., SAIKI, E., YAMÉOGO, F., SAKURAI, T., SHIROZU, T., FUKUMOTO, S., SANON, A., WEETMAN, D., MCCALL, P.J., KANUKA, H., BADOLO, A. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. **Tropical Medicine and Health**, v. 47, n. 1, p. 1-8. 2019.

SOUZA, A. J. S.; ALCÂNTARA, R. C. C.; ALMEIDA, C. P.; FERREIRA, T. C. R. As vivências dos fisioterapeutas das equipes do Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF) em Belém do Pará sobre as repercussões do vírus Chikungunya. **Revista de Saúde Coletiva da UEFS**, v. 10, n. 1, p. 100-107, 2020.

SOUZA, J. P. A mortalidade materna e os novos objetivos de desenvolvimento sustentável (2016-2030). **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 2015, v. 37, n. 12, p. 1-2, 2015.

SYARIFAH, N.; RUSMATINI, T.; DJATIE, T.; HUDA, F. Ovitrap ratio of *Aedes aegypti* larvae collected inside and outside houses in a community survey to prevent dengue outbreak, Bandung, Indonesia, 2007. **3rd Asian Nations Congress Tropical Medicine Parasitol**, v. 3, n. 1, p. 116-20, 2008.

TABOSA, P. M. S.; FILHO, L. C. P. A.; FRANCA, R. X.; BEZERRA, L. C. B. R.; VASCONCELOS, I. M.; CARVALHO, A. F. U. Trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds impairs *Aedes aegypti* development and enhances the activity of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Pest Management Science**, v. 76, n. 11, p. 3693-3701, 2020.
TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia da dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. Suplementar, p. 99 -102, 2001.

TEIXEIRA, A. H.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; VAL, D. R.; FILHO, S. M. P.; SILVA, A. A. R. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **SANARE**. v. 13, n. 1, p. 23- 28, 2014.

UNDP. Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento. **What are the Sustainable Development Goals?** 2016. Disponível em: <https://www.br.undp.org/content/brazil/pt/home/sustainable-development-goals.html>. Acesso em: 11 maio. 2021.

UNITED NATIONS. **The Millennium Development Goals Report 2014**. New York: United Nations, 2014. Disponível em:

<http://www.un.org/millenniumgoals/2014%20MDG%20report/MDG%202014%20English%20web.pdf> > Acesso em: 13 set. 2021.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VIANNA, A. M. Poluição ambiental, um problema de urbanização e crescimento desordenado das cidades. **Revista Sustinere**, v. 3, n. 1, p. 22-42, 2015.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**, 01. Ed, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 124 p.

WERMELINGER, E. D.; FERREIRA, A. P. Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2013.

WCED - **World Commission on Environment and Development**. Our Common Future. Oxford: Oxford University Press, 1987. 300 p.

OMS – Organização Mundial Da Saúde. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. 2005.

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

5 CAPÍTULO II: RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os desfechos obtidos nessa pesquisa resultaram em um manuscrito, intitulado: Phytochemical prospection, hemagglutinating and insecticidal activity of saline extracts from the seeds of Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) Vell. Morong (Fabaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Submetido no dia 11/05/2023 no Brazilian Journal of Biology, Qualis A3 e fator de impacto 0,42 nas Ciências Ambientais quadriênio 2017-2020.

5.1 Manuscrito

Prospecção fitoquímica, atividade hemaglutinante e inseticida dos extratos salinos das sementes de Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) Vell. Morong (Fabaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

F. B. Barros^{a,1*}, F. R. Azevedo^a, E. L. Cândido^b, C. H. Alencar^c, F. N. P. Júnior^d, A. R. S. Rodrigues^b

^a Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade - CCAB, Universidade Federal de Cariri. R. Icaro de Sousa Moreira, 126 - Muriti, Crato, Ceará, Brazil.

^b Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal de Cariri. R. Maj. Sampaio, 574 - Alto do Rosário, Barbalha, Ceará, Brazil.

^c Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde comunitária, Universidade Federal do Ceará. R. Alexandre Baraúna, 949 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^d Instituto de Formação de Educadores, Universidade Federal do Cariri. R. Olegário Emidio de Araujo, s/n - Centro, Brejo Santo, Ceará, Brazil.

RESUMO

Esse estudo avaliou a atividade inseticida dos extratos brutos das sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) sobre ovos e larvas do *A. aegypti*, verificou também o perfil fitoquímico e a presença de lectinas no extrato. A solução salina de NaCl 0,15 M foi utilizada como substância extratora. Para os ensaios com ovos e larvas, o extrato bruto foi utilizado na forma crua (RCE) e fervida a 100° C por 5 min (BCE). Foram testadas as concentrações de 4,68; 9,37; 18,75; 28,13; 37,13 e 46,89 mg/mL, tendo a água destilada como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicada. Os resultados foram submetidos à análise de variância, Teste de Tukey e análise Log-Probit para determinar CL₅₀ e 90. O BCE apresentou melhores resultados sobre os ovos do que o RCE, conseguindo impedir a eclosão das larvas de 81,66% ±10,40%

^{1*} Autor correspondente. Francisco Bernardo de Barros. Centro de Ciências Agrárias e Biodiversidade - CCAB, Universidade Federal do Cariri, R. Icaro de Sousa Moreira, 126 - Muriti, Crato - CE. Brasil. E-mail: bernardobarros1989@gmail.com

dos ovos tratados, na concentração de 46,89 mg/mL. As respectivas CL_{50} e CL_{90} , foram definidas em 35,95 e 52,67 mg/mL, respectivamente. Nos testes com larvas, as concentrações de 46,89 e 37,13 mg/mL, para RCE e BCE, causaram 100% de mortalidade em 24 horas de exposição. A mortalidade larval nas demais concentrações aumentou com o tempo de exposição estendendo-se para 48 h. RCE, com 48 h de exposição, é o extrato mais promissor sobre as larvas ($E = 72,77\%$, $CL_{90} = 10,86$ mg/mL). Em RCE, a presença de lectinas e os metabólitos secundários: flavonoides, xantonas e fenóis, foram detectadas. Os resultados demonstram o potencial dos extratos das sementes de *E. contortisiliquum* com ação ovicida e larvicida sobre o *A. aegypti*.

Palavras-chaves: Mosquito vetor, Extratos vegetais, Fitoquímica, metabólitos secundários.

Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é o principal vetor dos vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) (Scalvenzi et al., 2019; Silva et al., 2019).

A eliminação de criadouros do *A. aegypti*, a fim de se evitar o desenvolvimento das larvas, associado com uso de inseticidas químicos sintéticos nas populações de larvas e adultos é medida fundamental para o controle das arboviroses (Saavedra-Rodriguez et al., 2018; Sombié et al., 2019; Pineda-Cortel et al., 2019). No entanto, inseticidas sintéticos possuem limitações no uso por afetar espécies não-alvo (Pineda-Cortel et al., 2019), apresentar tendência de se acumular no ambiente (Pineda-Cortel et al., 2019) e serem cada vez mais propensos à seleção de mosquitos resistentes às formulações atuais (Moyes et al., 2017; Alkenani et al., 2022), o que limita o uso das mesmas (Luz et al., 2020).

Outras formas de combate ao mosquito constam no uso de inseticidas microbianos contendo a bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), campanhas educacionais voltadas para eliminação dos criadouros, implementação de armadilhas de captura de ovos e adultos, além do controle biológico utilizando a bactéria *Wolbachia* spp. além de predadores do *A. aegypti* (Baldacchino et al., 2015; Weeratunga et al., 2017; Ogunlade et al., 2021).

Com as limitações no uso dos inseticidas inorgânicos e a redução de formulações disponíveis para o controle de *A. aegypti* (WHO., 2006), tem aumentado a busca por alternativas que viabilizem o seu controle, de forma ecológica e sustentável. Nesse sentido, as plantas têm se mostrado excelentes fontes de substâncias e moléculas com potencial inseticida (Barbosa et al., 2014; Pavela, 2015; Silva et al., 2018; Pineda-Cortel et al., 2019; Scalvenzi et al., 2019; Luz et al., 2020; Alkenani et al., 2022). Elas possuem metabólitos secundários que podem atuar na defesa contra insetos (Silva et al., 2019). As lectinas são uma classe de proteínas presentes nos

vegetais que também possuem a capacidade de atuar sobre insetos (Agra-Neto et al., 2014; Coelho et al., 2017; Silva et al., 2019; Alves et al., 2020; Cavalcanti et al., 2021).

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong (Fabaceae), conhecida, dentre outros nomes, por tamboril, é uma planta que apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, sendo facilmente encontrada na Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado (Bezerra et al., 2021) e em outros países da América Latina (Lorenzi, 2020). As sementes dessa espécie são notavelmente tóxicas quando ingeridas e podem provocar intoxicação grave em animais (Raposo et al., 2008). Essa toxicidade está associada à presença de saponinas, lectinas e enterolobina, uma proteína de 52,9 KDa, com atividades citotóxica, citolítica, inflamatória e inseticida (Lima et al., 2007). Além disso, o EcTI, um poderoso inibidor de proteases retardador de desenvolvimento larval, está presente nas sementes dessa espécie (Tabosa et al., 2020).

O potencial toxicológico sobre insetos dos constituintes das sementes dessa espécie, bem como, a escassez de trabalhos que verificaram esse potencial sobre o *A. aegypti*, motivou a realização dessa pesquisa.

Esse estudo teve como objetivo avaliar as atividades ovicida e larvicida dos extratos brutos cru e fervido das sementes de *E. contortisiliquum* e verificar a presença de metabólitos secundários e lectinas.

Materiais e métodos

Obtenção dos ovos de *A. aegypti*

Os ovos foram obtidos com o uso de armadilhas do tipo ovitrampa, constituídas por vasos de polipropileno com capacidade para 400 mL na coloração preta, contendo no seu interior água e duas palhetas de eucatex, de superfície porosa, com as dimensões de 3x12, e fixação na parede dos vasos por meio de grampos. Algumas palhetas foram forradas com papel filtro para capturar os ovos utilizados nos ensaios ovicida (Su & Mulla, 1998). As armadilhas foram instaladas na cidade de Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil. Os ovos coletados foram contados com auxílio de uma lupa estereoscópica e armazenados em local seco a uma temperatura de 25°C.

Uma parte das palhetas contendo ovos de *A. aegypti* foram adicionadas em bandejas de plástico brancas com 5 litros de capacidade, contendo três litros de água limpa. Estes foram mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura de 25±1°C, umidade relativa do ar de 70±10% e fotofase de 12 horas. Após a

eclosão, as palhetas foram removidas e as larvas mantidas sob alimentação com ração para peixes da marca Tropical® até atingirem o terceiro instar.

Obtenção das sementes

As sementes de *E. contortisiliquum* foram obtidas de um espécime localizado na zona urbana da cidade de Crato, Ceará, Brasil (Coordenadas: 7° 13' 41" S e 39° 23' 07" W). Após serem retiradas dos frutos, as sementes foram armazenadas em recipientes de plástico à temperatura ambiente e protegidas de calor e umidade até a realização do preparo dos extratos.

Preparo dos extratos brutos

A extração salina foi adotada para o preparo dos extratos brutos. Duas versões do extrato foram preparadas, uma com o extrato bruto cru (*Raw Crude Extract* - RCE) e outra, com o extrato bruto fervido (*Boiled Crude Extract* - BCE), para verificar a participação de proteínas bioativas na ação inseticida. Para o preparo do RCE, obteve-se um pó fino pela trituração e peneiração das sementes sem tegumento, 40 gm dessa farinha foram adicionadas em 400 mL de 0,15 M de NaCl (1/10). A solução foi homogeneizada por 4h a 25 °C em um agitador magnético e centrifugada a 10.000 RPM por 30 min a 25°C para formação de precipitado. Este precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro para uso nos ensaios. O BCE foi preparado mediante banho-maria a 100°C por 5 minutos com posterior centrifugação a 10.000 RPM por 30 minutos de 100 mL do RCE. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado e usado nos ensaios.

Composição química parcial

Foi realizada uma prospecção fitoquímica qualitativa para verificar a participação de metabólitos secundários nos extratos por meio do método descrito por Matos (2009). O extrato bruto foi liofilizado (Liofilizador modelo K105 - Liotop) e uma porção de 0,3g desse material foi dissolvido em 100 mL de etanol a 70%. Em seguida, sete tubos de ensaio foram separados, numerados e cada um recebeu 3 mL da solução recém preparada. As leituras foram feitas pela visualização direta na mudança na coloração ou formação de precipitado na solução de cada tubo, proporcionada pela adição de reagentes.

Detecção de lectinas

Teste de Hemaglutinação

Foram obtidos eritrócitos por meio da lavagem de sangue de coelho em solução salina a 4%. O animal vivia com livre acesso a comida e água e era mantido em um ciclo claro/escuro de 12/12 h controlado a 25°C. Os experimentos foram realizados seguindo as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde, para o cuidado e uso de animais de pesquisa, sendo aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Cariri, com o seguinte número de protocolo: 0014/2022.

Para detectar a presença de lectinas no RCE de *E. contortisiliquum*, foi realizado o teste de hemaglutinação, com base no método descrito por Moreira e Perrone (1977). Para isso, foram realizadas diluições seriadas em (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32), de 100 µL da amostra em 100 µL de solução salina com NaCl 0,15 mol/L em placas de microdiluição do tipo ELISA de 96 poços. Em seguida, 100 µL de uma suspensão de eritrócitos foi adicionada em cada poço, com a primeira coluna atuando como controle negativo, sendo preenchido apenas por eritrócitos de coelho. A reação foi incubada por 1 h e após esse período foi realizada visualização direta dos poços de controle e não controle na busca por aglutinação.

Ensaio

Para os ensaios ovicida, pedaços de papel de filtro foram cuidadosamente recortados para a obtenção de 21 lotes contendo 20 ovos de *A. aegypti* cada. Os lotes foram transferidos individualmente para 21 copos descartáveis de 50 mL de capacidade. Em cada copo, foi adicionado 1mL do RCE, em concentrações que variaram de 4,68; 9,37; 18,75; 28,13; 37,13 e 46,89 mg/mL. Os ovos permaneceram em contato com o extrato durante 30 minutos. Em seguida, foram retirados e acondicionados durante 24 horas sob papel de filtro para absorção do excesso de extrato. Após esse período, cada lote foi mergulhado em água destilada, onde permaneceram por sete dias, para verificar a existência ou não de eclosão de larvas. O mesmo procedimento foi realizado para o BCE. Foram realizados sete tratamentos, todos em triplicata. Água destilada foi usada como controle negativo. A taxa de eclosão (TE) foi calculada pela divisão entre o número de larvas eclodidas pelo número total de ovos tratados e seu resultado multiplicado por 100 (Su; Mulla, 1998).

Os ensaios com larvas do *A. aegypti* foram realizados de acordo com o método recomendado pela Organização Mundial da Saúde, (WHO, 2006) com algumas adaptações. 21

copos de polietileno com 50 mL de volume receberam, cada um, 10 larvas em terceiro estágio - L3. Em seguida, cada copo recebeu 10 mL do RCE em concentrações que variaram de 4,68; 9,37; 18,75; 28,13; 37,13 e 46,89 mg/mL. As larvas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. As diluições foram preparadas utilizando o RCE e água destilada. Sete tratamentos foram realizados, todos em triplicatas. O controle negativo foi feito utilizando 10 mL de água destilada. O experimento foi repetido utilizando o BCE.

A mortalidade das larvas foi verificada após 24 e 48h de exposição ao extrato, mediante o toque das larvas com uma pinça, sendo consideradas mortas aquelas que não respondessem ao estímulo mecânico. A eficiência percentual do extrato (E) foi calculada pela divisão do número de larvas mortas pelo número de larvas tratadas e seu resultado multiplicado por 100, de acordo com a fórmula de Abbott (1925).

Análise estatística

Os valores das concentrações letais dos extratos capazes de matar 50 (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) dos ovos e larvas tratados foram obtidos por meio da análise de log-probit, utilizando o software Graphpad Prism® versão 9.0, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Os valores foram expressos em miligramas por mililitro de peso seco (mg/mL). O software PAST versão 4.03, foi usado para realizar o teste de Shapiro-Wilk e evidenciar a normalidade dos dados. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas por meio da análise de variância - two way ANOVA e o teste de Tukey, com um erro de 0,05.

Resultados

A análise fitoquímica qualitativa revelou a presença de alguns compostos do metabolismo secundário no extrato de *E. contortisiliquum*, como fenóis, flavonas, flavonóis, flavanonas e xantonas.

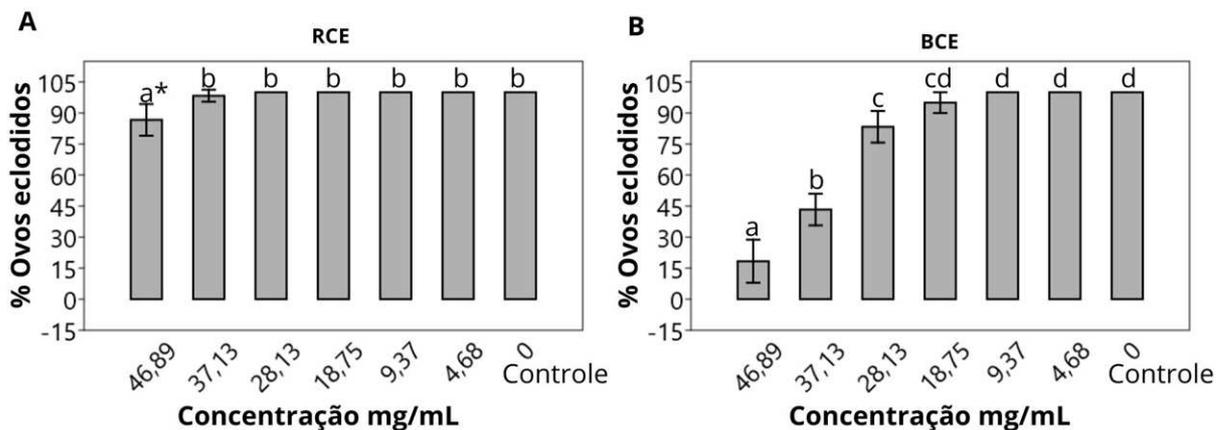
Já o teste de atividade hemaglutinante se mostrou positivo para a presença de lectinas, uma vez que foi verificada a coagulação dos eritrócitos expostos ao RCE. Por outro lado, não foi percebida a formação de coágulos nos frascos de controle negativo.

Ambos os extratos apresentaram atividade ovicida. Porém, o RCE apresentou toxicidade muito baixa para os ovos de *A. aegypti*, enquanto o BCE obteve um melhor desempenho. Para o RCE, as concentrações de 46,89 e 37,13 mg/mL foram as únicas que apresentaram resultados

que impediram a eclosão de 13,33% e 1,66% das larvas dos ovos tratados, respectivamente. Por sua vez, o processo de fervura do extrato bruto demonstrou melhorar a atividade ovicida, uma vez que a ação foi estendida até a concentração de 18,75 mg/mL.

Para o BCE, as médias da atividade ovicida das concentrações 18,75; 9,37 e 4,68, não diferiram significativamente do controle negativo (Figura 1).

Figura 1 - Atividade ovicida (%) dos extratos cru – RCE (A) e fervido – BCE (B) de *E. contortisiliquum*. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.



Fonte: elaborada pelo autor.

*Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As concentrações dos extratos não influenciaram de maneira estatisticamente significativa na atividade ovicida ($p = 0,396$).

Os resultados dos somatórios das TE do BCE foram de 73,3% e da TE do RCE, de 97,5%, o que aponta o melhor desempenho do BCE sobre os ovos. As taxas de eclosão dos ovos tratados com diferentes concentrações de BCE variaram de 95 ± 5 a $18,33\% \pm 10,40\%$. As respectivas CL_{50} e CL_{90} foram definidas em 35,95 mg/mL (34,74 - 37,17) e 52,67 mg/mL (50,03 - 55,30). As CL_{50} e CL_{90} de RCE não foram calculadas em decorrência da sua baixa atividade larvicida. Todas as larvas dos ovos tratados apenas com água limpa (controle negativo) eclodiram. (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias (M) e desvios padrões (DP) da atividade ovicida de RCE e BCE

Concentração (mg/mL)	Extrato			
	RCE M ± DP (%)		BCE M ± DP (%)	
46,89	86,6	± 7,63	18,3	± 10,4
37,13	98,3	± 2,88	43,3	± 7,63
28,13	100	± 0	83,3	± 7,63
18,75	100	± 0	95	± 5
9,37	100	± 0	100	± 0
4,68	100	± 0	100	± 0
Controle	100	± 0	100	± 0
TE (%)	97,5		73,3	
CL₅₀ mg/mL (CI95%)	-	-	35,9	(34,74 - 37,17)
CL₉₀ mg/mL (CI95%)	-	-	52,67	(50,03 - 55,30)

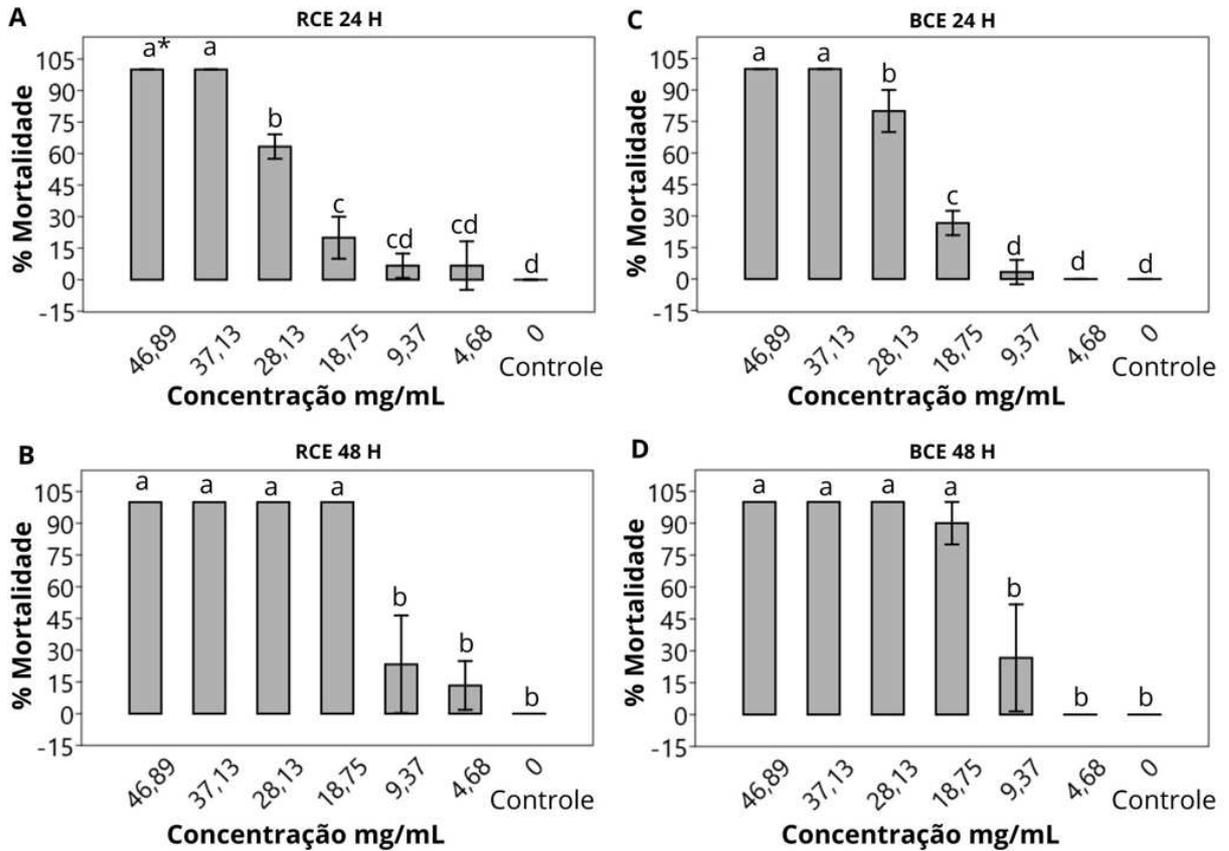
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: **BCE**: Extrato bruto fervido, **RCE**: Extrato bruto cru, **TE**: Taxa de eclosão

Tanto o RCE, quanto o BCE provocaram mortalidade em 100% das larvas nas concentrações de 46,89 e 37,13 mg/mL, respectivamente, nas primeiras 24 horas. Para as demais concentrações, os dois extratos aumentaram a taxa de mortalidade com o prolongamento do período de exposição de 48 horas, quando foram atingidos 100% de mortalidade larval nas concentrações de 28,13 e 18,75 mg/mL.

As médias de mortalidade de RCE e BCE, nas concentrações de 9,37 e 4,68 mg/mL não diferem significativamente do tratamento controle. Na concentração de 18,75 mg/mL, as médias de mortalidade nos testes com RCE e BCE por 48 h de exposição, são estatisticamente semelhantes às concentrações maiores (28,13; 37,13 e 46,89 mg/mL), em que a mortalidade máxima foi alcançada (Figura 2).

Figura 2 - Atividade larvica (%) do extrato cru – RCE durante 24 (A) e 48 h (B) e do extrato fervido – BCE durante 24 (C) e 48 h (D) de *E. contortisiliquum*.



Fonte: elaborada pelo autor.

*Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A concentração ($p < 0,001$) e o tempo ($p < 0,001$) são fatores significativos para a atividade larvica, bem como, a interação entre o tempo e concentração, revelou-se fator significativo para a ação larvica dos extratos ($p < 0,001$).

O RCE com ação por 48h, apresentou a melhor eficiência total entre os extratos e períodos de exposição avaliados ($E = 72,77\%$). Este extrato apresentou também as menores CL_{50} e CL_{90} , definidas em 10,86 mg/mL (11,44 - 12,61) e 12,11 mg/mL (9,48 - 19,13) respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias da atividade larvicida, eficiência total (E) % e concentrações inibitórias mínimas (CL₅₀ e 90) dos extratos de *E. contortisiliquum* (RCE e BCE) durante 24 e 48 h sobre o *A. aegypti*.

Concentração (mg/mL) / Mortalidade (% média ± desvio padrão)											
Extrato	46,8	93,7	37,13	28,13	18,75	9,37	4,68	Controle	E	CL₅₀ mg/mL	CL₉₀ mg/mL
/tempo									(%)	(IC95%)	(IC95%)
RCE	100	100	63,3	20	6,6	6,6	0	49	24,61	36,17	
24h	± 0	± 0	± 5,7	± 10	± 5,7	± 11,5	± 0		(23,03 - 26,26)	(32,13 - 40,68)	
RCE	100	100	100	100	23,3	13,3	0	72,7	10,86	12,11	
48h	± 0	± 0	± 0	± 0	± 23	± 11,5	± 0		(11,44 - 12,61)	(9,48 - 19,13)	
BCE	100	100	80	26,6	3,33	0	0	51,6	22,13	31,58	
24h	± 0	± 0	± 10	± 5,7	± 5,7	± 0	± 0		(21,34 - 22,97)	(29,20 - 34,06)	
BCE	100	100	100	90	26,6	0	0	69,4	11,62	18,3	
48h	± 0	± 0	± 0	± 10	± 25	± 0	± 0		(10,05 - 13,04)	(14,30 - 23,17)	

Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda. **BCE**: Extrato bruto fervido, **RCE**: Extrato bruto cru.

Discussão

Dentre os metabólitos secundários detectados destaca-se a classe dos flavonoides como as flavonas, os flavonóis e as flavanonas. Dentre várias atividades biológicas, estes metabólitos se destacam pela sua ação inseticida (Simões et al., 2017; Burger et al., 2021).

Os flavonoides são importantes inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Imran et al., 2020). A inibição da atividade da AChE é um dos mecanismos de ação mais efetivos na atividade inseticida, pois leva a morte do inseto pelo bloqueio da transdução dos sinais neurais (Casida; Durkin, 2013). Os flavonoides também são capazes de reduzir a oviposição de fêmeas de *A. aegypti*, bem como inviabilizar seus ovos (Rajkumar & Jebanesan, 2008).

Embora não detectadas nessa pesquisa, as saponinas são metabólitos secundários que já foram detectados nos extratos das sementes de *E. contortisiliquum* (Farias et al., 2010). Além de flavonoides e saponinas, amidas, quinonas, rotenoides, prenilados, cumarinas, alquilfenóis, lignanas, lactonas, monoterpênicos, diterpênicos, triterpênicos, limoninas, e alcaloides, são exemplos de metabólitos secundários que possuem ação inseticida comprovada (Garcez et al., 2013).

Nesse estudo, os extratos estudados apresentaram atividade ovicida e larvicida, diante disso, foi possível associar a presença de flavonoides como fator determinante para esses achados. Isso se deve ao fato de que essa classe de metabólitos secundários também foi

detectada em outros estudos sobre atividade inseticida sobre *A. aegypti* (Ferreira et al., 2019; Yusuf et al., 2020; Oliveira et al., 2021).

Por outro lado, a presença de lectinas no extrato revela que a extração salina foi efetiva na solubilização de proteínas. Também é um indício de que outras proteínas com comprovada ação sobre insetos, como a enterolobina (Lima et al., 2007) e inibidores de proteases, como EcTI (Sasaki et al., 2015; Tabosa et al., 2020) também podem ter sido solubilizadas. Na pesquisa realizada por Farias et al., (2012), lectinas e inibidores de tripsina foram detectados no extrato aquoso das sementes de *E. contortisiliquum*. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Marques et al., (2021), em que o extrato salino testado também se mostrou positivo para a presença de lectinas na sua composição. A confirmação dessas proteínas em um extrato torna viável futuras investigações com o intuito de isolá-las e testá-las sobre o *A. aegypti*.

O aumento da mortalidade larval promovida por extratos vegetais, mediante o aumento da concentração e o prolongamento do tempo de exposição, também foi observado em outros trabalhos sobre toxicidade (Barbosa et al., 2014; Andrade et al., 2020; Yusuf et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Como os extratos entram no organismo das larvas de *A. aegypti* por ingestão mediante alimentação, uma menor concentração de extrato demanda mais tempo para que ocorra um acúmulo no organismo da larva. O prolongamento da exposição para 48 h permitiu esse acúmulo e fez com que mesmo as doses mais baixas também fossem efetivas na mortalidade das larvas de *A. aegypti*. O reflexo dessa característica se deu quando os valores das CL₅₀ e CL₉₀ para a atividade larvicida de RCE e BCE se mostraram significativamente mais baixos para 48 h de exposição. Tal fato mostra o papel da interação entre o tempo de exposição e a concentração para a efetividade dos extratos na mortalidade das larvas de *A. aegypti*.

Por sua vez, os ovos de *A. aegypti* possuem uma casca protetora rígida denominada de cório. Esta barreira dificulta a penetração de moléculas ativas e o contato com o embrião (Forattini, 2002). Para ser efetivo, um composto considerado ovicida precisa vencer essa barreira e a concentração de moléculas em um extrato é fator relevante para seu potencial ovicida. Diante disso, observou-se que a atividade ovicida do BCE foi mais efetiva nas concentrações mais elevadas.

O aquecimento não demonstrou perda significativa no desempenho do BCE sobre as larvas e ovos, tal fato é um indício de que a toxicidade do extrato pode se manter mesmo mediante mecanismos independentes da ação de proteínas e enzimas. É possível que os metabólitos secundários presentes no BCE tenham mantido a ação do extrato, mesmo na ausência das substâncias que foram afetadas pelo calor. Esta ação da bioatividade do extrato

pode ser resultado de uma ação em sinergismo, ou não, das muitas moléculas presentes em um vegetal (Chen et al., 1995) e, no caso dos metabólitos secundários, a temperatura é um dos fatores que alteram o perfil destes metabólitos (Gobbo-neto & Alves, 2007).

Nos processos convencionais para extração de metabólitos secundários, temperaturas elevadas proporcionam um melhor rendimento (Seidel, 2012). Estudando os efeitos da temperatura no rendimento de metabólitos secundário extraídos da madeira de álamo, Todaro et al. (2017) obtiveram maiores rendimentos de flavonoides e polifenóis de madeira aquecida sob temperaturas entre 200 a 220°C. Nesse sentido, o aumento da temperatura pode ter melhorado a concentração dos metabólitos secundários presentes no BCE, ou até mesmo, ativado mecanismos que facilitaram a penetração dos metabólitos no cório dos ovos de *A. aegypti*. Esta situação poderia até mesmo explicar a melhora na ação ovicida. Essa hipótese é válida também para justificar a manutenção da atividade larvicida mesmo com as proteínas do extrato estando desnaturadas por conta do calor. Um possível aumento na concentração de flavonoides no BCE compensaria a ausência dessas moléculas.

Limitações do estudo

A ausência de testes utilizando RCE e BCE sobre pupas e adultos de *A. aegypti* pode ser uma limitação desta pesquisa, por não ser possível determinar a abrangência do uso dos extratos sobre todo ciclo de vida do mosquito. Outra possível limitação é a falta de dados referente a um controle positivo nos ensaios com uso de um inseticida sintético para o qual o *A. aegypti* não tenha adquirido resistência. Assim, não é possível fazer a comparação da eficiência do extrato vegetal, com uma formulação sintética. Por fim, a ausência de testes de toxicidade aguda pode ser vista como uma limitação da pesquisa por não permitir apontar níveis de segurança na utilização dos extratos como um produto comercial.

Conclusões

Tanto o extrato bruto cru como o fervido de *E. contortisiliquum* causam mortalidade de ovos e larvas de *A. aegypti*. No entanto, o extrato bruto fervido apresenta um melhor desempenho sobre os ovos do mosquito. Os extratos causam a mortalidade das larvas tanto com 24 como com 48h de exposição e o aquecimento não provocou perda de desempenho sobre a mortalidade das larvas.

A presença de flavonoides e lectinas no extrato bruto provavelmente são os responsáveis pela ação ovicida e larvicida do *A. aegypti*. Estes resultados demonstram o potencial do extrato das sementes estudadas no controle deste vetor.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de pós-graduação ao autor principal.

Referências

- ABBOTT, W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, no. 1, pp. 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- AGRA-NETO, A.C., NAPOLEÃO, T.H., PONTUAL, E.V., SANTOS, N.D.L., LUZ, L.A., OLIVEIRA, C.M.F., MELO-SANTOS, M.A.V., COELHO, L.C.B.B., NAVARRO, D.M.A.F. and PAIVA, P.M.G., 2014. Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. *Parasitology Research*, vol. 113, no. 1, pp. 175-184. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3640-8>.
- ANDRADE, T.A.S., DE SANTANA, I.M., JIMENEZ, G.C., FARIAS, E.T.N., DE MACEDO, L.O., ALVES, L.C., RAMOS, R.A.N., FAUSTINO, M.A.G. and CARVALHO, G.A., 2020. Larvicidal activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. and *Lippia origanoides* Cham. Against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Journal of Tropical Pathology*, vol.49, no. 1, pp. 145-54. <https://doi.org/10.5216/rpt.v49i1.61826>.
- ALKENANI, N.A., AL-SOLAMI, H.M., ALGHAMDI, A.G., ULLAH, I., JAVEED, K., DAR, S.A. and AHMED, M.M.M., 2022. Effect of botanicals on Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Specialis Ugdymas*, vol. 2, no. 43, pp. 1503-1514. <https://www.sumc.lt/index.php/se/article/view/1459/1192>
- ALVES, R.R., SOARES, T., BENTO, E.F., ROLDAN-FILHO, R.S., SOUZA, B.S., LIMA, M.K., GONÇALVES, G.G., BRAYNER, F.A., ALVES, L.C., NAVARRO, M.D., NAPOLEÃO, T.H. and PAIVA, P. M., 2020. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. *Pest management science*, vol. 76, no. 2, pp. 730-736. <https://doi.org/10.1002/ps.5572>.
- BALDACCHINO, F., CAPUTO, B., CHANDRE, F., DRAGO, A., DELLA TORRE, A., MONTARSI, F. and RIZZOLI, A., 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest management science*, vol. 71, no. 11, pp. 1471-1485. <https://doi.org/10.1002/ps.4044>.
- BARBOSA, P.B.B.M., DE OLIVEIRA, J.M., CHAGAS, J.M., RABELO, L.M.A., MEDEIROS, G.F., GIORDANI, R.B., SILVA, E.A., UCHÔA, A.F. and DE FÁTIMA,

- M.F.M.X., 2014. Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*, vol. 113, no 1, pp. 3565-3580. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4022-6>.
- BEZERRA, J.J.L., PINHEIRO, A.A.V. and LUCENA, R. B., 2021. Phytochemistry and poisoning in ruminants by *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Fabaceae): A systematic review. *Toxicon*, vol. no. 1, pp. 201, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.08.008>.
- BURGER, M.C., MATOS, A.P., CUNHA, G.O.S., BERNARDO, A. R., MENEZES, A.C.S., VIEIRA, P.C. and FERNANDES, J.B., 2021. Flavonoides e Atividade Inseticida Sobre *Spodoptera frugiperda* e *Myrsine coriacea* (Primulaceae). *Revista Virtual de Química*, vol. 13, no. 4. pp. 953-958. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20210022>.
- CASIDA, J.E. and DURKIN, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, vol. 58, no. 1, pp. 99-117. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>.
- CAVALCANTI, V.L.R., COSTA, R.M.P.B., PONTUAL, E.V., ANDRADE, A.F., ALVES, L.C., PORTO, A.L.F. and BEZERRA, R.P., 2021. *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. *Algal Research*, vol. 56, no. 1, pp. 102290. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102290>.
- CHEN., W., ISMAN, M.B. AND CHIU, S.F., 1995. Antifeedant and growth inhibitory effects of the limonoid toosendanin and *Melia toosendan* extracts on the variegated cutworm, *Peridromasauca* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, vol. 119, no. 5, pp. 367-370. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01302.x>.
- COELHO, L.C.B.B., SILVA, P.M.D.S., LIMA, V.L.D.M., PONTUAL, E.V., PAIVA, P.M. G., NAPOLEÃO, T.H. and CORREIA, M.T.D.S., 2017. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, no. 1, pp. 01- 22. <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>.
- FARIAS, D. F., CAVALHEIRO, M. G., VIANA, M. P., QUEIROZ, V. A., ROCHA-BEZERRA, L. C., VASCONCELOS, I. M. and CARVALHO, A. F., 2010. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 82, no. 3, pp. 585-594. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652010000300006>.
- FERREIRA, M.D.L., FERNANDES, D.A., NUNES, F.C., TELES, Y.C., ROLIM, Y.M., SILVA, C.M.D., ALBUQUERQUE, J.B.L., AGRA, M.F. and SOUZA, M.D.F., 2019. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 29, no. 5, pp. 582-590. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.05.008>.
- FORATTINI, O.P., 2002. *Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia*. 2nd ed. São Paulo: Edusp. 860 p.

- GARCEZ, W.S., GARCEZ, F.R. and SILVA, L.M.G.E., 2013. Naturally occurring plant compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Revista Virtual de Química*, vol. 5, no. 3, pp. 363-393. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130034>.
- GOBBO-NETO, L. and LOPES, P.N., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, vol. 30, no. 2, pp. 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- IMRAN, M., IRFAN, A., IBRAHIM, M., ASSIRI, M.A., KHALID, N., ULLAH, S. and AL-SEHEMI, A. G. (2020). Carbonic anhydrase and cholinesterase inhibitory activities of isolated flavonoids from *Oxalis corniculata* L. and their first-principles investigations. *Industrial crops and products*, vol. 148, no. 1, pp. 112285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112285>.
- LIMA, C.M.R., ZANOTTA, P.J., RICART, C.A. and SOUSA, M.V.D., 2007. Presence of the cytolytic protein enterolobin in different developmental stages of *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 19, no. 2, pp. 163-170. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000200008>.
- LORENZI, H., 2020. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 8nd Ed. Plantarum: Nova Odessa. 385 p.
- LUZ, T.R.S.A., MESQUITA, L.S.S., DO AMARAL, F.M.M. and COUTINHO, D.F., 2020. Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. *Acta Tropica*, vol. 212, no. 1, pp. 105705. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105705>.
- MARQUES, F.M.S., MARTINS, M.G.Q., PEREIRA, A.M.G., OLIVEIRA, M.V. and CAJAZEIRAS, J.B., 2017. Determinação de alcaloides, lectina e toxicidade sob náuplios de *Artemia sp.* do extrato aquoso de sementes de *Crotalaria ochroleuca*. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, vol. 19, no. 1, pp. 206-218. <http://dx.doi.org/10.5892/cavalruvrd.v19i1.6381.g10952069>.
- MATOS, F.J.A., 2009. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 3rd ed. UFC: Fortaleza. 150 p.
- MOREIRA, R.A. and PERRONE, J.C., 1977. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, vol. 59, no. 7, pp. 783-787. <https://www.jstor.org/stable/4264828>.
- MOYES, C.L., VONTAS, J., MARTINS, A. J., NG, L.C., KOOU, S.Y., DUSFOUR, I., RAGHAVENDRA, K., JOÃO PINTO, J., CORBEL, V., DAVID, J.P. and WEETMAN, D., 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS neglected tropical diseases*, vol. 11, no. 7, pp. e0005625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009084>.
- OGUNLADE, S.T., MEEHAN, M.T., ADEKUNLE, A.I., ROJAS, D.P., ADEGBOYE, O.A. and MCBRYDE, E.S., 2021. A review: *Aedes*-borne arboviral infections, controls and Wolbachia-based strategies. *Vaccines*. vol. 9, no. 1, pp. 1-23. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010032>.

OLIVEIRA., A.K.M., PAULIQUEVIS, C.F., MATIAS, R., SILVA, P.G., ZANELLA, D.F.P., ROEL, A.R. and PORTO, K.R., 2021. Efeito larvicida do extrato etanólico de *Piper umbellatum* sobre o mosquito *Aedes aegypti*. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, vol. 8, no. 1, pp. 84-101.

<https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/4524>.

Pavela, R., 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, vol. 76, no. 1, pp. 174-187.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>.

PINEDA-CORTEL, M.R.B., CABANTOG, R.J.R., CAASI, P.M., CHING, C.A.D., PEREZ, J.B.S., GODISAN, P.G.M., LATORRE, C.M.G., LUCERO, D.R. and SALONGA, R.B., 2019. Larvicidal and ovicidal activities of *Artocarpus blancoi* extracts against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutical biology*, vol. 57, no. 1, pp. 120-124.

<https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1561727>.

RAJKUMAR, S. and JEBANESAN, A., 2008. Bioactivity of flavonoid compounds from *Poncirus trifoliata* L. (Family: Rutaceae) against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, vol. 104, no. 1, pp. 19-25.

<https://doi.org/10.1007/s00436-008-1145-7>.

RAPOSO., J.B., CORREA., F.R., GUIM, T.N., SCHUCH, I.D., GRECCO, F.B. and FERNANDES, C.G., 2008 Intoxicação aguda e abortos em cobaias pelas favas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vo. 28, no. 12, pp. 593-596. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001200005>.

SASAKI, D.Y., JACOBOWSKI, A.C., SOUZA, A.P., CARDOSO, M.H., FRANCO, O.L. and MACEDO, M.L.R. 2015. Effects of proteinase inhibitor from *Adenantha pavonina* seeds on short-and long term larval development of *Aedes aegypti*. *Biochimie*, vol. 112, no. 2015, pp. 172-186. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.011>.

SCALVENZI, L., RADICE, M., TOMA, L., SEVERINI, F., BOCCOLINI, D., BELLA, A., GUERRINI, A., TACCHINI, M., SACCHETTI, G., CHIURATO, M., ROMI, R. and DI LUCA, M., 2019. Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. *Parasite*, vol. 26, no. 23, pp. PMC6469466.

<https://doi.org/10.1051/parasite/2019024>.

SEIDEL, V., 2012. Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Natural products isolation*, vol. 864, no. 1, pp. 27-41. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_2.

SILVA, I.M.A., MARTINS, G.F., MELO, C.R., SANTANA, A.S., FARO, R.R.N., BLANK, A.F., ALVES, P.B., PICANÇO, M.C., CRISTALDO, P.F. and ARAÚJO, A.P.A., 2018. Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpenes bioinsecticides. *Pest management science*, vol. 74, no. 4, pp. 1001–1012.

<https://doi.org/10.1002/ps.4801>.

SILVA, L.L.S., FERNANDES, K.M., MIRANDA, F.R., SILVA, S.C.C., COELHO, L.C.B.B., NAVARRO., D.M.A.F., NAPOLEÃO, T.H., MARTINS, G.F. and PAIVA, P.M.G., 2019. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-

rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and future fecundity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. no. 1, pp. 183, 109583. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109583>.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A. and ROSPETROVICK, P., 2017. *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento*, 7 nd ed. Porto Alegre: Artmed. 483 p.
SU, T. and MULLA, M.S., 1998. Ovicidal activity of neem products (azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*. vol. 14, no. 2, pp. 204-209. <https://europepmc.org/article/med/9673924>.

SOMBIÉ, A., SAIKI, E., YAMÉOGO, F., SAKURAI, T., SHIROZU, T., FUKUMOTO, S., SANON, A., WEETMAN, D., MCCALL, P.J., KANUKA, H. and BADOLO, A., 2019. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Tropical Medicine and Health*, vol. 47, no. 2, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41182-018-0134-5>.

TABOSA, P.M., ALMEIDA FILHO, L.C., FRANCA, R.X., ROCHA-BEZERRA, L.C.B., VASCONCELOS, I.M. and CARVALHO, A. F., 2020. Trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds impairs *Aedes aegypti* development and enhances the activity of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Pest Management Science*, vol. 76, no. 11, pp. 3693-3701. <https://doi.org/10.1002/ps.5918>.

TODARO, L., RUSSO, D., CETERA, P. and MILELLA, L. 2017. Effects of thermo-vacuum treatment on secondary metabolite content and antioxidant activity of poplar (*Populus nigra* L.) wood extracts. *Industrial Crops and Products*. vol. 109, no. 1, pp. 384-390. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.052>.

WEERATUNGA, P., RODRIGO, C., FERNANDO, S.D. and RAJAPAKSE, S., 2017. Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2017, no. 8, pp. 3895-3904. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012759>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006 [viewed 13 January 2023] *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance* [online]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69223>.

YUSUF, Y., EFENDI, K. and DIANTASARI, S., 2020. Larvicidal Activity Test of Ethanolic Extract of (*Euphorbia tirucalli* Linn) Stem on *Aedes aegypti* Larvae. *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 11, no. 3, pp. 388-392. <https://doi.org/10.5530/srp.2020.3.48>.

6. CAPÍTULO III: CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Conclusões gerais

Com o presente trabalho pode-se concluir que o extrato salino das sementes de *E. contortisiliquum*, possui atividade ovicida e larvicida contra o *A. aegypti*. Observa-se que quando submetido ao aquecimento, com temperatura suficiente para provocar a desnaturação de proteínas, o extrato mantém a ação larvicida. No caso dos ovos de *A. aegypti* tratados com o extrato de *E. contortisiliquum*, o aquecimento do extrato melhora a ação ovicida. É muito provável que o aquecimento tenha favorecido a ação dos metabólitos secundários presentes no extrato. As variáveis encontradas no estudo mostram que, um possível produto feito à base do extrato das sementes deve ser utilizado em larvas em estágio L3, por possibilitar tempo suficiente para a atuação de longo prazo e efetividade em baixas concentrações do extrato. Os resultados levam a apontar a possibilidade do uso do aquecimento do extrato, para reduzir uma eventual toxicidade celular em organismos não-alvo, dada a capacidade do extrato de se manter efetivo mesmo após a desnaturação proteica.

6.2 Perspectivas de investigações futuras

As atividades ovicida e larvicida do extrato salino das sementes de *E. contortisiliquum* podem ser justificadas pela presença de lectinas e metabólitos secundários nele presentes. O fato de o extrato se manter efetivo contra larvas e, no caso dos ovos tratados, ter sua ação potencializada, abre margem para a necessidade de mais estudos sobre os mecanismos de ação do extrato contra ovos e larvas de *A. aegypti*. Novas pesquisas deverão ser realizadas para verificar a toxicidade celular e o papel do aquecimento na redução de uma eventual toxicidade aguda.

7. ANEXOS

7.1 Comprovante de submissão do artigo

O artigo: Phytochemical prospection, hemagglutinating and insecticidal activity of saline extracts from the seeds of Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) Vell. Morong (Fabaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), encontra-se em avaliação.

07/07/2023, 02:18

de Barros et al. | Prospecção fitoquímica, atividade hemaglutinante e inseticida dos extratos salinos das sementes de Tamb...

Brazilian Journal of Biology


[← Back to Submissões](#)

274635 / de Barros et al. / Prospecção fitoquímica, atividade hemagl

[Biblioteca da Submissão](#)

Fluxo de Trabalho

Publicação

Submissão

Avaliação

Edição de Texto

Editoração

Arquivos da Submissão

[Q Buscar](#)

▶	1300267	ARTIGO BERNARDO BJB.docx	maio 11, 2023	Texto do artigo
---	---------	--------------------------	---------------	-----------------

[Baixar Todos os Arquivos](#)

Discussão da pré-avaliação

[Adicionar comentários](#)

Nome	De	Última resposta	Respostas	Fechado
Nenhum item				

8 APÊNDICES

8.1 Metodologia estendida

Local da pesquisa

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Entomologia Agrícola (LEA), localizado no Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade da Universidade Federal do Cariri (CCAB/UFCA), no Crato, Ceará, Brasil.

Obtenção das sementes

As sementes de Tamboril (*E. contortisiliquum*) foram coletadas em fevereiro de 2022 de um espécime localizado na zona urbana do Crato, Ceará, Brasil (Figura 1).

Figura 1. Pé de *E. contortisiliquum* do qual as sementes foram coletadas. Crato-CE, 2022.



Fonte: Autor

Após coleta, os frutos contendo as sementes (Figura 2) foram mantidos em um local seco e arejado para secagem natural e posterior extração manual. Uma vez extraídas, as mesmas foram armazenadas em recipientes de plástico à temperatura ambiente e protegidas de calor e umidade até a realização do preparo do extrato salino.

Figura 2. Sementes de *E. contortisiliquum* com tegumento.



Fonte: Autor

Determinação do peso seco

A determinação do peso seco foi feita no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais - LPPN da Universidade Regional do Cariri - URCA. Inicialmente, um copo plástico com um volume total de 150 mL foi pesado antes e após a adição de 162 mL de RCE. Em seguida, o material do copo foi congelado em freezer e, posteriormente, levado ao liofilizador, onde ocorreu a sublimação (processo onde a água sólida muda para o estado gasoso e ocorre a desidratação total do extrato). Finalizado o processo, o copo foi novamente pesado e a diferença entre as pesagens do extrato antes e após a liofilização resultou no peso seco do mesmo, que foi expresso em mg/mL.

Obtenção dos ovos

Para a obtenção de ovos do *A. aegypti*, armadilhas do tipo ovitrampa foram instaladas entre os meses de janeiro a maio de 2022 em residências dos bairros Frei Damião e Jardim Gonzaga, na cidade de Juazeiro do Norte, Ceará.

As armadilhas foram constituídas por vasos de polipropileno com capacidade para 400 mL na coloração preta e contendo no seu interior água e duas palhetas de Eucatex (3x12 cm) presas por um grampo nas paredes de cada vaso (SILVA *et al.*, 2017). A cada cinco dias de exposição as palhetas foram trocadas analisadas quanto a presença de ovos. As palhetas contendo ovos, quando secas, passaram pelo processo de contagem dos mesmos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Eclosão das larvas

Para se obter as larvas e pupas do *A. aegypti*, foi seguida a metodologia empregada por Silva *et al.*, (2017). No LEA, as palhetas contendo ovos foram colocadas em bandejas de coloração branca com volume aproximado de quatro litros, contendo três litros de água limpa (Figura 3). Estes foram mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Após a eclosão as palhetas foram removidas e as larvas mantidas sob alimentação com ração para peixes da marca Tropical® até atingirem o terceiro instar, fase em que as mesmas foram submetidas aos ensaios larvicidas.

Figura 3. Eclosão das larvas.



Fonte: Autor

Análise fitoquímica

Para verificar a participação de metabólitos secundários no RCE, foi adotada a metodologia descrita por Matos (1997). Para isso, o RCE foi liofilizado e em seguida, procedeu-se do preparo de uma solução utilizando 0,3g do pó do extrato bruto liofilizado, mediante diluição em 100 mL de etanol a 70%. Posteriormente, sete tubos de vidro com volume de aproximadamente 20 mL foram separados e numerados de um a sete. Em cada tubo, 3 mL da solução recém preparada foi adicionada, dando-se início aos testes a seguir descritos. Os testes foram realizados no LPPN-URCA.

- *Detecção de taninos e fenóis*

No tubo 1, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 . O tubo foi agitado por alguns segundos. A presença de fenóis e taninos foi determinada de acordo com o aparecimento da coloração indicada para cada substância. A coloração variável entre o azul e o vermelho indica a presença de fenóis. O surgimento de precipitado escuro com tonalidade azul é um indício da presença de taninos hidrolisáveis. Já a coloração verde indica a presença de taninos condensados. O tubo 5 foi utilizado como teste “branco”, servindo para a comparação com os tubos contendo reagentes.

- *Detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides*

Foi feita a acidulação da solução presente no tubo 2 a pH 3, mediante acréscimo de HCl. Os tubos 3 e 4 foram alcalinizados a pH 8,5 e 11, respectivamente, pelo acréscimo de NaOH. A presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides foi verificada pela mudança da coloração nos respectivos tubos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação de antocianinas, antocianidinas e flavonóides pela mudança de coloração. Crato-CE, 2022.

Constituintes	Cor da solução em:		
	pH 3	pH 8,5	pH 11
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul púrpuro
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Aunonas	Vermelha	-	Vermelho púrpura
Flavononóis	-	-	Vermelho alaranjado

Fonte: Matos (1997)

- *Detecção de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.*

O pH dos conteúdos dos tubos 6 e 7 foram regulados, o tubo 6 para pH 3 pela adição de HCl e o tubo 7 para pH 11 pela adição de NaOH. Com o auxílio de uma lâmpada de álcool, os mesmos foram aquecidos por 3 minutos, ou até que se observasse ebulição. A detecção dos metabólitos foi feita pela observação de mudança de coloração decorridos os 3 minutos, conforme Tabela 2.

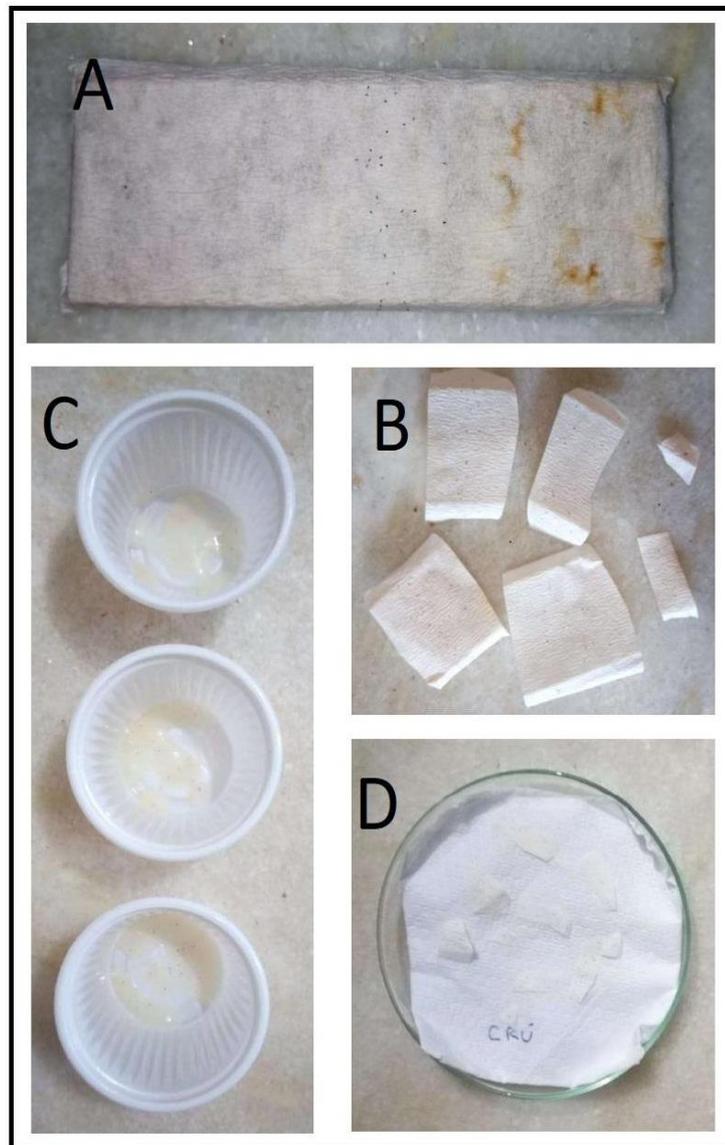
Tabela 2 - Identificação de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas pela observação da mudança de cor. Crato-CE, 2022.

Constituintes	Cor da solução em:	
	pH 3	pH 11
Leucoantocianidinas	Vermelho	-
Catequinas	Pardo amarelado	-
Flavanonas	-	Vermelho-laranja

Fonte: Matos (1997)

Atividade ovicida

Figura 4. Preparo do ensaio ovicida: Palheta de eucatex envolvida com papel filtro, positiva para a presença de ovos de *A. aegypti* A); Recortes do papel contendo ovos B); Ensaio em triplicata com copos contendo ovos e extrato bruto C); Secagem de ovos após exposição ao extrato bruto D).



Fonte: Autor

Ensaio larvicidas

Figura 5. Ensaio larvicida com o extrato. Crato-CE, 2022.



Fonte: Autor

8.2 Resultados detalhados da análise fitoquímica

No teste para a detecção de antocianinas, antocianidinas e flavonóides, a amostra com pH 11 apresentou mudança de coloração para uma cor levemente amarelada, revelando a presença de flavonas, flavonóis e xantonas.

Os tubos contendo as amostras em pH 3 e pH 8,5 não sofreram mudança de coloração. O teste foi negativo para a presença de antocianinas, antocianidinas, chalconas, auronas e flavononóis.

Por fim, o teste para detecção de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas se mostrou negativo para a presença dos dois primeiros, uma vez que não foi notada alteração da coloração das amostras em pH 3, no entanto, a leve mudança de coloração da amostra em pH 11 revelou a presença de flavanonas. Os resultados da análise fitoquímica podem ser conferidos na Figura 6.

Figura 6 - Mudanças de coloração na análise fitoquímica do extrato.



Fonte: elaborada pelo o autor.

REFERÊNCIA DA METODOLOGIA ESTENDIDA

MATOS, F.J.A., 2009. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 3rd ed. UFC: Fortaleza. 150 p.

SILVA, T. I.; ALVES, A. C. L.; AZEVEDO, F. R. de; MARCO, C. A.; SANTOS, H. R.; ALVES, W. S. Efeito larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas de *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 2, p. 256-260, 2017.