

1
2
3 RESPOSTA IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE LARVAS DE *Aedes aegypti*
4 (DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDAS AO TERPINOLENO E 1-BUTIL-3,4-
5 METILENODIOXIBENZENO E SUA ASSOCIAÇÃO

6 por

7 MARIA CLARA DA NÓBREGA FERREIRA

8 (Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira UFRPE)

9 RESUMO

10 Compreender a ação de compostos botânicos é uma necessidade enfrentada no controle de
11 *Aedes aegypti*. Contudo, a maioria das pesquisas concentram-se em parâmetros toxicológicos,
12 sendo a interação com o meio intracelular pouco explorada. Estudando os compostos terpinoleno
13 e 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB), Silva *et al.* (2016) constataram sua promissora
14 atividade inseticida neste vetor. Diante disso, levantou-se a hipótese que a toxicidade destes
15 voláteis está relacionada a danos no epitélio intestinal, impactando em seus mecanismos de
16 defesa, e que tais danos são mais expressivos e permanentes frente a sua combinação binária. Para
17 validá-las, avaliaram-se seus efeitos, a nível citotóxico (imunohistoquímica - Apoptose e
18 Proliferação Celular) e imunológico (fenoloxidade, óxido nítrico e estresse oxidativo – TBARS e
19 Glutathione Transferase). As CL₅₀ dos compostos isolados foram utilizadas conforme Silva *et al.*
20 (2016). Para a curva da associação, a CL₅₀ mostrou-se menos tóxica em comparação aos isolados
21 ($75,69 \pm 2,37$ ppm). O intestino médio apresentou alterações histológicas em todos os tratamentos
22 quando comparados ao controle, todavia sequelas acentuadas como vacuolização, tumefação
23 celular e perda da matriz peritrófica, foram expressas na associação. Quanto a apoptose, apenas os
24 tratamentos contendo o BMDB, isolado e associado, apresentaram aumento quando comparados

25 ao controle. No PCNA, as larvas da associação apresentaram um menor índice quando
26 comparadas aos outros tratamentos. Para a fenoloxidase e óxido nítrico verificou-se redução no
27 BMDB e associação, em relação ao controle. No estresse oxidativo não houve diferença estatística
28 na mensuração da glutathiona, já o TBARS apresentou redução para associação. Com isso, destaca-
29 se que, dentre os compostos estudados, a combinação binária proveniente da associação,
30 apresentou os melhores resultados decorrentes de danos mais profundos. Vale salientar que tais
31 resultados foram obtidos na CL₅₀, e que concentrações maiores, a semelhança das utilizadas em
32 campo, ou em proporções distintas podem proporcionar efeitos ainda mais expressivos e efetivos
33 para o manejo deste vetor.

34

35 PALAVRAS-CHAVE: Arboviroses, biomoléculas, dengue, fisiologia, imunohistoquímica.

36

37

38

39 IMMUNOHISTOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF *Aedes aegypti*
40 LARVAE (DIPTERA: CULICIDAE) SUBJECTED TO TERPINOLENE AND 1-BUTYL-3,4-
41 METHYLENEDIOXYBENZENE AND THEIR ASSOCIATION

42

por

43

MARIA CLARA DA NÓBREGA FERREIRA

44

(Sob Orientação da Professora Valéria Wanderley Teixeira UFRPE)

45

ABSTRACT

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

Understanding the action of botanical compounds is a necessity faced in the control of *Aedes aegypti*. However, most research focuses on toxicological parameters, with the interaction with the intracellular environment being little explored. Studying the compounds terpinolene and 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (BMDB), Silva et al. (2016) found its promising insecticidal activity in this vector. Given this, the hypothesis was raised that the toxicity of these volatiles is related to damage to the intestinal epithelium, impacting its defense mechanisms, and that such damage is more significant and permanent compared to their binary combination. To validate them, their effects were evaluated at the cytotoxic (immunohistochemistry - Apoptosis and Cell Proliferation) and immunological (phenotoxicity, nitric oxide and oxidative stress - TBARS and Glutathione Transferase) levels. The LC50 of the isolated compounds were used according to Silva et al. (2016). For the association curve, LC50 was less toxic compared to isolates (75.69 ± 2.37 ppm). The midgut showed histological changes in all treatments when compared to the control, however marked sequelae such as vacuolization, cell swelling and loss of the peritrophic matrix were expressed in the association. As for apoptosis, only treatments containing BMDB, isolated and associated, showed an increase when compared to the control. In PCNA, larvae from

61 the association showed a lower rate when compared to other treatments. For phenoloxidase and
62 nitric oxide, there was a reduction in BMDB and association, in relation to the control. In
63 oxidative stress there was no statistical difference in the measurement of glutathione, whereas the
64 TBARS showed a reduction in association. Therefore, it is noteworthy that, among the
65 compounds studied, the binary combination resulting from the association, presented the best
66 results resulting from more severe damage. It is worth noting that these results were obtained at
67 CL50, and that higher concentrations, similar to those used in the field, or in different proportions
68 can provide even more expressive and effective effects for the management of this vector.

69

70 **KEYWORDS:** Arboviruses, biomolecules, dengue, physiology, immunohistochemistry.

71

72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95

RESPOSTA IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE LARVAS DE *Aedes aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDAS AO TERPINOLENO E 1-BUTIL-3,4-
METILENODIOXIBENZENO E SUA ASSOCIAÇÃO

por

MARIA CLARA DA NÓBREGA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Entomologia.

RECIFE - PE

Fevereiro - 2024

96	
97	
98	RESPOSTA IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>
99	(DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDAS AO TERPINOLENO E 1-BUTIL-3,4-
100	METILENODIOXIBENZENO E SUA ASSOCIAÇÃO
101	
102	por
103	
104	MARIA CLARA NÓBREGA FERREIRA
105	
106	
107	
108	
109	
110	Comitê de Orientação:
111	Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE
112	Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE
113	Glaucilane Dos Santos Cruz – UFRPE
114	

115
116
117 RESPOSTA IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE LARVAS DE *Aedes aegypti*
118 (DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDAS AO TERPINOLENO E 1-BUTIL-3,4-
119 METILENODIOXIBENZENO E SUA ASSOCIAÇÃO

120

121 por

122

123 MARIA CLARA DA NÓBREGA FERREIRA

124

125

126

127

128

129 **Banca Examinadora:**

130 Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro – UFPE

131 Kamila de Andrade Dutra – SEE – EREM PACL

132

133

134

135

136

Maria Clara da Nóbrega Ferreira
Mestre em Entomologia

Prof. Valéria Wanderley Teixeira –
UFRPE
Orientadora

137

138

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M333r

Ferreira, Maria Clara da Nóbrega Ferreira

RESPOSTA IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOLÓGICA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) SUBMETIDAS AO TERPINOLENO E 1-BUTIL-3,4-METILENODIOXIBENZENO E SUA ASSOCIAÇÃO / Maria Clara da Nóbrega Ferreira Ferreira. - 2024.

77 f. : il.

Orientadora: Valeria Wanderley Teixeira.

Coorientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira e Glaucilane dos Santos Cruz.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Recife, 2024.

1. Imunohistoquímica. 2. Apoptose. 3. Histologia. 4. *Aedes aegypti*. 5. Compostos botânicos. I. Teixeira, Valeria Wanderley, orient. II. Cruz, Alvaro Aguiar Coelho Teixeira e Glaucilane dos Santos, coorient. III. Título

CDD 632.7

139

140

141

DEDICATÓRIA

142 Aos meus pais, Sebastião Rodrigues Ferreira e Roseane Duarte da Nóbrega Ferreira, pelo

143 apoio incondicional e por todo esforço para investir na minha educação.

144

145

146

147

AGRADECIMENTOS

148 Sobretudo a Deus, por ter me concedido a graça de finalizar este ciclo de estudo;

149 A Universidade Federal Rural De Pernambuco e ao Programa de Pós – Graduação em

150 Entomologia pelo acolhimento e oportunidade de realização do curso de mestrado;

151 A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

152 pela concessão da bolsa de estudo;

153 Aos meus pais, irmãos e todos os familiares que foram meu apoio durante os momentos

154 difíceis, por toda palavra de acolhimento, conselho, incentivo e felicidade junto a mim a cada

155 etapa vencida;

156 Ao meu noivo Lucas que sempre esteve ao meu lado me encorajando e sendo fonte de

157 carinho, amor e paciência que foram fundamentais para que eu encarasse os desafios que

158 surgiram, e aos seus familiares pelo acolhimento e alegria de partilhar este momento;

159 A minha professora orientadora Valéria Wanderley Teixeira e coorientador Álvaro Aguiar

160 Coelho Teixeira, por em certos momentos terem sido mais que professores, por toda confiança

161 que depositaram em mim, pelos momentos felizes, conselhos, ensinamentos e paciência com o

162 qual guiaram o meu aprendizado;

163 Especialmente a Glaucilane dos Santos Cruz, por todo encorajamento dentro e fora do

164 laboratório, por ter me dado forças para lutar pelos meus sonhos, por ter feito das minhas lágrimas

165 as suas e dos meus sorrisos os seus. Obrigada por ter tornado essa caminhada mais leve, pelos

166 momentos felizes e de descontração que vivemos juntas e que, com certeza levarei no coração;

167 Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia de Insetos e Laboratorio de Estudos
168 Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados. Em especial à Ismaela por sua disponibilidade de
169 me ensinar e auxiliar nos experimentos;

170 Aos meus amigos Marcelle Sales, Maria Clara Lopes e Jefferson de Souza, pela amizade
171 que construímos desde a graduação e por todo apoio que demos uns aos outros ao longo destes
172 anos de estudos.

173

174			
175			
176		SUMÁRIO	
177			Página
178	AGRADECIMENTOS		IX
179	CAPÍTULOS		
180	1 INTRODUÇÃO		1
181	LITERATURA CITADA.....		9
182	2 IMPACTOS FISIOLÓGICOS DO USO DE XENOBIÓTICOS SOBRE O		
183	MOSQUITO VETOR <i>Aedes aegypti</i> LINNAEUS (DÍPTERA: CULICIDAE).....		15
184	RESUMO		16
185	ABSTRACT		17
186	INTRODUÇÃO		19
187	MATERIAL E MÉTODOS		22
188	RESULTADOS E DISCUSSÃO		22
189	AGRADECIMENTOS.....		27
190	LITERATURA CITADA.....		27
191	3 EFEITO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS ISOLADOS OU ASSOCIADOS SOBRE		
192	PARÂMETROS CITOTÓXICOS E IMUNOLÓGICOS EM LARVAS DE <i>Aedes</i>		
193	<i>aegypti</i> : UMA PERSPECTIVA DE CONTROLE		34
194	RESUMO		35
195	ABSTRACT		36
196	INTRODUÇÃO		38
197	MATERIAL E MÉTODOS		40

198	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
199	AGRADECIMENTOS	52
200	LITERATURA CITADA.....	52
201	4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
202		
203		
204		
205		
206		
207		
208		
209		
210		
211		
212		
213		
214		
215		
216		
217		
218		
219		
220		
221		

222

223

224

CAPÍTULO 1

225

INTRODUÇÃO

226

227

228

229

230

231

Classificadas como um grupo de vírus que compartilham a capacidade de replicação em hospedeiros artrópodes e vertebrados, as arboviroses são doenças veiculadas por meio de insetos hematófagos, reconhecidas como um desafio de saúde pública de proporções avassaladoras (Vilibic-Cavlek *et al.* 2021, Leite *et al.* 2022). Estes agentes virulentos representam aproximadamente 17% da carga global de doenças transmissíveis e podem levar a óbito mais de setecentos mil indivíduos ao ano (Pereira *et al.* 2019).

232

233

234

235

236

237

238

239

240

Segundo o International Arbovirus Catalog, mais de 530 arbovírus estão descritos atualmente (Centers for Disease Control and Prevention, 2022). Destes, cerca de 20% são patogênicos a humanos e estão agrupados, principalmente, em cinco famílias: Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (Avelino-Silva & Ramos 2017). Embora a ampla diversidade taxonômica, as famílias Togaviridae e Flaviviridae recebem atenção especial por agruparem quatro das principais arboviroses humanas: febre amarela, dengue, zika e chikungunya (Souza-Neto *et al.* 2019). No entanto, nos últimos 50 anos, diante da suscetibilidade de mais de metade da população mundial, a infecção por dengue passou a ser a maior dentre todas já enfrentadas pelo homem (Sousa *et al.* 2023).

241

242

243

244

245

No cenário epidemiológico mundial, a inexistência de uma nomenclatura unificada para este vírus durante séculos, levanta algumas controvérsias a respeito da sua origem geográfica e distribuição espacial. No entanto, pesquisas ecológicas, sorológicas, bem como análises filogenéticas, levam-nos a hipótese mais aceita de que é originário do continente asiático (Valle *et al.* 2015). Corroborando com este prognóstico, os registros mais antigos de uma doença

246 clinicamente compatível com a dengue datam do século III d.C. na China (Valle *et al.* 2015).
247 Entretanto, as circunstâncias de endemicidade por este vírus em diversas regiões só foram
248 observadas a partir do século XX, após o papel crucial do fim da Segunda Guerra Mundial nas
249 copiosas mudanças que ocorreram no âmbito social, ecológico e demográfico (Valle *et al.* 2015).

250 Em território nacional, os primeiros relatos de surto da doença são verificados a partir do
251 século XIX, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Bahia e Pernambuco (Valle *et al.* 2015).
252 Todavia, a dispersão exponencial do vetor, assim como o surgimento de formas clínicas cada vez
253 mais graves, tem sido constatada nos últimos dez anos (Brasil *et al.* 2023). Fatores associados à
254 ação antropogênica, como a intensificação do processo de globalização, assim como a influência
255 dos baixos índices de desenvolvimento humano, por demonstrarem uma fragilidade nos métodos
256 de controle, são alguns pontos determinantes para a consolidação do hábito antropofílico deste
257 vetor nos ambientes peridomiciliares (Gould *et al.* 2017).

258 Atualmente, a circulação simultânea de quatro formas virais da dengue (DENV-1, DENV-2,
259 DENV-3, DENV-4 e DENV-5) bem como das demais doenças transmitidas pelo vetor *Aedes*
260 *aegypti* (Díptera: Culicidae) no mundo, podem ser circunstâncias favoráveis para o desenvolvimento
261 de um estado de coinfeção, muitas vezes não identificado nos sistemas de saúde (Fonseca *et al.*
262 2019). Ademais, deixam evidente a alta capacidade mutagênica deste vetor, viabilizando sua rápida
263 evolução e adaptação a hospedeiros distintos (Souza-Neto *et al.* 2019).

264 Embora a princípio descrito por Linnaeus no Egito em 1782, o *Ae. aegypti* é natural da África
265 subsaariana e já circulava anteriormente por outras regiões do globo terrestre, como Índia e o
266 continente americano (Terra *et al.* 2017, Mejía-Guevara 2020). Apesar de exibir um arranjo de
267 distribuição cosmopolita, estes insetos possuem preferência por regiões tropicais, em decorrência
268 das altas temperaturas favorecerem sua amplificação populacional e rede de transmissão (Silva-
269 Voorham *et al.* 2009).

270 Possuindo um ciclo de vida com duração média de 45 dias, a biologia reprodutiva das fêmeas
271 adultas é bem característica (Silva *et al.* 2023). Durante um único ciclo gonadotrófico, estas são
272 capazes de produzir cerca de 150 ovos, dispostos em reservatórios distintos e que sejam pobres
273 em matéria orgânica (Zara *et al.* 2016). Tal comportamento, conhecido como saltos de oviposição,
274 busca garantir o sucesso reprodutivo e a dispersão da prole, tendo em vista que a capacidade de
275 voo destes insetos é relativamente curta (Reiter *et al.* 1991). Geralmente, a dispersão natural
276 destas fêmeas adultas ocorre em um raio de 30 a 50 metros do local onde iniciaram suas
277 atividades biológicas (Forattini 2002).

278 A embriogênese – fase de maior resistência às perturbações externas – pode variar de quatro a
279 sete dias dependendo das condições ambientais (Forattini 2002). Os ovos elipsoides depositados
280 nas paredes dos criadouros, logo acima do nível da água, podem suportar variações de
281 temperatura e períodos de dessecação, permanecendo em quiescência por mais de seis meses
282 (Zara *et al.* 2016). Tal característica é consequência do seu rígido invólucro denominado córion,
283 que além de proteger, permite as trocas gasosas e o impedimento da perda de água (Pombo *et al.*
284 2021).

285 As fases larval e pupal ocorrem em meio aquático, sendo a eclosão das larvas auxiliada pela
286 presença de um “dente” quitinoso (Consoli & Oliveira 1994). Possuindo um aspecto vermiforme,
287 a transição entre os estágios (L1 a L4) têm duração média de 24h e 48h, respectivamente, sob
288 temperatura ideal de 28°C (Silva *et al.* 2007). A presença de 222 pares de cerdas que variam em
289 forma e tamanho e estão dispostos simetricamente ao longo do corpo destes insetos, auxiliam na
290 detecção sensorial e na flutuação (Consoli & Oliveira 1994). A nutrição durante estes períodos de
291 desenvolvimento é realizada, principalmente, por meio filtração de partículas ou microplânctons
292 existentes nestes criadouros, mas também pela ingestão de matéria orgânica (Terra *et al.* 2017).

293 Os insetos adultos possuem coloração corporal escura e comprimento de 3-4 milímetros. São
294 facilmente distinguidos dos demais mosquitos por seu padrão de coloração listrado preto e branco
295 nas pernas, além disso, apresentam um sinal, no lado dorsal do tórax, em forma de lira (Forattini
296 2002). Logo após sua emergência podem iniciar o processo de cópula e oviposição, alcançando o
297 mais alto desempenho durante os crepúsculos matutino e vespertino (Carvalho & Moreira 2017).

298 Neste entreposto, a atividade hematofágica, restrita as fêmeas deste inseto, ocorre com o
299 intuito de proporcionar a maturação e nutrição adequada do ovo (Navarro *et al.* 2013). Por
300 possuírem uma substância anestésica e anticoagulante na saliva, as picadas destes insetos tornam-
301 se quase indolor e o repasto sanguíneo pode ser realizado diversas vezes durante um único ciclo
302 reprodutivo, aumentando assim, a possibilidade de transmissão e infecção a mais de um
303 hospedeiro vertebrado (Terra *et al.* 2017). Os vírus então se replicam no interior do intestino do
304 inseto e ao serem transportados através da hemolinfa, acabam infectando outros órgãos como os
305 ovários, propiciando assim, a transmissão vertical entre as gerações (Pombo *et al.* 2021).

306 Diante de tais especificidades, o desenvolvimento de táticas de controle que atuem
307 diretamente impedindo o êxito do ciclo biológico da espécie têm sido aplicadas. Neste contexto,
308 as ações de manejo do ambiente e mobilização social concentram-se, basicamente, na detecção,
309 destruição e prevenção do surgimento de habitats (Zara *et al.* 2016). Tais condutas, embora
310 vantajosas sob a perspectiva econômica, necessitam do investimento de políticas públicas na
311 infraestrutura local e nos sistemas de saúde para uma operação satisfatória a longo prazo (Bühler
312 *et al.* 2019).

313 Em relação ao emprego de larvicidas e pesticidas registrados para o *Ae. aegypti*, é necessário
314 considerarmos que estas moléculas neurotóxicas demandam elevados investimentos para compra
315 e aplicação (Teich *et al.* 2019). No Brasil, os custos relacionados a tais produtos é o maior das
316 Américas, ultrapassando os 42% em relação ao total de gastos (Martins *et al.* 2020).

317 Atrelado a essa questão, é de suma importância refletir a respeito dos efeitos que
318 desencadeiam no ecossistema, tendo em vista que a sua baixa volatilidade e degradabilidade
319 possibilitam a persistência de resíduos ao longo da cadeia trófica (Pereira *et al.* 2021). Além
320 disso, a continuidade dos elevados índices da população vetorial do inseto demonstra a falta de
321 congruência entre estas ações e a realidade atual. Alguns trabalhos na área, inclusive, já relatam a
322 ocorrência de populações resistentes em diferentes locais do Brasil a alguns inseticidas, como o
323 Temephos (Gambarra *et al.* 2013, Diniz *et al.* 2014, Macoris *et al.* 2014, Corte *et al.* 2018).

324 Diante desta problemática, estudos na área concentram-se na busca pelo desenvolvimento de
325 novas possibilidades pautadas na seguridade ambiental, para o manejo desta espécie. Neste
326 contexto, a exploração a respeito dos diversos viés que o uso de biomoléculas possibilita tem se
327 mostrado uma alternativa promissora (Silva *et al.* 2016, Pereira *et al.* 2021).

328 Amplamente consolidados no mercado alimentício, farmacêutico e de cosméticos, os óleos
329 essenciais, bem como os extratos vegetais e/ou seus compostos isolados possuem uma
330 complexidade química, com um intrínseco arranjo de monoterpenos, sesquiterpenos,
331 fenilpropanóides dentre outros compostos aromáticos de baixo peso molecular que podem ser o
332 ponto-chave para a dificuldade no desenvolvimento de mecanismos de resistência por estes
333 insetos pragas (Rodrigues *et al.* 2017).

334 Alguns de seus constituintes, a exemplo o terpinoleno, limoneno α e β -pineno, já são
335 conhecidos no meio científico pela atividade inseticida diante de alguns insetos e, até mesmo
336 utilizados em larga escala, como o safrol, empregado para síntese do butóxido de piperonila
337 (PBO), sinergista de inseticidas (Lima 2015, Cruz *et al.* 2017).

338 Apesar dos estudos conduzidos com o *Ae. aegypti*, também apresentarem respostas inseticidas
339 satisfatórias a utilização destes biopesticidas (Arruda *et al.* 2003, Valotto *et al.* 2011, Silva *et al.*
340 2016, Albuquerque *et al.* 2022), as atividades destes metabólitos secundários em insetos pragas

341 podem incluir também a ação de mecanismos repelentes e deterrentes que no caso do vetor em
342 questão, podem impactar diretamente na transmissão dos agentes virais e nos seus níveis
343 populacionais no ambiente, respectivamente (Santos *et al.* 2012, Teixeira *et al.* 2022).

344 Utilizados desde a antiguidade na forma de fumaça aromática para o combate a insetos
345 hematófagos (Oliferenko *et al.* 2013), os repelentes segundo Schreck (1997) e Ribas e Carreño
346 (2010) constituem moléculas que atuam estimulando a fuga ou impedindo a aproximação de
347 insetos de superfícies previamente tratadas, contribuindo assim para a redução na transmissão de
348 doenças infecciosas (Teixeira *et al.* 2022).

349 Os deterrentes por sua vez, são moléculas capazes de impedir a oviposição dos mosquitos nas
350 regiões em que foram aplicados (Santos *et al.* 2012). Tal processo de rejeição na deposição de
351 seus ovos pode estar relacionado a captação de sinais quimiossensoriais pelas sensilas das fêmeas
352 do inseto, o qual afetam seu comportamento ao serem direcionados para outros locais em que
353 possam completar seu ciclo reprodutivo (Vogt 2005).

354 Análises químicas a respeito destes compostos secundários demonstram que as altas
355 concentrações de flavonóides, amidas, lignanos, terpenos, esteróides, propenilfenóis e alcalóides
356 são os responsáveis pelo sucesso de sua atividade sobre múltiplos alvos na fisiologia do
357 organismo em questão (Corrêa & Salgado 2011). O dilapiol, por exemplo, incluso na classe dos
358 fenilpropanoides, age sinergicamente a piretróides, inibindo a ação do citocromo P450 e
359 CYP34A, reduzindo a capacidade do inseto de excretar xenobióticos adquiridos por meio da
360 alimentação e levando-o a morte por meio do acúmulo de substâncias tóxicas no intestino (Li *et*
361 *al.* 2007, Carballo-Arce *et al.* 2019).

362 Silva *et al.* (2016) após seus estudos, verificaram que os compostos terpinoleno e 1-butil-3,4-
363 metilenodioxibenzeno apresentaram atividade inseticida em larvas de *Ae. aegypti*. Pereira-Filho *et*
364 *al.* (2021) após identificação dos compostos de algumas espécies de *Piper* spp., conferiram o

365 efeito letal sobre cepas suscetíveis e resistentes aos fenilpropanóides: Dillapiol, E-Anetol e β -
366 Asarona e monoterpenos: γ -Terpineno, p -Cimeno, Limoneno, α -Pineno e β -Pineno. França *et al.*
367 (2021), após o tratamento de larvas de *Ae. aegypti* com o óleo essencial de *P. capitarianum*
368 (Piperales: Piperaceae) observaram alterações morfológicas e a extrusão do conteúdo intestinal,
369 juntamente com a matriz peritrófica.

370 Diante da vasta gama de pesquisas conduzidas, fica evidente a ação larvicida que muitos
371 destes compostos apresentam sobre o mosquito vetor da dengue (Furtado *et al.* 2005, Silva *et al.*
372 2017, Albuquerque *et al.* 2022, Azevedo *et al.* 2023). No entanto, raros são os trabalhos que
373 focam no detalhamento da ação destas biomoléculas, sobre a homeostase do organismo do inseto
374 alvo, rota metabólica e possíveis efeitos em longo prazo, especialmente sobre parâmetros
375 nutricionais, visto a sua relevância e complexidade para a manutenção da espécie no sistema
376 (Silva *et al.* 2016, Cruz *et al.* 2017). Por meio destas informações o desenvolvimento de
377 estratégias mais seguras e efetivas de controle será possível.

378 Conhecido por seu impacto sobre o desenvolvimento de um organismo saudável, o aparelho
379 digestivo dos insetos é documentado como uma região imunológica imprescindível para a
380 compreensão do mecanismo de ação de moléculas xenobióticas (Gullan & Cranston 2012).
381 Alterações no funcionamento adequado desta barreira estrutural, como a ação de agentes
382 invasores, desencadeiam respostas ao longo da hemocele que podem refletir diretamente sobre a
383 fisiologia evolutiva e reprodutiva das espécies (Silva *et al.* 2019).

384 Formado por um epitélio de células colunares, regenerativas e glandulares, a região mediana
385 do intestino tem sido um grande objeto de estudo, em decorrência da sua importância para uma
386 absorção adequada de nutrientes e a síntese e secreção de enzimas e hormônios que irão auxiliar
387 no processo digestivo (Gullan & Cranston 2012, Vantaux *et al.* 2016). Apresentando em seu
388 interior a estrutura protetora conhecida como matriz peritrófica (MP), especialmente em insetos

389 hematófagos, como o *Ae. aegypti*, impede o contato direto de moléculas citotóxicas provenientes
390 da digestão de sangue com a parede celular (Okuda *et al.* 2007).

391 Entretanto, objetivando conter os danos provocados pela ação de moléculas invasoras, esta
392 intrincada trama de funcionamento expõe também um complexo mecanismo de defesas celulares e
393 humorais que agem a nível local e sistêmico, garantindo o sucesso da resposta imune nestes
394 organismos (Eleftherianos & Revenis 2011, Silva *et al.* 2019). Comumente observada em
395 organismos pluricelulares, a apoptose consiste em um destes sistemas de defesa que atua na
396 eliminação de células danificadas durante o desenvolvimento ou a partir de situações atípicas (Shu
397 *et al.* 2018, Yoon *et al.* 2020).

398 Correlacionado a isso, a produção de moléculas reativas de oxigênio, bem como o processo de
399 melanização, por meio da ação enzimática da fenoloxidase constituem reações imunes através de
400 cascatas proteolíticas que são ativadas mais rapidamente do que as respostas dependentes de
401 expressão gênica e, por isso, desempenham papel fundamental contra agentes invasores (Cerenius
402 *et al.* 2010). Além destas, o reconhecimento de moléculas citotóxicas pode ainda ser realizado
403 pelo óxido Nítrico (NO₂), um mediador gasoso responsável por uma variedade de fenômenos
404 fisiológicos, todavia por também ser espécie reativa de nitrogênio, seu acúmulo pode culminar em
405 danos irreversíveis ao organismo (Cerqueira & Yoshida 2002, Silva *et al.* 2019). O caráter
406 citotóxico destas estratégias de defesa pode levar a perda das funções básicas dos constituintes
407 celulares, como lipídios, proteína e DNA, desencadeando na sua modificação e,
408 consequentemente, inutilização ou inibição da função normal nos insetos (Valko *et al.* 2007, Silva
409 & Mascarenhas 2021).

410 Objetivando conter o avanço das reações em cadeia, provocados por estas toxinas, o epitélio
411 intestinal pode ainda, por meio da proliferação de células tronco ou regenerativas ser recuperado
412 (Zhang & Edgar 2022). Estes grupos de células, encontrados sob a forma de ninhos ao longo do

413 epitélio permitem a manutenção de suas características primárias e ao serem ativadas indicam a
414 possível recuperação do órgão e a reversibilidade do quadro toxicológico (Miller & Zachary
415 2017).

416 Diante dos dados de toxicidade constatada no trabalho de Silva *et al.* (2016) dos compostos
417 terpinoleno e o BMDB, a presente pesquisa testou as seguintes hipóteses: 1. A toxicidade destes
418 compostos está relacionada a danos a estrutura epitelial no intestino médio e impactam
419 diretamente nos mecanismos de defesa do *Ae aegypti* contra moléculas xenobióticas, propiciando
420 assim, o desenvolvimento de técnicas de controle mais efetivas para este vetor. 2. Tais danos são
421 mais expressivos e permanentes frente à combinação binária desses compostos (sinergismo), pela
422 sua atuação em múltiplos sítios alvo. Para validar essas hipóteses avaliou-se o efeito dos
423 compostos isolados e associados, a nível citotóxico (análise imunohistoquímica do intestino
424 médio) e imunológico (fenoloxidade, óxido nítrico e estresse oxidativo).

425

426

Literatura Citada

427 **Albuquerque, B.N.L., M.F.R. Silva, P.C.B. Silva, C.S.D.L. Pimentel, S.K.L. Rocha,**
428 **J.C.R.O.F. Aguiar, A.C. Agra-Neto, P. M.G. Paiva, M.G.M. Gomes, E.F. Silva-Júnior &**
429 **D.M.D.A.F. Navarro. 2022.** Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of β -
430 germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes*
431 *aegypti*. Industrial Crops and Products, 182: 114830.

432 **Albuquerque, J.S., E. Gama, L.P. França & R.P. De-Jesus. 2020.** Atividade larvicida dos
433 óleos essenciais de *Piper dilatatum* e *Piper hostmannianum* (Piperaceae) para o controle de
434 *Aedes aegypti* (Culicidae) em laboratório. Ciência em foco, 4: 22-28.

435 **Arruda, W., G.M.C. Oliveira & I.G.D. Silva. 2003.** Toxicidade do extrato etanólico de
436 *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Revista da Sociedade Brasileira de
437 Medicina Tropical, 36: 17-25.

438 **Avelino-Silva, V.I. & J.F. Ramos. 2017.** Arboviroses e políticas públicas no Brasil. Revista
439 Ciências Em Saúde, 3: 1-2.

- 440 **Azevedo, F.R., R.C.A.B. Ferreira, C.S. Leandro, I.M. Araújo & S.R. Tintino. 2023.** Use of
441 essential oils from plants of Araripe National Forest against *Aedes aegypti* (Diptera:
442 Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, 83: e275062.
- 443 **Brasil, C.A., E.D.A. Cavalcante, H.J. Andrade & L.K.L. Araújo. 2023.** Dengue clássica:
444 análise comparativa do perfil epidemiológico da morbimortalidade na Bahia e no Brasil.
445 *Brazilian Journal of Development*, 9: 2460-2472.
- 446 **Bühler, C., V. Winkler, S. Runge-Ranzinger, R. Boyce & O. Horstick. 2019.** Environmental
447 methods for dengue vector control—A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected*
448 *tropical diseases*, 13: 1-15.
- 449 **Carballo-Arce, A.F., V. Raina, S. Liu, R. Liu, V. Jackiewicz, D. Carranza, J.T. Arnason &**
450 **T. Durst. 2019.** Potent CYP3A4 inhibitors derived from dillapiol and sesamol. *ACS*
451 *Omega*, 4: 10915–10920.
- 452 **Carvalho, F.D. & L.A. Moreira. 2017.** Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a
453 Species?. *Neotropical entomology*, 46: 243-255.
- 454 **Centers for Disease Control and Prevention. 2022.** Disponível em:
455 <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>. Acesso em: 10/12/2023.
- 456 **Cerenius, L., S. Kawabata, B.L. Lee, M. Nonaka & K. Söderhäll. 2010.** Proteolytic cascades
457 and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.*, 35: 578-583.
- 458 **Cerqueira, N.F. & W.B. Yoshida. 2002.** Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17:
459 417-423.
- 460 **Consoli, R.A.E.B. & R.L. Oliveira. 1994.** Principais mosquitos de importância sanitária no
461 Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p.
- 462 **Corte, R.L., V.A.D. Melo, S.S. Dolabella & L.S. Marteis. 2018.** Variation in temephos
463 resistance in field populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the State of Sergipe,
464 Northeast Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51: 284-290.
- 465 **Corrêa, J.C.R. & H.D.N Salgado. 2011.** Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão.
466 *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, 13: 500-506.
- 467 **Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C.**
468 **Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of
469 trans-anethole, limonene and your combination in nutritional components and their
470 reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda*
471 (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.*, 263: 74-80.
- 472 **Diniz, M.M.C.D.S.L., A.D.D.S. Henriques, R.D.S. Leandro, D.L. Aguiar & E.B. Bezerra.**
473 **2014.** Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Revista de*
474 *saude publica*, 48: 775-782.

- 475 **Eleftherianos I. & C. Revenis. 2011.** Role and importance of phenoloxidase in insect
476 hemostasis. *Journal of Innate Immunity*, 3: 28–33.
- 477 **Fonseca, E.O.L., M.L.G. Macoris, R.F. Santos, D.G. Morato, M.D.S.S. Isabel, N.A.**
478 **Cerqueira & A.F. Monte-Alegre. 2019.** Experimental study on the action of larvicides in
479 *Aedes aegypti* populations collected in the Brazilian municipality of Itabuna, Bahia, under
480 simulated field conditions. *Epidemiol. Serv. Saude*, 28: e2017316.
- 481 **Forattini, O.P. 2002.** *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia.* São Paulo:
482 Editora da Universidade de São Paulo, 880p.
- 483 **França, L.P., A.C.F. Amaral, A.D.S. Ramos, J.L.P. Ferreira, A.C.B. Maria, K.M. T. Oliveira**
484 **& J.R.D.A. Silva. 2021.** Piper capitarianum essential oil: a promising insecticidal agent for
485 the management of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Environmental Science and*
486 *Pollution Research*, 28: 9760-9776.
- 487 **Furtado, R. F., M.G. de Lima, M. Andrade Neto, J.N. Bezerra & M.G.D.V. Silva. 2005.**
488 Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).
489 *Neotropical Entomology*, 34: 843-847.
- 490 **Gambarra, W.P.T., W.F.S. Martins, M.L.L. Lucena-Filho, I.M.C. Albuquerque, O.K.S.**
491 **Apolinário & E.B. Bezerra. 2013.** Spatial distribution and sterase activity in populations of
492 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. *Revista da*
493 *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46: 178-84.
- 494 **Gould, E., J. Pettersson, S. Higgs, R. Charrel, & X. de Lamballerie. 2017.** Emerging
495 arboviruses: why today? *One Heal.*, 4: 1-13.
- 496 **Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** *Os insetos: um resumo de entomologia.* São Paulo, Roca,
497 494p.
- 498 **Leite, A.C.R.M., A.M.F. Rabelo, M.W.F. Rabelo, B.H. Alves, L.G. Oliveira, L.M.**
499 **Pitombeira, M.V.P. Reis, L.L. Pinho & R.M. Nunes. 2022.** Climatic and socio-
500 demographic factors stand out in Ceará cities with higher incidence of arbovirolosis
501 transmitted by *Aedes aegypti*. *Research Society and Development*, 11: 1-13.
- 502 **Li, X., M.A. Schuler & M.R. Berenbaum. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic
503 resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52: 231-
504 253
- 505 **Lima, L.M. 2015.** Safrole and the versatility of a natural biophore. *Rev. Virtual Quim.*, 7: 495-
506 538.
- 507 **Macoris, M.D.L.D.G., M.T.M. Andrichetti, D.M.V. Wanderley & P.E.M. Ribolla. 2014.**
508 Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São
509 Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47: 573-578.

- 510 **Martins, A.B.S., F.G.S. Correia, L.P.D.G. Cavalcanti & C.H. Alencar. 2020.** Dengue in
511 northeastern Brazil: a spatial and temporal perspective. *Revista da Sociedade Brasileira de*
512 *Medicina Tropical*, 1: 1-8.
- 513 **Mejía-Guevara, M.D., F. Correa-Morales, C. González-Acosta, E. Dávalos-Becerril, J.L.**
514 **Peralta-Rodríguez, A. Martínez-Gaona & M. Moreno-García. 2020.** *Aedes aegypti*, the
515 dengue fever mosquito in Mexico City. Early invasion and its potential risks. *Gaceta médica*
516 *de México*, 156: 388-395.
- 517 **Miller, M.A. & J. F. Zachary. 2017.** Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation,
518 and death. *Pathologic basis of veterinary disease*, 2: 19-43.
- 519 **Pombo, A.P.M., H.J.C.D. Carvalho, R.R. Rodrigues, M. León, D.A. Maria & M.A. Miglino.**
520 **2021.** *Aedes aegypti*: morfologia dos ovos e desenvolvimento embrionário. *Parasitas e*
521 *Vetores*, 14: 1-12.
- 522 **Navarro, D.M.A.F., P.C.B. Silva, M.F.R. Silva, T.H. Napoleão & P.M.G. Paiva. 2013.**
523 Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical
524 constituents against *Aedes aegypti*. *The Natural Products Journal*, 3: 268-291.
- 525 **Oliferenko, P.V., A.A. Oliferenko, G.I. Poda, D.I. Osolodkin, G.G. Pillai, U.R. Bernier, M.**
526 **Tsikolia, N.M. Agramonte, G.G. Clark, K.J. Linthicum, A.R. Katritzky. 2013.**
527 Quimiotipos promissores de repelentes de *Aedes aegypti* identificados por meio de QSAR
528 integrado, triagem virtual, síntese e bioensaio. *PLoSOne* , 8: e64547.
- 529 **Okuda, K., F. Almeida, R.A. Mortara, H. Krieger, O. Marinotti & A.T. Bijovsky. 2007.** Cell
530 death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Journal of*
531 *insect physiology*, 53:1307-1315.
- 532 **Pereira-Filho, A.A., G.C.D.Á. Pessoa, L.F. Yamaguchi, M.A. Stanton, A.M. Serravite, R.H.**
533 **Pereira & M.J. Kato. 2021.** Larvicidal activity of essential oils from Piper species against
534 strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids. *Frontiers in plant*
535 *science*, 12: 685864.
- 536 **Pereira, A.P.M., T.G.T. Martins, A.P. Araújo-Neto, C.E.P. Conceição, F.O.V.A Conceição,**
537 **R.T. Sousa, L.S. Silveira, A.M.A.S. Carvalho, L.B.C. Soares, F.C.A. Teixeira, P.V.S.**
538 **Rosa & G.O. Everton. 2021.** Constituintes químicos e potencial larvicida frente *Aedes*
539 *aegypti* do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. *Research Society and Development*, 10:
540 e9910917683-e9910917683.
- 541 **Pereira, C.B, M.G.D. Fonseca, F.B. Mota. 2019.** Long term prevention and vector control of
542 arboviral diseases: What does the future hold? *International Journal Infect. Dis.*, 89: 169–74.
- 543 **Reiter, P. & M.A.A.A.N. Colon. 1991.** Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for
544 daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 7: 52-55.
- 545 **Ribas, J. & A. M. Carreño. 2010.** Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em
546 militares na Bacia Amazônica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85: 33-38.

- 547 **Rodrigues, J., D.S.C., Barbosa, J.M., Carvalho J. R. & Vianna, U.R. 2017.** A versatilidade no
548 uso de óleos essenciais. Tópicos especiais em ciência animal VI, 1: 97-108.
- 549 **Santos, R.S. M., R.L.S. Duro, G.L. Santos, J. Hunter, M.D.A.R. Teles, R. Brustulin & S.V.**
550 **Komninakis. 2020.** Detecção de coinfeção pelos vírus Chikungunya e Dengue sorotipo 2
551 em amostras de soro de pacientes no Estado do Tocantins, Brasil. *Jornal de infecção e saúde*
552 *pública*, 13: 724-729.
- 553 **Santos, T.S., T.E.S. Vieira, J.R. Paula, J.R. Oliveira Neto, L.C. Cunha, A.H. Santos & C.A.**
554 **Romano. 2021.** Influence of drying on the chemical composition and bioactivity of *Piper*
555 *aduncum* (Piperaceae) essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Research*
556 *Society and Development*, 10: e46810817397-e46810817397.
- 557 **Shu, B., J. Zhang, G. Cui, R. Sun, X. Yi & G. Zhong. 2018.** Azadirachtin affects the growth of
558 *Spodoptera litura* Fabricius by inducing apoptosis in larval midgut. *Frontiers in physiology*,
559 9: 137.
- 560 **Silva, C.T., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, F.M. Cunha & Á.A.C. Teixeira. 2019.**
561 Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae)
562 nymphs sprayed with azadirachtin. *Austral Entomology*, 59: 215-224.
- 563 **Silva, E.S., G.A.M. Brito, C.E.A. Melo, M.V. Fernandes, A.L.S. Miranda, Y.F. Albernaz &**
564 **S.G. Rodrigues. 2023.** Epidemiologia e desafios no controle da Dengue no estado de Goiás,
565 Brasil. *Brazilian Journal of Health Review*, 6: 18208-18217.
- 566 **Silva, J.S., F.Z. Mariano & I. Scopel. 2007.** A influência do clima urbano na proliferação do
567 mosquito *Aedes aegypti* em Jataí (GO), na perspectiva da Geografia Médica. *Hygeia:*
568 *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 3: 33-49.
- 569 **Silva, J.S. & M.A. Mascarenhas. 2021.** Antioxidantes como nutracêuticos para mitigar estresse
570 oxidativo em abelhas: revisão sistemática. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 27: 53-73.
- 571 **Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S.B.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra-Neto, E.V.**
572 **Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva & D.M.A.F. Navarro. 2016.** Composition and
573 biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae).
574 *Exp. Parasitol.*, 1: 64-70.
- 575 **Silva-Voorham, J.M., A. Tami, A.E. Juliana, I.A. Rodenhuiszybert, J.C. Wilschut & J.M.**
576 **Smit. 2009.** Dengue: a growing risk to travellers to tropical and sub-tropical regions. *Ned.*
577 *Tijdschr. Geneeskd.*, 153: 778.
- 578 **Silva, T.I., A.C.L. Alves, F.R. de Azevedo, C.A. Marco, H.R. dos Santos & W.S. Alves. 2017.**
579 Efeito larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas de *Aedes aegypti* L.
580 (Diptera: Culicidae). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 12:
581 256-260.

- 582 **Sousa, S.S.S., A.C.R. Cruz, R.S. Oliveira, V.C.S. Pinheiro. 2023.** Clinical and epidemiological
583 characteristics of epidemic arboviruses in Brazil: Dengue, Chikungunya and Zika.
584 Electronic Journal Collection Health, 23: 1-8.
- 585 **Souza-Neto, J.A., J.R. Powell & M. Bonizzoni. 2019.** *Aedes aegypti* vector competence studies:
586 A review. Infection, genetics and evolution, 67: 191-209.
- 587 **Teich, V., R. Arinelli & L. Fahham. 2019.** *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico dos
588 arbovírus no Brasil. J. Bras. Econ. Saúde, 9: 267-276.
- 589 **Teixeira, H.S., S.A. Gualberto, D.C. Silva, T.G. Costa & D.L. Sousa. 2022.** Chemical
590 composition of croton and citronela and repelente action about *Aedes aegypti* Linn. Revista
591 Brasileira de Agroecologia, 17: 158-175.
- 592 **Terra, M.R., R.S. Silva, M.G.N. Pereira & A.F. Lima. 2017.** *Aedes aegypti* e arbovírus
593 emergentes no Brasil. Uningá Review, 30: 52-60.
- 594 **Valle, D., D.N. Pimenta & R.V. Cunha. 2015.** Dengue: teorias e práticas. Editora Fiocruz, 407p.
- 595 **Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur & J. Telser. 2007.** Free radicals
596 and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International
597 Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39: 44-84.
- 598 **Valotto, C.F.B., H.H.G.D. Silva, G. Cavasin, R. Geris, E. Rodrigues-Filho & I.G.D. Silva.**
599 **2011.** Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno
600 labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e a uma fração rica em taninos de
601 *Magonia pubescens* (Sapindaceae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,
602 44: 194-200.
- 603 **Vantaux, A., A.I. Ouattarra, T. Lefrève & K.R. Dabirè. 2016.** Effects of larvicidal and larval
604 nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for
605 *Plasmodium falciparum*. Parasites & vectors, 9: 1-11.
- 606 **Vilibic-Cavlek, T., L. Barbic, A. Mrzljak, D. Brnic, A. Klobucar, M. Ilic, N. Janev-Holcer,**
607 **Bogdanic, L. Jemersic, V. Stevanovic, I. Tabain, S. Kremer, M. Vucelja, J. Prpic, M.**
608 **Boljetic, P. Jelacic, J. Madic, I. Ferencak & V. Savic. 2021.** Emerging and Neglected
609 Viruses of Zoonotic Importance in Croatia. Pathogens, 10: 1-24.
- 610 **Yoon, J.S., J. Koo, S. George & S.R. Palli. 2020.** Avaliação de genes inibidores de apoptose
611 como alvos para controle de pragas de insetos mediado por RNAi. Arquivos de bioquímica
612 e fisiologia de insetos, 104: e21689.
- 613 **Zara, A.L.D.S.A., S.M.D. Santos, E.S. Fernandes-Oliveira, R.G. Carvalho & G.E. Coelho.**
614 **2016.** Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiologia e Serviços de
615 Saúde, 25: 391-404.
- 616 **Zhang, P. & B.A. Edgar. 2022.** Regeneração intestinal de insetos. Perspectivas de Cold Spring
617 Harbor em biologia, 14: a040915.

618

619

620

621

CAPÍTULO 2

622 IMPACTOS FISIOLÓGICOS DO USO DE XENOBIÓTICOS SOBRE O MOSQUITO VETOR

623 *Aedes aegypti* LINNAEUS (DÍPTERA: CULICIDAE)¹

624

625

626 Maria C. N. Ferreira¹, Glaucilane S. Cruz¹, Valéria W. Teixeira², Álvaro A. C. Teixeira²

627

628 ¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

629 Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

630 ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de

631 Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

632

633

634

635

636

637

638

639 ¹ Ferreira, M.C.N., G.S. CRUZ, C.O. SOUZA, V.W. TEIXEIRA & A.A.C. TEIXEIRA. Impactos fisiológicos do uso
640 de xenobióticos sobre o mosquito vetor *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). Avances científicos y
641 tecnológicos en ciencias agrícolas 2. Atena editora 2: 37-48.

642

643 RESUMO - Vetor da principal arbovirose do mundo, o *Aedes aegypti* é uma ameaça ao
644 desenvolvimento humano. As táticas de controle concentram-se na detecção e destruição de
645 criadouros, além da aplicação de inseticidas químicos. Todavia, a recorrência na aplicação destas
646 moléculas, corroboram para danos diretos ao meio, decorrentes da sua alta toxicidade. Ademais, a
647 recorrência de surtos epidêmicos, evidencia a lacuna no manejo adequado para este culicídeo.
648 Neste contexto, a busca por alternativas mais eficientes, levou os olhares para a possível
649 utilização de óleos essenciais e/ou de seus constituintes no manejo deste inseto, visto sua
650 biodegradabilidade, seletividade e a ampla atividade toxicológica, repelente, larvicida, citotóxica
651 já comprovada. Diante do exposto, avaliamos trabalhos sob a perspectiva fisiológica, de como
652 estas moléculas interagem com o organismo do inseto. Realizamos uma busca bibliográfica
653 online, utilizando palavras-chaves e delimitando a trabalhos científicos realizados nos últimos 15
654 anos. Foram selecionados 21 artigos para leitura. Após este levantamento, é possível inferir que
655 alterações estruturais na fisiologia digestiva do *Ae. aegypti* provenientes da ação de óleos
656 essenciais e seus compostos majoritários, são capazes de prejudicar o ciclo de vida do inseto, em
657 decorrência de uma nutrição defasada, assim como refletir diretamente sobre seus aspectos
658 reprodutivos, levando-o a morte. Embora isto também seja observado em trabalhos com
659 inseticidas químicos, o desenvolvimento de mecanismos de resistências a estas substâncias é cada
660 vez mais recorrente, além disso, do ponto de vista socioambiental são altamente prejudiciais.
661 Sendo assim, os óleos essenciais, constituem biomoléculas promissoras no combate ao mosquito
662 vetor de arboviroses, *Ae. aegypti*.

663

664 PALAVRAS-CHAVE: *Aedes aegypti*, fisiologia, inseticidas, intestino médio, óleos essenciais.
665

666

667

668 PHYSIOLOGICAL IMPACTS OF THE USE OF XENOBIOTICS ON THE MOSQUITO

669 VECTOR *Aedes aegypti* LINNAEUS (DIPTERA: CULICIDAE)

670

671 ABSTRACT – Vector of the world's main arbovirus, *Aedes aegypti* is a threat to human
672 development. Control tactics focus on detecting and destroying breeding sites, in addition to the
673 application of chemical insecticides. However, the recurrence in the application of these
674 molecules corroborates direct damage to the environment, resulting from their high toxicity.
675 Furthermore, the recurrence of epidemic outbreaks highlights the gap in adequate management for
676 this culicidae. In this context, the search for more efficient alternatives led us to look at the
677 possible use of essential oils and/or their constituents in the management of this insect, given their
678 biodegradability, selectivity and already proven broad toxicological, repellent, larvicidal and
679 cytotoxic activity. Given the above, we evaluated works from a physiological perspective, on how
680 these molecules interact with the insect organism. We carried out an online bibliographic search,
681 using keywords and limiting it to scientific work carried out in the last 15 years. 21 articles were
682 selected for reading. After this survey, it is possible to infer that structural changes in the digestive
683 physiology of *Ae. aegypti*, resulting from the action of essential oils and their major compounds,
684 are capable of harming the insect's life cycle, as a result of outdated nutrition, as well as directly
685 affecting its reproductive aspects, leading to its death. Although this is also observed in work with
686 chemical insecticides, the development of resistance mechanisms to these substances is
687 increasingly recurrent, in addition, from a socio-environmental point of view they are highly
688 harmful. Therefore, essential oils constitute promising biomolecules in the fight against the
689 mosquito vector of arboviruses, *Ae. aegypti*.

690

691 KEYWORDS: *Aedes aegypti*, physiology, insecticides, midgut, essential oils.

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

Introdução

717

718

719

720

721

722

723

724

Vetor da principal arbovirose do mundo, a dengue, assim como a Zika, Chikungunya e Febre amarela, o *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae), tem sido uma ameaça considerável para a saúde pública, em decorrência dos altos índices de infestação registrados a cada ano (Uno & Ross 2018). Natural do continente africano e, altamente adaptável a regiões de clima predominantemente tropical, como a América do Sul, a relação antrópica deste culicídeo está estritamente relacionada ao crescimento populacional desenfreado e a falta de políticas públicas habitacionais e de infraestrutura, que são marcas do processo de urbanização desordenado (Ribeiro *et al.* 2021).

725

726

727

728

729

730

731

Segundo dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), no período de Janeiro a Junho de 2020, foram registrados mais de 1,6 milhão de casos de dengue nas Américas, sendo 65% destes em território nacional (Menezes *et al.* 2021). Além disso, informações do Ministério da Saúde revelam que até o final de Abril deste ano, houve um aumento de 30%, 40% e 289%, nos casos de dengue, chikungunya e zika, respectivamente, em relação ao mesmo período no ano anterior, apresentando como os estados mais afetados o Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Acre e Rondônia.

732

733

734

735

736

737

Objetivando conter o avanço populacional desse mosquito, a ação conjunta dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS), Agentes de Combate a Endemias (ACE) e população, fornece um dos principais pilares, cujo desenvolvimento foca em detectar, destruir ou destinar de maneira adequada possíveis reservatórios naturais ou artificiais que sirvam de habitat para as fases imaturas do inseto (Zara *et al.* 2016). Ademais, através deste trabalho de monitoramento, tendo como base as amostras coletadas, é possível estabelecer o Índice de Infestação Predial (IIP),

738 utilizado para delimitação das áreas prioritárias a receberem outros tipos de intervenções (Ribeiro
739 *et al.* 2021).

740 Neste contexto, como forma de abordagem mais incisiva podem ser utilizados
741 mecanismos de controle biológico ou, mais comumente, a aplicação de inseticidas químicos. No
742 primeiro caso, a introdução de predadores ou patógenos, como a bactéria gram-positiva *Bacillus*
743 *turinghiensis* subsp. *israelensis* (Bti), objetiva inviabilizar o desenvolvimento do inseto levando-o
744 a morte, por septicemia (Santos *et al.* 2012, Zara *et al.* 2016). Trabalhos na área citam que além
745 desta, outras bactérias como a *Wolbachia* e alguns fungos entomopatogênicos, apresentam
746 potencial capacidade de controle para este inseto (Baptiste & Thomé 2017, Cravo *et al.* 2021).
747 Entretanto, uma grande questão enfrentada no manuseio do Bti é a sua inativação diante de altas
748 temperaturas e luz intensa, características correlatas de países tropicais (Valle *et al.* 2015)

749 Em relação ao manejo de substâncias químicas para o *Ae. aegypti*, os produtos apresentam
750 modo de ação neurotóxica ou como reguladores de crescimento (Da Silva *et al.* 2020). Tanto para
751 larvas quanto para adultos, o quadro é extremamente restrito, sendo necessário seguir a lista
752 fornecida pelo Ministério da Saúde, desenvolvida com base nas recomendações da Organização
753 Mundial da Saúde (OMS) e do World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme
754 (WHOPES), programa criado na década de 60 e utilizado como referência para o manejo de
755 substâncias químicas contra insetos de relevância para saúde pública (Valle *et al.* 2015). O
756 Temephos e o malathion são exemplos de inseticidas organofosforados utilizados em regiões
757 epidêmicas, cuja ação foca na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, em colina e ácido
758 acético, desencadeando processos hiperexcitatórios, posteriormente fadiga e morte do inseto
759 (Braga & Valle 2007, De Almeida *et al.* 2021).

760 No entanto, embora o manuseio de produtos biológicos e/ou sintéticos ofereçam resultados
761 em curto prazo, do ponto de vista socioambiental representam uma grande ameaça, uma vez que

762 os riscos assumidos podem envolver instabilidade de moléculas, resistência de populações,
763 contaminação e toxicidade a organismos não alvos, tornando essencial a reaplicação periódica
764 para que haja efeitos (Da Silva *et al.* 2020). Assim sendo, estudos que objetivem buscar
765 alternativas também eficientes, porém ecologicamente menos danosas, tem sido o alvo de muitos
766 cientistas que além da mortalidade dos insetos, buscam compreender os efeitos fisiológicos em
767 longo prazo de algumas substâncias bioativas (Navarro *et al.* 2013, Fonseca *et al.* 2019).

768 Sob tal perspectiva, a utilização de óleos essenciais e seus constituintes têm demonstrado
769 potencial promissor sob culicídeos e ganhado notoriedade entre a comunidade científica (Da Silva
770 *et al.* 2017, Pereira *et al.* 2021, Santos *et al.* 2022). Estes compostos bioquímicos naturais
771 possuem uma complexa composição de princípios ativos– imprescindível para o retardo da
772 suscetibilidade e resistência de populações–, são voláteis, biodegradáveis e atóxicos a mamíferos
773 (Pavela 2015, Rodrigues *et al.* 2017). Huang *et al.* (2019), constataram em seus estudos que o
774 óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) coletado em diferentes regiões da
775 China, apresentaram atividade larvicida para o vetor em questão, assim como constatado por
776 Santos *et al.* (2020) em experimentos realizados no Brasil. Algumas espécies do gênero Citrus,
777 Piper e Menta também já tiveram atividade larvicida comprovada para o *Ae. aegypti* (Kumar *et al.*
778 2011, Voris *et al.* 2017, Spletzer *et al.* 2021, Sousa *et al.* 2023).

779 Além disso, os efeitos subletais destes compostos sob a aquisição de nutrientes e
780 reprodução já são documentados para algumas espécies, inclusive para o vetor da dengue e,
781 corroboram para sua eficácia no controle de pragas. Valotto *et al.* (2010), observaram que larvas
782 de L3 de *Ae. aegypti* tratadas com o tanino catéquico de *Magonia pubescens* (Sapindaceae), após
783 seis horas, resultou na extrusão do tubo digestivo e as análises histológicas do intestino médio
784 demonstraram uma alta destruição celular, com formação de vacúolos e desprendimento do
785 epitélio.

786 Entretanto, apesar dos avanços, é notório que a grande maioria das pesquisas com o *Ae.*
787 *Aegypti* se restringem apenas a estudar a toxicidade destas moléculas, contudo, compreender a
788 fisiologia do animal diante de tais substâncias é imprescindível para um manejo adequado. Assim
789 sendo, a presente pesquisa focou em realizar um levantamento bibliográfico a respeito das
790 possíveis alterações fisiológicas ocasionadas por essas substâncias sob este vetor.

791

792

Material e Métodos

793 Uma revisão bibliográfica integrativa foi realizada utilizando a base de dados do Google
794 Acadêmico, Scielo, Cogna Educação e Arca Fiocruz. Os descritores selecionados para pesquisa
795 foram *Ae. aegypti*, larvicidas, entomologia, controle químico, controle biológico, xenobióticos,
796 fisiologia, histologia e óleos essenciais. Para delimitar a pesquisa restringimos a busca
797 selecionando artigos dos últimos 15 anos, nos idiomas inglês e português. Foram encontrados 25
798 artigos que abordam especificamente sobre o uso de inseticidas químicos, biológicos e óleos
799 essenciais para o controle do *Ae. aegypti*, 14 foram selecionados para a leitura. Os critérios de
800 exclusão utilizados foram artigos que não sejam de livre acesso e relatos de caso.

801

802

Discussão

803 A atividade inseticida de um óleo essencial está intimamente associada à sua vasta
804 composição química, fator capacitante para o seu desempenho sobre todas as fases de
805 desenvolvimento do inseto (Silva & Martins 2022). Os modos de ação destas substâncias –
806 fumigação, contato e ingestão – trazem perturbações à homeostase do organismo da espécie,
807 interferindo na transmissão das sinapses nervosas, no processo de muda, podendo levar a uma
808 redução do peso, retardo no desenvolvimento larval e pupal e, posteriormente morte. Silva *et al.*
809 (2023) após extração de produtos naturais das folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), registraram

810 que um dos componentes majoritários, o selina-1,3,7(11)-trien-8-ona epóxido, quando testado
811 isoladamente apresentou uma notável atividade de dissuasão contra a oviposição de adultos de *Ae.*
812 *aegypti*. Já no estudo realizado por Orlanda & Mouchrek (2021), ao verificarem a composição
813 química e atividade toxicológica do óleo essencial de arruda, *Ruta graveolens* (Rutaceae)
814 Linnaeu, o efeito larvicida foi atribuído ao sinergismo dos compostos majoritários metilcetonas.
815 Albuquerque *et al.* (2022) após determinação do perfil cromatográfico do óleo essencial de folhas
816 da espécie *Piper corcovadensis* Miq. (Piperaceae), identificaram como sendo seus principais
817 componentes o terpinoleno, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, transcariofileno e β -germacreno-
818 D-4-ol, o qual ao ser avaliado isoladamente, também demonstrou ação larvicida e sobre a
819 oviposição do mosquito *Ae. aegypti*.

820 Além disso, por seu efeito toxicológico e repelente influenciar na aquisição de nutrientes,
821 o tratamento destes culicídeos com óleos essenciais, podem ainda desencadear alterações no
822 desenvolvimento reprodutivo, espermatogênese e oogênese, da espécie (Cruz *et al.* 2017).
823 Oliveira *et al.* (2021) ao investigarem a ação do R-limoneno, em concentração subletal, em larvas
824 de *Ae. aegypti*, notaram que além dos danos estruturais as células do intestino médio, houve
825 alterações nos níveis de carboidratos e proteínas do tecido em questão. De acordo com Parra
826 (1999), a elevação no teor de hidratos de carbono, é responsável por conferir uma maior
827 longevidade nos insetos, enquanto a sua redução pode acelerar o processo de morte. Estes
828 macronutrientes são essenciais para o desenvolvimento estrutural e reprodução: atuam como
829 principal fonte energética, participam da formação de quitina, de estruturas reprodutivas e do
830 processo pré-vitelogênico, na síntese de aminoácidos e, havendo necessidade, podem ainda ser
831 convertidos em lípidios. Em relação às proteínas, estão envolvidas em diversas ações metabólicas
832 estruturais e enzimáticas, como no transporte e reconhecimento de substâncias ou na maturação e
833 nutrição dos ovos por meio da vitelogenina (Cruz *et al.* 2017, Basílio *et al.* 2019).

834 Já as substâncias provenientes da indústria química utilizadas para o controle do *Ae.*
835 *Aegypti*, classificadas em organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos, tenham
836 como foco o sistema nervoso central do inseto, alguns efeitos subletais em nível do intestino
837 médio e reprodução também já são relatados por pesquisadores, como Borges *et al.* (2012) que
838 constataram alterações estruturais nas células do mesêntero e um retardo no processo de ecdise de
839 larvas do vetor da dengue após exposição, durante 24 horas, ao regulador de crescimento
840 diflubenzuron. No entanto, são imensuráveis as problemáticas advindas com o uso recorrente de
841 tais táticas de controle, além disso, relato na literatura cada vez mais frequente aponta para o
842 surgimento de genes resistentes neste mosquito vetor de arbovírus. Aguirre-Obando *et al.* (2016) e
843 Chiele *et al.* (2023), verificaram em seus estudos mutações do tipo knockdown, ou seja, nos genes
844 que codificam o canal de sódio, nos insetos coletados na cidade de Foz do Iguaçu.

845 Considerado uma barreira físico-química contra agentes patogênicos possivelmente
846 ingeridos durante a alimentação, o sistema digestivo dos insetos é uma área chave para a
847 compreensão dos mecanismos de ação moléculas de xenobióticas (Chapman 2013). Subdividido
848 em três regiões: anterior, média e posterior, a porção mediana, constituída por um epitélio de
849 células colunares (enterócitos), células regenerativas ou células tronco e células enteroendócrinas,
850 exerce impacto considerável na absorção de nutrientes – o que pode refletir diretamente sobre a
851 capacidade vetorial dos insetos –, e na síntese e secreção de enzimas e hormônios que irão auxiliar
852 durante o processo digestivo (Gullan & Cranston 2012, Vantaux *et al.* 2016). Apresentando em
853 seu interior a matriz peritrófica, responsável por separar o bolo alimentar do epitélio e por
854 permitir a comunicação com o meio externo, em insetos hematófagos, esta estrutura ainda está
855 relacionada à proteção contra moléculas citotóxicas, resultado da digestão de hemoglobina no
856 lúmen intestinal (Okuda *et al.* 2007). Diante de todo este processo intricado e considerando a
857 intrínseca relação entre um inseto bem nutrido e um bom desenvolvimento, distúrbios nutricionais

858 e/ou complicações a estas estruturas podem afetar o seu ciclo de vida, bem como, suas atividades
859 fisiológicas, dependentes da absorção e transformação adequada do alimento (Mordue *et al.*
860 2010).

861 Fernandes *et al.* (2019) verificaram que ao submeter larvas de dengue ao tratamento com o
862 bioinseticida spinosad, houve um aumento de 20 vezes na quantidade de células peroxidases-
863 positivas, que podem ter sido responsáveis por induzir processos apoptóticos nos enterócitos e
864 inibir a proliferação celular, ademais também foi observada uma redução da fecundidade.
865 Resultado de um sinal de perturbação, o desequilíbrio na produção de radicais livres induz a
866 danos nos lipídios celulares, proteínas e DNA que podem levar a sua inibição e/ou inutilização,
867 reduzem a aptidão individual e sobrevivência (Silva & Mascarenhas 2021). Desta forma, a
868 liberação de enzimas antioxidantes, como as peroxidases, por células endócrinas, é de suma
869 importância para preservação da funcionalidade destas moléculas no organismo (Fernandes *et al.*
870 2019). Em relação a apoptose, mecanismo muito observado em organismos pluricelulares e
871 estimulado em decorrência de condições atípicas, células desnecessárias, danificadas ou
872 potencialmente perigosas são eliminadas durante o desenvolvimento e reorganização tecidual
873 (Ashe & Berry 2003, Huang *et al.* 2013, Shu *et al.* 2018). Contudo, nos insetos esta circunstância
874 também pode ser notada durante a metamorfose ou com a involução natural de algum órgão na
875 fase adulta (Gregor *et al.* 2004).

876 Correlacionada ainda com o processo de regeneração tecidual, as células endócrinas nesta
877 estrutura, liberam compostos que desencadeiam a proliferação e diferenciação das células
878 regenerativas, cujo objetivo é evitar o colapso da função do órgão (Amcheslavsky *et al.* 2014,
879 Ameku *et al.* 2018). O processo de regeneração é um indicativo de que o dano é transitório e
880 possivelmente reversível, porém, situações graves, acompanhadas de uma não reparação celular
881 e/ou a presença de vacúolos podem corresponder a um dano permanente e a morte do organismo

882 (Miller & Zachary 2017). Valotto *et al.* (2014) após exposição de larvas de *Ae. aegypti* ao ácido
883 3- β -acetoxylabdan-8(17)-13-dien-15-oico, extraído da planta medicinal *Copaifera reticulata*
884 Ducke (Leguminosae), relataram a vacuolização citoplasmática do intestino médio, hipertrofia
885 celular e nuclear, degeneração dos microvilos, formação de vesículas apical com extrusão do
886 conteúdo citoplasmático, estratificação do epitélio, dobras na membrana peritrófica e,
887 conseqüentemente, morte do inseto.

888 Além de todos os efeitos citotóxicos relatados anteriormente, um estudo publicado por
889 Silva *et al.* (2016) revelou ainda que o óleo de *P. corcovadensis* e seus constituintes, terpinoleno e
890 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, foram capazes de interferir na atividade das proteases
891 intestinais de larvas de *Ae. aegypti*. As proteases são enzimas responsáveis por catalisar a
892 hidrólise de proteínas, fragmentando-as em aminoácidos menores para facilitar o processo de
893 nutrição (Pontual *et al.* 2012). Neste sentido, mecanismos de controle que interfiram no
894 funcionamento adequado destas biomoléculas podem prejudicar a nutrição do inseto,
895 desencadeando uma morte por inanição (Paiva *et al.* 2012).

896 Levando em consideração todos os aspectos abordados, é perceptível que o caminhar a
897 respeito da compreensão da atividade de biomoléculas sobre parâmetros fisiológicos do *Ae.*
898 *aegypti* tem muito a crescer, visto a necessidade, do ponto de vista socioambiental, na renovação
899 das medidas de controle atualmente empregadas. Além disso, levando em consideração a estrita
900 relação entre nutrição e desenvolvimento biológico, táticas que afetem diretamente na aquisição e
901 transformação dos nutrientes podem ser a chave para o rompimento do sucesso reprodutivo da
902 espécie na sociedade.

903

904

905

Conclusão

906

907

908

909

910

911

912

913

914

Agradecimentos

915

916

917

918

Literatura Citada

919

920

921

922

Aguirre-Obando, O.A., A.J. Pietrobon, A.C.D. Bona & M.A. Navarro-Silva. 2016. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. *Revista Brasileira de Entomologia*, 60: 94-100.

923

924

925

926

927

Albuquerque, B.N.L., M.F.R. Silva, P.C.B. Silva, C.S.D.L. Pimentel, S.K.L. Rocha, J.C.R.O.F. Aguiar, A.C. Agra-Neto, P.M.G. Paiva, M.G.M. Gomes, E.F. Silva-Júnior & D.M.A.F. Navarro. 2022. Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of β -germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*. *Industrial Crops and Products*, 182: 114830.

928

929

930

Amcheslavsky, A., W. Song, Q. Li, Y. Nie, I. Bragatto, D. Ferrandon, N. Perrimon & Y.T. Ip. 2014. Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell reports*, 9: 32-39.

- 931 **Ameku, T., Y. Yoshinari, M. J. Texada, S. Kondo, K. Amezawa, G. Ypshizaki & Y.R. Niwa.**
 932 **2018.** Midgut-derived neuropeptide F controls germline stem cell proliferation in a mating-
 933 dependent manner. *PLoS Biol.*, 16: e2005004.
- 934 **Ashe, P.C. & M.D. Berry. 2003.** Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-*
 935 *Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27: 199-214.
- 936 **Baptista, G.M. & R.C.A. Thomé. 2017.** O uso da *Wolbachia* como agente de controle biológico
 937 no *Aedes aegypti*. *Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied*
 938 *Mathematics*, 5: 0100491-0100492.
- 939 **Barbosa, D.R.S. & M.O. Breda. 2017.** Effect of trans-anethole, limonene and your combination
 940 in nutritional componentes and their reflection on reproductive parameters and testicular
 941 apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Biol. Interact.*, 263:
 942 74-80.
- 943 **Basílio, M.C., B.T. Martins & M.A. Silva. 2019.** Nutrição aplicada e alimentação saudável.
 944 Editora Senac São Paulo, 360p.
- 945 **Borges, R.A., W. Arruda, E.S.F.D. Oliveira, G.M. Cavasin, H.H.G.D Silva & I.G.D. Silva**
 946 **2012.** Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados
 947 pelas alterações ultraestruturais. *Revista de Patologia Tropical*, 41: 222-232.
- 948 **Braga, I.A. & D. Valle. 2007.** *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.
 949 *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16: 279-293
- 950 **Chapman, R.F. 2013.** The insects: structures and function. Cambridge, Cambridge University
 951 Press, 929p.
- 952 **Chiele, A.H., I.N.A. Florentino, R.G. Schulz, E.F. Figueiredo, C.S. Librelotto & J. Colacite.**
 953 **2023.** Estudo da variabilidade genética e análise de possíveis mutações kdr no gene
 954 codificador dos canais de sódio relacionados à resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas.
 955 *Research, Society and Development*, 12: e11312340474-e11312340474.
- 956 **Cravo, F.P., A.R. Paula, J.H.M. Crizostomo & R.I. Samuels. 2021.** Redução da população de
 957 *Aedes aegypti* em residências com armadilhas de fungo entomopatogênico. *Mostra de*
 958 *Extensão IFF - UENF - UFF - UFRRJ*, v. 12.
- 959 **Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'Assunção, F.M. Cunha, A.A.C.**
 960 **Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, C.P. Silva, G.K.D. Sakamoto, M.P. Pontes, R.R.**
 961 **Vieira, J.P.S. Natal & H. Conte. 2020.** Os riscos ambientais no Brasil devido ao uso do
 962 defensivo Malathion Emulsão Aquosa-EA 44% no controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus,
 963 1762) (Díptera: Culicidae): uma revisão. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*,
 964 11: 638-646.
- 965 **Silva, T.I., A.C.L Alves, F.R. Azevedo, C.A. Marco, H.R. Santos & W.S. Alves. 2017.** Efeito
 966 larvicida de óleos essenciais de plantas medicinais sobre larvas de *Aedes aegypti* L.

- 967 (Diptera: Culicidae). Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, 12:
968 256-260.
- 969 **Almeida, W.A., I.C.V. Nova, J. Silva-Nascimento, M.C. Moura, A.C. Agra-Neto, H.N. Costa,**
970 **et al. 2021.** Effects of *Plectranthus barbatus* leaf extract on survival, digestive proteases,
971 midgut morphophysiology and gut microbiota homeostasis of *Aedes aegypti* larvae. South
972 African Journal of Botany, 141: 116-125.
- 973 **Fernandes, K.M., H.V.V. Tomé, F.R. Miranda, W.G. Gonçalves, T.V. Pascini, J.E. Serrão &**
974 **G.F. Martins. 2019.** *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with
975 damaged midgut and reduced fecundity. Chemosphere, 221: 464-470.
- 976 **Fonseca, E.O.L., M.L.G. Macoris, R.F. Santos, D.G. Morato, M.D.S.S. Isabel, N.A.**
977 **Cerqueira & A.F. Monte-Alegre. 2019.** Experimental study on the action of larvicides in
978 *Aedes aegypti* populations collected in the Brazilian municipality of Itabuna, Bahia, under
979 simulated field conditions. Epidemiol. Serv. Saúde, 28: e2017316.
- 980 **Gregorc, A., A. Pogacnik & I.D. Bowen. 2004.** Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae
981 treated with oxalic or formic acid. Apidologie, 35: 453-460.
- 982 **Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca,
983 494p.
- 984 **Huang, H.T., C.C. Lin, T.C. Kuo, S.J. Chen & R. N. Huang. 2019.** Phytochemical composition
985 and larvicidal activity of essential oils from herbal plants. Planta, 250: 59-68.
- 986 **Huang, Z., P. Shi, J. Dai & J. Du. 2018.** Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is
987 influenced by the botanical insecticide azadirachtin. Pestic. Biochem. Phys., 80: 85-93.
- 988 **Kumar, S., Wahab, N. & Warikoo, R. 2011.** Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil
989 against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. Asian Pacific Journal of Tropical
990 Biomedicine, 1: 85-88.
- 991 **Menezes, A.M.F., K.T. Almeida, A.D.S. Amorim & C.M.R. Lopes. 2021.** Perfil
992 epidemiológico da dengue no Brasil entre os anos de 2010 à 2019/Epidemiological profile
993 of dengue in Brazil between 2010 and 2019. Brazilian Journal of Health Review, 4: 13047-
994 13058.
- 995 **Miller, M. A. & Zachary, J. F. 2017.** Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation,
996 and death. Pathologic basis of veterinary disease, 2: 19-43.
- 997 **Ministério Da Saúde. 2023.** Ministério da Saúde lança campanha de combate à dengue, Zika e
998 Chikungunya. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/maio/ministerio-da-saude-lanca-campanha-de-combate-a-dengue-zika-e-chikungunya>. Acesso em: 15/06/2023.
- 1000
- 1001 **Mordue, A.J., E.D. Morgan, A.J. Nisbet, L.I. Gilbert & S.S. Gill. 2010.** Azadirachtin, a natural
1002 product in insect control. Insect control: biological and synthetic agentes, 1: 185-197.

- 1003 **Navarro, D.M.A.F., P.C.B. Silva, M.F.R. Silva, T.H. Napoleão & P.M.G. Paiva. 2013.**
 1004 Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical
 1005 constituents against *Aedes aegypti*. *The Natural Products Journal*, 3: 268-291.
- 1006 **Okuda, K., F. Almeida, R.A. Mortara, H. Krieger, O. Marinotti & A.T. Bijovsky. 2007.** Cell
 1007 death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Journal of*
 1008 *insect physiology*, 53:1307-1315.
- 1009 **Oliveira, F.M., V. Wanderley-Teixeira, G.S. Cruz, C.T. Silva, K.A. Dutra, H.N. Costa,**
 1010 **V.A.A. Braga, E.J. Silva, C.A. Guedes, T.J.S. Alves & Á.A.C. Teixeira. 2021.**
 1011 Histological, histochemical and energy disorders caused by R-limonene on *Aedes aegypti* L.
 1012 larvae (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 221: 105987.
- 1013 **Orlanda, J. F. F. & A.N. Mouchrek. 2021.** Efeito larvicida do óleo essencial das folhas de *Ruta*
 1014 *graveolens* Linnaeus no controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).
 1015 *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 10: e115101220028-e115101220028.
- 1016 **Paiva, P.M.G., E.V. Pontual, T.H. Napoleão & L.C.B.B. Coelho. 2012.** Effects of plant lectins
 1017 and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larvae.
 1018 *Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle*, 3: 37-55.
- 1019 **Parra, J.R.P. 1999.** Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Fealq,
 1020 137p.
- 1021 **Pavela, R. 2015.** Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review.
 1022 *Ind Crops Prod.*, 76: 174-187.
- 1023 **Pereira, A.P.M., T.G.T. Martins, A.P. Araújo-Neto, C.E.P. Conceição, F.O.V.A Conceição,**
 1024 **R.T. Sousa, L.S. Silveira, A.M.A.S. Carvalho, L.B.C. Soares, F.C.A. Teixeira, P.V.S.**
 1025 **Rosa & G.O. Everton. 2021.** Constituintes químicos e potencial larvicida frente *Aedes*
 1026 *aegypti* do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. *Research, Society and Development*, 10:
 1027 e9910917683-e9910917683.
- 1028 **Pontual, E.V., T.H. Napoleão, C.R.A. Dias, R.S. Bezerra, H.S. Xavier, D.M.A.F. Navarro,**
 1029 **L.C.B.B Coelho & P.M.G. Paiva. 2012.** Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval
 1030 trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Archives of Insect*
 1031 *Biochemistry and Physiology*, 79: 135-152.
- 1032 **Ribeiro, M.S., D.F. Ferreira, R.C. Azevedo, G.B.G.D. Santos & R.D.A. Medronho. 2021.**
 1033 Índices larvais de *Aedes aegypti* e incidência de dengue: um estudo ecológico no Estado do
 1034 Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de saúde publica*, 37: 1-13.
- 1035 **Santos, A.B.D.S., G.O. Everton, R.G.D.O.C. Junior, P.V.S. Rosa, A.P.M. Pereira, L.S.**
 1036 **Souza, D. Fonseca, E.C.S. Lima, C.B. Sousa, M.O. Arruda & V.E. Mouchrek-Filho.**
 1037 **2020.** Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* Blume and *Plectranthus amboinicus*
 1038 (Lour.) Spreng as larvicidas agents in front of the larvae of *Aedes aegypti*. *Brazilian Journal*
 1039 *of Development*, 6: 22355-22369.

- 1040 **Santos, A.L.S., F.P.S. Santos, A.S. Nascimento, L.K.F. Lima, L.M.F. Dias, G.T.O. Silva, M.**
 1041 **Rai & C. Mendes-Feitosa. 2022.** Chemical composition, actividad larvicide, insecticide
 1042 and repellent of essential oil *Aedes aegypti*. Research, Society and Development, 11:
 1043 e37611225711.
- 1044 **Santos, F.P., J. Lopes, G.T. Vilas-Bôas & J.A.C. Zequi. 2012.** Characterization of *Bacillus*
 1045 *thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:
 1046 Culicidae). *Acta tropica*, 122: 64-70.
- 1047 **Silva, A.C., D.M.A.F. Navarro, A.M. Marques, M.R. Figueiredo, J.C.R.O Farias, C.A.G.**
 1048 **Câmara, M.M. Moraes, F.H.G. Santos, E.F. Santos, G.J.S.G. Vieira, H.V.S. Oliveira,**
 1049 **L.A.L. Soares & M.R.A. Ferreira. 2023.** Oviposition deterrent activity of hydrolate,
 1050 aqueous extract and major constituents of essential oil from the leaves of *Eugenia uniflora*
 1051 (Myrtaceae) for the control of *Aedes aegypti*. *Industrial Crops and Products*, 198: 116710.
- 1052 **Silva, D.M.L. & V.E.P. Martins. 2022.** Óleos essenciais e extratos vegetais como ferramentas
 1053 alternativas ao controle químico de larvas de *Aedes* spp, *Anopheles* spp e *Culex* spp.
 1054 *Journal of Health & Biological Sciences*, 10: 1-15.
- 1055 **Silva, J. S. & M.A. Mascarenhas. 2021.** Antioxidantes como nutracêuticos para mitigar estresse
 1056 oxidativo em abelhas: revisão sistemática. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 27: 53-73.
- 1057 **Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S.B.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra-Neto, E.V.**
 1058 **Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva & D.M.A.F. Navarro. 2016.** Composition and
 1059 biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae).
 1060 *Exp. Parasitol.*, 1: 64-70.
- 1061 **Shu, B., J. Zhang, G. Cui, R. Sun, X. Yi & G. Zhong. 2018.** Azadirachtin affects the growth of
 1062 *Spodoptera litura* Fabricius by inducing apoptosis in larval midgut. *Frontiers in physiology*,
 1063 9: 137.
- 1064 **Sousa, D.A., P.R.B. Gomes, R.D. Souza, V.E. Mouchrek-Filho, C.N. Mouchrek, G.O.**
 1065 **Evertton, N.R. Almeida & J.P. Araújo. 2023.** Composição Química e Atividade Larvicide
 1066 de Óleos Essenciais de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle bark Contra Larvas de *Aedes*
 1067 *aegypti*. *Revista Virtual de Química*, 1: 1-7.
- 1068 **Spletozer, A.G., C.R.D. Santos, L.A. Sanches & J. Garlet. 2021.** Plantas com potencial
 1069 inseticida: enfoque em espécies amazônicas. *Ciência Florestal*, 31: 974-997.
- 1070 **Uno, N. & T.M. Ross. 2018.** Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging*
 1071 *microbes & infections*, 7: 1-11.
- 1072 **Valle, D., T.A. Belinato, A.J. Martins. 2015.** Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a
 1073 inseticidas e alternativas. *Dengue: teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1: 93-126.
- 1074 **Valotto, C.F.B., G. Carvasin, H.H.G. Silva, R. Geris & I.G.D. Silva. 2010.** Alterações morfo-
 1075 histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo

- 1076 tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). Revista de
1077 Patologia Tropical, 39: 309-321.
- 1078 **Valotto, C.F.B., G. Cvasin, H.H.G. Silva, R. Geris & I.G.D. Silva. 2014.** Atividade larvica
1079 do ácido 3- β -acetoxylabdan-8 (17)-13-dien-15-óico isolado da planta medicinal *Copaifera*
1080 *reticulata* (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) evidenciada pelas
1081 alterações morfohistológicas. Revista de Patologia Tropical, 43: 375-384.
- 1082 **Vantaux, A., Ouattarra, I., Lefèvre, T. & Dabirè, K. R. 2016.** Effects of larvicidal and larval
1083 nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for
1084 *Plasmodium falciparum*. Parasites & vectors, 9: 1-11.
- 1085 **Voris, D.G.R., C.H. Afonso, C.A. Almeida-Filho, C.O. Fernandes, D.Q. Brito, C.S. Moraes,**
1086 **et al. 2017.** Estudos etnofarmacológicos de óleos essenciais com atividade larvica contra o
1087 mosquito *Aedes aegypti*. Semioses, 11: 86-94.
- 1088 **Zara, A.L.D.S.A., S.M.D. Santos, E.S. Fernandes-Oliveira, R.G. Carvalho & G.E. Coelho.**
1089 **2016.** Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. Epidemiologia e Serviços de
1090 Saúde, 25: 391-404.
- 1091
- 1092



DECLARAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

A Atena Editora, especializada na publicação de livros, revistas internacionais e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do nosso Conselho Editorial, o artigo intitulado "PHYSIOLOGICAL IMPACTS OF THE USE OF XENOBIOTICS ON THE MOSQUITO VECTOR *Aedes aegypti* LINNAEUS (DIPTERA: CULICIDAE)", de autoria de "Maria Clara da Nobrega Ferreira, glaucilane dos santos cruz, Glaucilane dos santos cruz, Catiane Oliveira Souza, valeria wanderley teixeira, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira", foi aprovado e publicado no livro eletrônico "Avances científicos y tecnológicos en ciencias agrícolas 2", sob ISBN e DOI 10.22533/at.ed.1362317114.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pela publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Ponta Grossa, 05 de janeiro de 2024

Prof.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Doutora em ensino de ciência e tecnologia
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 97865
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

Rua Antônio Rodrigues Teixeira Júnior,122
Ponta Grossa – PR
CEP: 84.015-490
contato@atenaeditora.com.br

1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142

CAPÍTULO 3

EFEITO DE COMPOSTOS BOTÂNICOS ISOLADOS OU ASSOCIADOS SOBRE PARÂMETROS CITOTÓXICOS E IMUNOLÓGICOS EM LARVAS DE *Aedes aegypti*: UMA PESPECTIVA DE CONTROLE ¹

Maria C. N. Ferreira¹, Glaucilane S. Cruz¹, Daniela M. A. F. Navarro³, Álvaro A. C.
Teixeira², Valéria W. Teixeira²

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

³Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof.
Moraes Rego, Recife, PE, 50670-901, Brasil.

¹ Ferreira, M.C.N., G.S. CRUZ, Navarro, D.M.A.F., A.A.C. Teixeira & V.W. Teixeira. Efeito de compostos botânicos isolados ou associados sobre parâmetros citotóxicos e imunológicos em larvas de *Aedes aegypti*: Uma perspectiva de controle. A ser submetido.

1143 RESUMO- Interações entre biomoléculas e seus sítios alvo são determinantes para utilização no
1144 controle de pragas, podendo tais relações intensificarem ou inibirem seus efeitos. O entendimento
1145 mais amplo desta complexa trama perpassa parâmetros toxicológicos e assim, alterações
1146 fisiológicas podem elucidar sua rota metabólica no inseto. Pesquisa com o terpinoleno e 1-butil-
1147 3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB), demonstrou sua ação inseticida em *Aedes aegypti*. Assim,
1148 elaboraram-se as hipóteses de que sua toxicidade é correlata a danos epiteliais no intestino que
1149 refletem no sistema de defesa. Danos mais significativos e estáveis podem ocorrer frente à
1150 combinação binária. Para legitimá-las, foram analisadas as implicações citotoxicológicas
1151 (imunohistoquímica) e imunológicas (fenoloxidase, óxido nítrico e estresse oxidativo). As CL₅₀
1152 dos compostos isolados foram utilizadas conforme literatura. A curva da associação a CL₅₀
1153 mostrou-se menos tóxica. O intestino médio apresentou alterações histológicas em todos os
1154 tratamentos quando comparados ao controle, todavia sequelas mais severas como vacuolização,
1155 tumefação celular e perda da matriz peritrófica, foram expressas na associação. Quanto a
1156 apoptose, apenas os tratamentos contendo o BMDB, isolado e associado, apresentaram aumento.
1157 No PCNA, as larvas da associação apresentaram um menor índice. Para a fenoloxidase e óxido
1158 nítrico constatou-se uma redução no BMDB e a associação. No estresse oxidativo não houve
1159 diferença estatística na mensuração da glutathione, já o TBARS apresentou redução para
1160 associação. Assim, a combinação binária, apresentou os melhores resultados decorrentes de danos
1161 mais acentuados. Resaltamos que concentrações maiores, a semelhança das utilizadas em campo,
1162 ou em proporções distintas podem proporcionar efeitos mais expressivos e efetivos para o manejo
1163 deste vetor.

1164

1165 PALAVRAS – CHAVE: Dengue, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, histologia,
1166 imunohistoquímica, terpinoleno.

1167

1168

1169 EFFECT OF ISOLATED OR ASSOCIATED BOTANICAL COMPOUNDS ON CYTOTOXIC
1170 AND IMMUNE PARAMETERS IN *Aedes aegypti* LARVAE: A CONTROL PERSPECTIVE¹

1171

1172 ABSTRACT- Interactions between biomolecules and their target sites are crucial for use in pest
1173 control, and such relationships can intensify or inhibit their effects. A broader understanding of
1174 this complex plot permeates toxicological parameters and thus, physiological changes can
1175 elucidate its metabolic route in the insect. Research with terpinolene and 1-butyl-3,4-
1176 methylenedioxybenzene (BMDB) demonstrated their insecticidal action on *Aedes aegypti*. Thus,
1177 hypotheses were developed that its toxicity is correlated with epithelial damage in the intestine
1178 that affects the defense system. More significant and stable damage can occur when faced with
1179 binary combinations. To legitimize them, the cytotoxicological (immunohistochemistry) and
1180 immunological implications (phenoloxicity, nitric oxide and oxidative stress) were analyzed. The
1181 LC50 of the isolated compounds were used according to the literature. The curve of the
1182 association with LC50 proved to be less toxic. The midgut showed histological changes in all
1183 treatments when compared to the control, however more severe sequelae such as vacuolization,
1184 cell swelling and loss of the peritrophic matrix were expressed in the association. As for
1185 apoptosis, only treatments containing BMDB, isolated and associated, showed an increase. In
1186 PCNA, larvae from the association showed a lower rate. For phenoloxidase and nitric oxide, a
1187 reduction in BMDB and the association was found. In oxidative stress there was no statistical
1188 difference in the measurement of glutathione, whereas the TBARS showed a reduction in
1189 association. Thus, the binary combination presented the best results resulting from more severe
1190 damage. We emphasize that higher concentrations, similar to those used in the field, or in

1191 different proportions can provide more expressive and effective effects for the management of this
1192 vector.

1193

1194 **KEYWORDS:** Dengue, 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, histology, immunohistochemistry,
1195 terpinolene.

1196

1197

1198

1199

Introdução

1200 O colapso do equilíbrio homeostático do mosquito vetor da dengue, frente à toxicidade de
1201 compostos botânicos é uma realidade já comprovada no meio científico (Oliveira *et al.* 2013,
1202 Almeida *et al.* 2018, Bezerra *et al.* 2021). Tal resposta deve-se a interação entre essas substâncias,
1203 seja de forma sinérgica ou aditiva, com os múltiplos sítios de ação (Wu *et al.* 2021). No entanto, a
1204 grande maioria dos estudos desenvolvidos focam apenas no caráter toxicológico e isolado destas
1205 biomoléculas, sendo a citotoxicidade um ramo pouco explorado, porém imprescindível para o
1206 desenvolvimento de técnicas de controle mais assertivas e conscientes para este culicídeo (Silva *et*
1207 *al.* 2016, Pereira *et al.* 2021).

1208 Estes compostos, em decorrência do seu efeito lipofílico, penetram mais facilmente na
1209 camada cuticular do inseto, atingindo diretamente o seu sistema fisiológico e prospectando uma
1210 série de alterações a nível celular e imunológico que podem ser responsáveis por danos letais ou
1211 subletais na biologia, comportamento, desenvolvimento, reprodução, alimentação, além de
1212 promoverem efeitos de repelência e deterrência ao alvo em questão (Albuquerque *et al.* 2020,
1213 Karthi *et al.* 2020, Pereira *et al.* 2022, Costa *et al.* 2023, Machado *et al.* 2023). Segundo Isman
1214 (1997) essas respostas tornam-se ainda mais intensas quando existe uma interação entre mais de
1215 uma molécula química, além de postergarem possíveis mecanismos de resistência.

1216 Alvo da ação dessas substâncias, o intestino médio dos insetos tem sido de grande interesse
1217 para os pesquisadores (Cruz *et al.* 2017, Silva *et al.* 2019). Danos à estrutura epitelial podem
1218 decorrer de um processo de apoptose e/ou necrose impedindo a digestão e absorção de
1219 substâncias, refletindo no ciclo biológico da espécie e induzindo, posteriormente, uma série de
1220 reações em cadeia para a ativação dos mecanismos de defesa celulares como a proliferação celular

1221 que visa uma reposição tecidual evitando a falência do órgão e, conseqüentemente, do organismo
1222 (Vantaux *et al.* 2016, Silva *et al.* 2020).

1223 Nesta cascata de reações, a atividade da fenoloxidase e do óxido nítrico (NO₂) torna-se
1224 fundamental para o reconhecimento e recuperação do epitélio (Cerqueira & Yoshida 2002,
1225 Cervoni *et al.* 2017). Todavia, a produção e acúmulo de intermediários reativos de oxigênio a
1226 partir da sua atividade imunológica, reflete uma ameaça as estruturas celulares e DNA, decorrente
1227 da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e modificação de lipoproteínas (Sadekuzzaman *et*
1228 *al.* 2018).

1229 Diante do exposto e da emaranhada rede de funcionamento, é notório que substâncias que
1230 interfiram comumente em vários sítios alvos podem ser promissoras para a redução nos índices de
1231 infestação do mosquito *Aedes aegypti*, visto as reações em cadeia a nível fisiológico que podem
1232 ser propiciadas. A distribuição cosmopolita deste vetor favorecida pela intensificação dos
1233 processos globalizatórios, urbanísticos e de transporte, evidenciam a ameaça eminente que
1234 representa a saúde e a espécie humana, bem como vulnerabilidade das técnicas de manejo
1235 atualmente aplicadas (Silva *et al.* 2020, Vargas *et al.* 2022).

1236 Assim, a presente pesquisa objetivou investigar a ação de dois compostos, terpinoleno e 1-
1237 butil-3,4-metilenodioxibenzeno, isolados e associados, a nível citotóxico (análise
1238 imunohistoquímica do intestino médio) e imunológico (fenoloxidase, óxido nítrico e estresse
1239 oxidativo), visto que a sua combinação binária pode ser responsável pela intensificação dos danos
1240 celulares e imunológicos em larvas de *Ae. aegypti*, propiciando o desenvolvimento de um controle
1241 mais satisfatório para este vetor.

1242

1243

1244

Materiais e Métodos

1245 A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fisiologia de Insetos (LAFI), Laboratório de
1246 Estudos Morfológicos em Vertebrados e Invertebrados (LABEMOVI) da Universidade Federal
1247 Rural de Pernambuco (UFRPE), e no Laboratório de Ecologia Química (LEQ) e Laboratório de
1248 Fisiopatologia Renal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

1249 **Criação e manutenção da colônia de *Aedes aegypti*.** As larvas e os mosquitos utilizados no
1250 trabalho foram oriundas da colônia do *Ae. aegypti* (cepa Rockefeller) do insetário do Laboratório
1251 de Ecologia Química, do Departamento de Química Fundamental da UFPE. O insetário foi
1252 mantido à temperatura constante de 28°C, umidade relativa de 58% e fotoperiodismo de
1253 10D:14N. As larvas foram alimentadas com pellets de ração para gato Whiskas® e a água trocada
1254 em dias alternados. Na fase de pupa as bacias foram mantidas em gaiolas objetivando manter os
1255 adultos durante a emergência. Quando adultos, os mosquitos foram alimentados com solução de
1256 sacarose a 10% e as fêmeas receberam repasto sanguíneo uma vez por semana.

1257 **Obtenção dos compostos terpinoleno e 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.** O composto
1258 químico terpinoleno foi obtido da empresa Sigma Aldrich® Brasil com pureza acima de 99%. O
1259 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno foi sintetizado no Laboratório de Ecologia Química, do
1260 Departamento de Química Fundamental da UFPE, seguindo a metodologia descrita por Pimentel
1261 *et al.* (2022). Para isso, uma solução de 4-bromo-1,2-(metilenodioxi) benzeno (1,2 ml, 10 mmol)
1262 em 30 ml de tetrahidrofurano foi resfriado a -78°C e mantido nessa temperatura por 30 minutos.
1263 Uma solução de nbutil-lítio (9,5 ml, 20 mmol) foi então adicionada gota a gota. A solução foi
1264 aquecida lentamente a 28°C e agitada durante 17 horas. A reação foi interrompida usando uma
1265 solução saturada de cloreto de amônio e a mistura extraída com acetato de etilo (3 x 15 ml). A
1266 fase orgânica foi desidratada sobre Na₂SO₄ anidro e colocada em um evaporador rotativo.

1267 **Estabelecimento das concentrações letais dos compostos e sua associação.** As CL_{50} dos
1268 compostos terpinoleno e 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno utilizadas nos experimentos
1269 subsequentes foram obtidas por Silva *et al.* (2016), sendo $CL_{50} = 31,16$ ppm para o composto
1270 terpinoleno e $CL_{50} = 22,1$ ppm para o composto 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.

1271 Para estabelecer a CL_{50} resultante da associação desses compostos, foi feita uma mistura
1272 na proporção 1:1 de terpinoleno e 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, respectivamente conforme
1273 metodologia descrita por Cruz *et al.* (2017) e posteriormente utilizada a metodologia descrita por
1274 Silva *et al.* (2016), onde as diversas concentrações foram obtidas através da diluição do óleo e dos
1275 compostos em água destilada e etanol. Em seguida, vinte larvas no quarto estágio inicial (L4) do
1276 mosquito *Ae. aegypti* foram introduzidas em 20 mL de cada solução em copinhos de plástico
1277 descartáveis (50 mL), sendo 10 copos por concentração, totalizando 200 larvas/tratamento. A
1278 solução controle foi preparada a partir de água destilada e 0,7 mL de etanol num balão
1279 volumétrico de 50 mL. 24h após a instalação do experimento contabilizamos a mortalidade. As
1280 larvas foram consideradas mortas quando não responderam ao estímulo ou quando não surgiram à
1281 superfície da solução (Organização Mundial da Saúde, 2005). Os resultados foram submetidos a
1282 análise de pelo programa SAS PROC PROBIT (SAS Institute, 2002).

1283 **Bioensaio larvicida dos compostos isolados e associados.** Larvas L4 do mosquito *Ae. aegypti*
1284 (cepa Rockefeller) foram submetidas as CL_{50} dos compostos terpinoleno e 1-butil-3,4-
1285 metilenodioxibenzeno isolados e associados. Para isso, vinte imaturos foram introduzidos em 20
1286 mL de cada solução em copinhos de plástico descartáveis (50 mL), sendo 10 copos por
1287 concentração, totalizando 200 larvas/tratamento. Para o tratamento controle a solução foi
1288 preparada a partir de água destilada e 0,7 mL de etanol num balão volumétrico de 50 mL. As
1289 larvas ficaram mantidas por 24 horas nas soluções. Após estes períodos as larvas sobreviventes
1290 foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

1291 **Análise histológica do intestino médio.** Larvas L4 do controle e tratadas com a CL₅₀ dos
1292 compostos e sua associação foram analisadas histologicamente 24h após a instalação do
1293 experimento e para isso, fixadas em formol 10% por 24 horas e conservados em álcool 70%. Em
1294 seguida foram desidratadas em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 10 minutos
1295 cada, embebidos em álcool+historesina (1:1) por 24 horas e incluídos em historesina pura
1296 (Leica®). Cortes com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica® RM 2035. Os cortes
1297 foram submetidos às técnicas de coloração pelo Azul de Toluidina para análise morfológica.

1298 **Análise imunohistoquímica do intestino médio.** As larvas de *Ae. aegypti* foram fixadas em
1299 formol tamponado a 10% por 24h e conservadas em álcool 70%. Os imaturos foram desidratados
1300 em banhos crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%), por 30 minutos cada, diafanizados em
1301 xilol, impregnados e incluídos em parafina. Secções de cortes de 4 µm de espessura foram obtidos
1302 em micrótomo Leica® RM 2035. Posteriormente os cortes foram desparafinados e hidratados e
1303 submetidos às análises imunohistoquímicas pelo ensaio TUNEL e proliferação celular.

1304 **Índice apoptótico no intestino médio.** Foi utilizado o método TUNEL como indicador de
1305 apoptose. Realizamos 10 repetições/tratamento. Após a hidratação as lâminas foram incubadas em
1306 Tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4 e 0,2 M) à temperatura ambiente. Para a recuperação
1307 antigênica utilizamos a Proteinase K (20 mg/mL). As lâminas foram lavadas em água destilada e
1308 incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% à temperatura ambiente. Os cortes lavados em PBS e
1309 incubados em Equilibration Buffer por 1 hora a 4 °C. Depois, os cortes foram incubados com a
1310 enzima TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Após esse período aplicado a solução stop em
1311 temperatura ambiente e, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBtS e incubadas em anti-
1312 digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato
1313 cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), sendo contracorados com
1314 hematoxilina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz OLYMPUS BX-49 e

1315 fotografadas em fotomicroscópio Leica[®] DM 500 e OLYMPUS BX-51. As imagens foram
1316 digitalizadas pelo software LAS Leica Image. O índice apoptótico foi determinado pela contagem
1317 dos núcleos positivos, calculado a partir do quociente do número de núcleos positivos pelo
1318 número de núcleos totais (positivo e negativo) e o valor final mutiplicado por 100 (Scudeler *et al.*
1319 2016). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade e as médias
1320 comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa SAS (SAS Institute, 2002).

1321 **Proliferação celular no intestino médio.** Para isso foi utilizado o método PCNA (Antígeno
1322 Nuclear de Proliferação Celular). Realizamos 10 repetições/tratamento. Após a hidratação as
1323 lâminas passaram pela recuperação antigênica com Tampão Citrato (pH 6,0) em forno micro-
1324 ondas por cinco minutos. Depois desse passo, quando alcançada a temperatura ambiente as
1325 lâminas foram lavadas em Tris base. Para inibição da Peroxidase endógena as lâminas foram
1326 incubadas em peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos, em seguida lavadas em Tris base e
1327 mantidas por 30 minutos em Tris BSA a 5%. A incubação em anticorpo específico primário
1328 (PCNA) foi realizada em câmara úmida por 18 horas. Em seguida, mantidos em anticorpo
1329 secundário, Histofine[®] por 30 minutos. As lâminas foram enxaguadas em Tris base e os cortes
1330 revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomationTM), sendo
1331 contracorados com hematoxilina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz
1332 OLYMPUS BX-49 e fotografadas em fotomicroscópio Leica[®] DM 500 e OLYMPUS BX-51. As
1333 imagens foram digitalizadas pelo software LAS Leica Image. O índice de proliferação foi
1334 determinado e o resultado submetido ao teste de normalidade e homogeneidade e as médias
1335 comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa SAS (SAS Institute, 2002).

1336 **Preparação do material para análise dos parâmetros imunológicos.** 50 larvas foram
1337 maceradas em 500µL de tampão fosfato 0,1 mM pH 7,4 em um cadinho com auxílio de pistilo de
1338 porcelana. O macerado foi alocado em um tubo para centrífuga de 2 mL e centrifugado durante 1

1339 min a 1000 rpm, para retirada de fragmentos de exoesqueleto dos insetos. O sobrenadante foi
1340 transferido para outro tubo de 2 mL e mantidos refrigerados a -20 °C até a análise. Cada
1341 tratamento constou de 10 repetições no intervalo de 24 h após aplicação.

1342 **Atividade da Fenoloxidase.** Foi realizada a análise de cada tratamento com 10 µL do macerado,
1343 após 24 h de aplicação. Cada tratamento constou de dez repetições, sendo consideradas 50 larvas
1344 uma repetição, totalizando 500 indivíduos por grupo avaliado. Duplicatas de 50 µL desta mistura
1345 foram transferidas para a placa de microtitulação. Foi adicionado em cada poço 50 µL de L-
1346 DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4 g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a ativação da
1347 enzima. Absorbância foi feita na leitora de microplaca Biochrom Anthos 2010 (São Paulo, Brasil)
1348 a 492 nm com o programa ADAP em modo fotometria cinética, onde atividade da enzima foi
1349 tomada durante a fase linear da reação em intervalos de 60 s durante 20 minutos, segundo Faraldo
1350 *et al.* (2005). Os dados foram submetidos à ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de
1351 Tukey, utilizando o programa SAS (SAS Institute, 2002).

1352 **Dosagem de Óxido Nítrico.** Foi utilizado o reagente de Griess (Green *et al.* 1981), avaliado pela
1353 concentração do íon nitrito (NO₂⁻). Em um pool de 50 µL do macerado foi acrescido 70 µL de
1354 sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H₃PO₄) (5%). Após incubação, em 50 µL da amostra
1355 (macerado/sulfanilamida) foi adicionado mais 50 µL de NEED (dihidroclorito de
1356 naftiletilenoamina) a 0,1 % em placa de microtitulação (Faraldo *et al.* 2005). A leitura da
1357 absorbância foi realizada a 562 nm na leitora de microplaca Biochrom Anthos 2010 (São Paulo,
1358 Brasil) com o programa ADAP em modo endpoint. Os dados foram submetidos à ANOVA, e as
1359 médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software SAS Institute.

1360 **Análise do estresse oxidativo.** Para o estresse oxidativo, foi avaliada a peroxidação lipídica
1361 realizada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês
1362 thiobarbituric acid reactive substances), de acordo com Ohkawa *et al.* (1979). Cinquenta larvas de

1363 cada tratamento homogeneizadas em KCl 1,15% + EDTA 3 mM em banho de gelo, foi
1364 considerada 1 repetição e realizadas 10 repetições/tratamento. Posteriormente, adicionamos um
1365 meio de reação contendo 0,3% de ácido tiobarbitúrico, 0,4% de SDS e 7,5% de ácido acético (pH
1366 3,5), e subsequentemente a mistura foi aquecida a 95° C por uma hora. As amostras foram
1367 centrifugadas e o sobrenadante teve a absorbância mensurada em comprimento de onda de 535
1368 nm. Os dados obtidos foram corrigidos pela concentração de proteína do homogenato, mensurada
1369 de acordo com Lowry *et al.* (1951). Os níveis da glutathiona (GSH) reduzida foram determinados
1370 através da mensuração de grupamentos sulfidrilas não proteicos, de acordo com metodologia de
1371 Sedlak & Lindsay (1968). A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica,
1372 80 a 160 mg do tecido foram precipitados em solução de TCA 5%. Em seguida, um volume do
1373 sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS 4mM, EDTA 4mM e
1374 DTNB 4mM a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e a
1375 absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do
1376 homogenato. As análises foram feitas com 24 após a instalação do experimento. Os dados foram
1377 submetidos à ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o programa SAS
1378 (SAS Institute, 2002).

1379

1380

Resultados

1381 **Estabelecimento das concentrações letais dos compostos e sua associação.** O teste de
1382 toxicidade para associação (Terpinoleno + BMDB) nos revelou um valor para a CL₅₀ de 75,69
1383 ±2,37 ppm (Tabela 1).

1384 **Análise histológica do intestino médio.** As larvas provenientes do tratamento controle
1385 apresentaram intestino médio com uma camada simples de epitélio, sendo possível observar dois
1386 tipos celulares: as células digestivas ou colunares e as células regenerativas. As células colunares

1387 apresentam núcleo esférico e central, com especializações do tipo microvilos na região apical. As
1388 células regenerativas encontram-se na base do epitélio, com formato piramidal e formando
1389 ninhos. Acima dos microvilos foi possível identificar a presença de matriz peritrófica, separando o
1390 conteúdo alimentar presente no lúmen do epitélio (Figura 1A e B).

1391 No intestino médio do grupo tratado com terpinoleno, assim como no controle foi
1392 identificado a presença de epitélio simples colunar. No entanto, este estava desorganizado e
1393 vaculizado. Além disso, não foi possível observar a presença da matriz peritrófica (Figura 1C e
1394 D).

1395 Já nos insetos tratados com o composto 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, a matriz
1396 peritrófica e os microvilos mostraram-se conservados. No entanto, assim como no terpinoleno o
1397 epitélio também se mostrou desorganizado e com a presença de vacuolização, além de células
1398 com aspecto de tumefação. Também foi possível identificar ninhos de células regenerativas
1399 (Figura 1E e F).

1400 A histologia da porção mediana do intestino do grupo associado (terpinoleno + BMDB)
1401 assim como nos insetos tratados individualmente com cada composto, apresentou epitélio colunar
1402 desorganizado com características de tumefação celular, assim como a presença de vacúolos e
1403 ninhos de células regenerativas. A matriz peritrófica não foi identificada (Figura 1G e H).

1404 **Índice apoptótico no intestino médio.** A presença de núcleos apoptóticos foi observado em
1405 todos os tratamentos. Resultados significativos foram expressos pelos grupos 1-butil-3,4-
1406 metilenodioxibenzeno ($2,66 \pm 0,66$) e associação (Terpinoleno + BMDB) ($3,33 \pm 0,33$) em
1407 relação ao controle ($0,5 \pm 0,54$). O terpinoleno ($1,67 \pm 0,33$), no entanto, não diferiu em relação ao
1408 controle ($P < 0,0001$; $F = 44,73$) (Figura 2).

1409 **Proliferação celular no intestino médio.** As células epiteliais demonstraram a ativação dos
1410 mecanismos de regeneração por meio do processo de proliferação celular nas larvas submetidas

1411 aos compostos. Todos os tratamentos diferiram do controle. Constatou-se um aumento nos
1412 marcadores de PCNA das larvas tratadas com o terpinoleno ($1,33 \pm 0,12$) e com o 1-butil-3,4-
1413 metilenodioxibenzeno ($1,40 \pm 0,15$), em relação ao controle. Para a associação (Terpinoleno +
1414 BMDB), observou-se uma redução em relação ao controle ($0,50 \pm 0,11$) ($P < 0,0001$; $F = 65,67$)
1415 (Figura 3).

1416 **Atividade da fenoloxidase.** Quando comparado ao controle, observamos a redução na atividade
1417 enzimática da fenoloxidase do tratamento associado (Terpinoleno + BMDB) ($1,0264 \pm 0,061$
1418 OD/min/mg) após 24 horas de exposição. Todavia, não constatamos diferença em relação ao
1419 controle dos compostos isolados, terpinoleno ($1,077 \pm 0,270$ OD/min/mg) e 1-butil-3,4-
1420 metilenodioxibenzeno ($1,174 \pm 0,071$ OD/min/mg) ($P < 0,0218$; $F = 3,63$) (Figura 4).

1421 **Dosagem de óxido nítrico.** Houve redução na dosagem de óxido nítrico do tratamento isolado
1422 com 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno ($0,983 \pm 0,052$ $\mu\text{M/ml}$) e deste associado ao terpinoleno
1423 ($0,878 \pm 0,034$ $\mu\text{M/ml}$) em relação ao controle ($1,258 \pm 0,073$ $\mu\text{M/ml}$). Contudo, não houve
1424 diferença significativa do terpinoleno ($1,042 \pm 0,069$ $\mu\text{M/ml}$) em relação aos demais tratamentos
1425 ($P < 0,0006$, $F = 7,37$) (Figura 5).

1426 **Análise do estresse oxidativo.** Não houve diferenças nos níveis da mensuração da Glutathione-S-
1427 Transferase (GSH) ($P < 0,0482$; $F = 3,05$) (Figura 6). A redução do estresse oxidativo, quantificado
1428 pelo TBARS, indicando a peroxidação lipídica nas amostras de larvas tratadas após 24 horas de
1429 incubação com os compostos associados ($2,497 \pm 0,184$ nmol de MDA/mg/proteína) foi
1430 observada em relação ao controle ($3,401 \pm 0,327$ nmol de MDA/mg/proteína) e ao 1-butil-3,4-
1431 metilenodioxibenzeno isolado ($3,538 \pm 0,109$ nmol de MDA/mg/proteína). O tratamento com
1432 terpinoleno ($3,066 \pm 0,206$ nmol de MDA/mg/proteína) não diferiu do controle e dos demais
1433 grupos ($P < 0,0105$; $F = 4,66$) (Figura 7).

1434

Discussão

1435
1436 A diferença na toxicidade dos resultados pode estar correlacionada à constituição química
1437 de cada composto. Por ser um fenilpropanóide, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMDB),
1438 apresenta maior atividade larvicida para o *Ae. aegypti* que terpenóides, como o terpinoleno
1439 (monoterpeno), necessitando assim de menores concentrações para um resultado toxicológico
1440 mais satisfatório (Morais *et al.* 2007). Quando associados, os compostos necessitaram de
1441 concentrações mais altas para atingir uma mortalidade efetiva, este fato deve-se provavelmente a
1442 uma possível ação antagônica entre a mistura (Lima *et al.* 2019), contudo apesar disso as
1443 respostas celulares e imunológicas foram mais acentuadas para os insetos deste tratamento,
1444 evidenciando o caráter nocivo e citotóxico que estas biomoléculas, quando associadas,
1445 desempenharam sob o vetor.

1446 Sob condições normais, o intestino médio dos insetos funciona como uma barreira
1447 imunológica estrutural de suma importância contra agentes infecciosos e xenobióticos, devido a
1448 presença da matriz peritrofica (Schmid-Hempel 2005, Gullan & Cranston 2012). No entanto, com
1449 relação ao *Ae. aegypti*, a infecção viral sistêmica bem sucedida e disseminação destes agentes
1450 virulentos, é condicionada ao sucesso da entrada e proliferação destes arbovírus no epitélio
1451 intestinal (Ayers *et al.* 2021). Sendo assim, danos intensos a sua estrutura além de estarem
1452 diretamente associados a efeitos subletais, podendo ser proporcionais ao aumento da presença de
1453 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Nitrogênio (ERN) no meio intracelular, resultantes da
1454 carência no desempenho de outras barreiras imunitárias, podem ainda contribuir para o
1455 impedimento na transmissão destas doenças ao ser homem (Jabłońska-trypuć 2017, Ali *et al.* 2018,
1456 Ayers *et al.* 2021).

1457 Segundo Anazetti & Melo (2007), o padrão de alterações morfológicas e bioquímicas
1458 celulares associadas com a programação de morte celular inclui, entre outras características, o

1459 aumento de vacúolos citoplasmáticos. Em contrapartida a tumefação celular está correlacionada
1460 ao processo de necrose e ocorre devido ao aumento de Na⁺ citosólico. O aumento do Ca²⁺
1461 citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de
1462 espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem à ruptura da membrana plasmática, ativação de
1463 proteases com consequente indução do extravasamento do conteúdo celular.

1464 Em circunstâncias naturais, a renovação tecidual proveniente de apoptose ou necrose, é
1465 um mecanismo celular fundamental para o desenvolvimento e que está intimamente
1466 correlacionada com a ação das células regenerativas (Caccia *et al.* 2019). Controlada pela via de
1467 sinalização celular Notch e ativada mediante uma série de cascatas proteolíticas, em condições
1468 adversas a atividade deste grupo celular é indicativo de dano possivelmente transitório e passível
1469 de regeneração (Miller & Zachary 2017). Na presente pesquisa, os marcadores positivos para
1470 proliferação, denotam uma tentativa de recuperação ao epitélio lesado. No entanto, a redução ou
1471 ausência desta resposta, com observado nas larvas provenientes do tratamento associado, indicam
1472 sequelas permanentes ao tecido, podendo afetar o desenvolvimento ou levar a morte do inseto
1473 (Miranda *et al.* 2022).

1474 O acúmulo das EROs no sistema pode induzir o estresse oxidativo, colocando em risco as
1475 estruturas fundamentais das células e tecidos, uma vez que resultam na perda ou incapacidade de
1476 suas funções, por meio da indução na expressão de genes apoptóticos (Velki *et al.* 2011, Nishida
1477 2011, Camini *et al.* 2017). Terpenos e fenilpropanoides são antioxidantes naturais, inibindo a
1478 peroxidação lipídica por meio da interrupção da cadeia de peroxidação, gerando um
1479 hidroperóxido e um radical livre ou pelo tamponamento direto de radicais livres através da doação
1480 de elétrons de suas hidroxilas, respectivamente (Korkina *et al.* 2011, Yu *et al.* 2017, Cunha *et al.*
1481 2018). Este fato pode explicar a ausência do aumento do estresse oxidativo em todos os
1482 tratamentos.

1483 Lesões celulares na organização do intestino médio podem ainda ativar reações
1484 imunológicas químicas e enzimáticas em cadeia, além de refletirem negativamente em outros
1485 sistemas fisiológicos dependentes da transformação adequada do alimento, como é o caso da
1486 reprodução (Cruz *et al.* 2017). Desta forma, objetivando o impedimento do colapso homeostático,
1487 o reconhecimento e atividade contra agentes invasores pode ser mediado pela ação da
1488 fenoloxidase, óxido nítrico (NO₂) e glutathiona (GSH) (Silva *et al.* 2019).

1489 A redução nos níveis de fenoloxidase nas larvas tratadas com a associação e do óxido
1490 nítrico verificado com o BMDB e associação evidencia o infortúnio propiciado ao sistema imune
1491 do culicídeo. Solidificando tais resultados, Wu *et al.* (2021) constataram padrões semelhantes em
1492 seus níveis após exposição de *Ae. aegypti* a 2-tiofenilcumarina. A fenoloxidase atua no
1493 reconhecimento e combate de moléculas xenobióticas por meio da melanogênese (Sotoyo &
1494 Aguilar 2012). Por outro lado, o óxido nítrico exerce considerável impacto para a imunidade
1495 inespecífica, por meio da modulação de reações antiinflamatórias, paradoxalmente, – a depender
1496 do tipo celular e estímulo que receba – este corpúsculo também pode se tornar citotóxico e
1497 vasodilatador ao próprio organismo (Barbosa *et al.* 2010).

1498 Assim conclui-se que todos os compostos apresentaram efeitos adversos em *Ae. aegypti*.
1499 Contudo, os danos mais acentuados e possivelmente permanentes foram observados nas larvas
1500 submetidas à associação do terpinoleno com o BMDB. Este fato, deve-se provavelmente a
1501 interação entre os compostos de classes diferentes proporcionarem uma atuação com múltiplos
1502 sítios ativos. Esta combinação também interfere no desenvolvimento da resistência, por ser mais
1503 difícil destoxificar um complexo de substâncias a um só composto (Isman 1997). O conjunto
1504 dessas características associado aos efeitos acima citados faz desta associação uma interessante
1505 alternativa de controle para o *Ae. aegypti*, contudo, estudos posteriores em concentrações maiores

1506 e outras proporções entre os compostos são necessárias para a formulação de um produto efetivo

1507 em ambientes urbanos.

1508

1509

1510

Agradecimentos

1511

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela

1512

concessão da bolsa.

1513

1514

Literatura Citada

1515

Albuquerque, J.S., E. Gama, L.P. França & R.P. Jesus. 2020. Atividade larvicida dos óleos essenciais de *Piper Dilatatum* e *Piper Hostmannianum* (Piperaceae) para o controle de *Aedes aegypti* (Culicidae) em laboratório. *Dê Ciência em foco*, 4: 22-28.

1516

1517

1518

Ali, D., A. Tripathi, H.A. Ali, Y. Shahi, K.K. Mishra, S. Alarifi, A.A. Alkahtane & S. Manohardas. 2018. ROS-dependent Bax/Bcl2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by zineb in human keratinocyte cells. *Onco Targets Ther.*, 11: 489-497

1519

1520

1521

Almeida, G.V., C. G. Sampaio & V.E.P. Martins. 2018. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. *Journal of Health & Biological Sciences*, 6: 449-462.

1522

1523

1524

Anazetti, M.C. & P.S. Melo. 2007. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp pesquisa*, 1: 37-58.

1525

1526

Ayers, J.B., H.G. Coatsworth, S. Kang, R.R. Dinglasan & L. Zhou. 2021. Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. *Communications biology*, 4: 1-9.

1527

1528

1529

Barbosa, K.B.F., N.M.B. Costa, R.C.G. Alfenas, S.O. Paula, V.P.R. Minim & J. Bressan. 2010. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr.*, 23: 629-643.

1530

1531

1532

Bezerra, A.L.F.M. & E.B.F. Pinheiro. 2021. Óleos essenciais uma alternativa para o controle de larvas do gênero *Anopheles*: uma revisão. *Research Society and Development*, 10: e37101119384-e37101119384.

1533

1534

1535

Caccia, S., M. Casartelli & G. Tettamanti. 2019. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell Tissue Res.*, 377: 505–525.

1536

1537

Camini, F.C., C.C. Silva Caetano, L.T. Almeida & C.L.B. Magalhães. 2017. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Archives of virology*, 162: 907-917.

1538

1539

Cerqueira, N.F. & W.B. Yoshida. 2002. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17: 417-423.

1540

- 1541 **Cervoni, M.S., C.A. Cardoso-Júnior, G. Craveiro, A.D.O. Souza, L.C. Alberici & K.**
 1542 **Hartfelder. 2017.** Mitochondrial capacity, oxidative damage and hypoxia gene expression
 1543 are associated with age-related division of labor in honey bee (*Apis mellifera* L.) workers.
 1544 Journal of Experimental Biology, 220: 4035-4046.
- 1545 **Costa, R.J.O., C.R. Figueiredo-Neta, R.C.D. Cruz, C.D.M. Oliveira-Tintino & I.A. Souza.**
 1546 **2023.** Composição química do extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne
 1547 (Fabaceae) e seu potencial no combate a larvas e pupas de *Aedes Aegypti*. Contribuciones a
 1548 las Ciencias Sociales, 16: 844-858.
- 1549 **Cruz, G.S., V. Wanderley-Teixeira, J.V. Oliveira, C.G. D'assunção, F.M. Cunha, A.A.C.**
 1550 **Teixeira, C.A. Guedes, K.A. Dutra, D.R.S. Barbosa & M.O. Breda. 2017.** Effect of
 1551 trans-anethole, limonene and your combination in nutritional componentes and their
 1552 reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda*
 1553 (Lepidoptera: Noctuidae). Chem. Biol. Interact., 263: 74-80.
- 1554 **Cunha, F.V.M., A.G. Coelho, L.C.C. Nunes, F.A. & Oliveira. 2018.** Fenilpropanoides:
 1555 ferramentas para promoção da estabilidade genômica. Boletim informativo Geum, 9: 50-58.
- 1556 **Gullan, P.J. & P.S. Cranston. 2012.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca,
 1557 494p.
- 1558 **Isman, M.B. 1997.** Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization.
 1559 Phytoparasitica, 25: 339-344.
- 1560 **Jabłońska-Trypuć, A. 2017.** Pesticides as Inducers of Oxidative Stress. React Oxyg Species, 3:
 1561 96–110.
- 1562 **Karthi, S., K. Uthirarajan, V. Manohar, M. Venkatesan, K. Chinnaperumal, P. Vasantha-**
 1563 **Srinivasan & P. Krutmuang. 2020.** Larvicidal enzyme inhibition and repellent activity of
 1564 red mangrove *Rhizophora mucronata* (Lam.) leaf extracts and their biomolecules against
 1565 three medically challenging arthropod vectors. Molecules, 25: 3844.
- 1566 **Korkina, L., V. Kostyuk, C. De Luca, S. Pastore. 2011.** Plant phenylpropanoids as emerging
 1567 anti-inflammatory agents. Mini-reviews in medicinal chemistry, 11: 823-835.
- 1568 **Lima, M.É.C., H.K.L.G. Oliveira, A.F.M. Monteiro & M. Fazolin. 2019.** Avaliação inseticida
 1569 de composições químicas por adição de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides ao
 1570 dilapiol. II Seminário da Embrapa Acre de Iniciação Científica e Pós-graduação: a
 1571 contribuição da ciência para a agropecuária no Acre, 1: 51-56.
- 1572 **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951.** Protein measurement with the
 1573 Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- 1574 **Machado, F.P., D. Folly, J.J.S. Enriquez, C.B. Mello, R. Esteves, R.S. Araújo, P.F.S. Toledo,**
 1575 **J.G. Mantilla-Afanador, M.G. Santos, E.E. Oliveira, E. Ricci-Junior & L. Rocha. 2023.**
 1576 Nanoemulsion of *Ocotea indecora* (Shott) Mez essential oil: Larvicidal effects against
 1577 *Aedes aegypti*. Industrial Crops and Products, 192: 116031.

- 1578 **Miller, M.A. & J.F. Zachary. 2017.** Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation,
1579 and death. *Pathologic basis of veterinary disease*, 2: 19-43.
- 1580 **Miranda, F.R., K.M. Fernandes, C.F. Farder-Gomes, R.C. Bernardes, A.H. de Oliveira,**
1581 **M.B.A. de Castro, L.A. Dourado, L.L. Oliveira, G.F. Martins & J. Serrão. 2022.**
1582 Exposure to copper sulfate impairs survival, post-embryonic midgut development and
1583 reproduction in *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*, 97: 1-8.
- 1584 **Nishida, Y. 2011.** The chemical process of oxidative stress by copper (II) and iron (III) ions in
1585 several neurodegenerative disorders. *Monatsh. Chem.*, 142: 375–384.
- 1586 **Oliveira, G.L., S.K. Cardoso, C.R. Lara-Junior, T.M. Vieira, E.F. Guimarães, L.S.**
1587 **Figueiredo, E.R. Martins, D.L. Moreira & M.A.C. Kaplan. 2013.** Chemical study and
1588 larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae).
1589 *An Acad. Bras. Cienc.*, 85: 1227-1234.
- 1590 **Pereira, A.P.M., B.A. Sousa, P.V.S Rosa, M.G.G. Lages, F.N. Silva, L.K.B. de Alencar,**
1591 **N.M.J. Amorim, F.C. Soares, R.C. Santos, G.L.C. Castro, A.P.A. Neto & G.O.**
1592 **Everton. 2022.** Larvicidal effect of the essential oil of *Curcuma xanthorrhiza* (ginger java)
1593 for *Aedes aegypti*. *Research Society and Development*, 11: e432111536785-
1594 e432111536785.
- 1595 **Pereira, A.P.M., T.G.T. Martins, A.P. Araújo-Neto, C.E.P. Conceição, F.O.V.A Conceição,**
1596 **R.T. Sousa, L.S. Silveira, A.M.A.S. Carvalho, L.B.C. Soares, F.C.A. Teixeira, P.V.S.**
1597 **Rosa & G.O. Everton. 2021.** Constituintes químicos e potencial larvicida frente *Aedes*
1598 *aegypti* do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. *Research, Society and Development*, 10:
1599 e9910917683-e9910917683.
- 1600 **Pimentel, C.S.L., B.N.D.L. Albuquerque, S.K.L. da Rocha, A.S. da Silva, A.B.V. da Silva, R.**
1601 **Bellon, A.C. Agra-Neto, J.C.R.O.F. Aguiar, P.M.G. Paiva, J.F. Princival, T.H.**
1602 **Napoleão & D.M.D.A.F. Navarro. 2022.** Insecticidal activity of the essential oil of *Piper*
1603 *corcovadensis* leaves and its major compound (1-butyl-3, 4-methylenedioxybenzene)
1604 against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, 78: 1008-1017.
- 1605 **Sadekuzzaman, M., D. Stanley, & Y. Kim. 2018.** Nitric Oxide mediates insect cellular
1606 immunity via Phospholipase A2 activation. *J. Innate Immun.*, 10: 70–81.
- 1607 **Santoyo, I. G. & A.C. Aguilar. 2012.** Phenoloxidase: a key component of the insect immune
1608 system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142: 1-16.
- 1609 **Schmid-Hempel, P. 2005.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev.*
1610 *Entomol.*, 50: 529 – 551.
- 1611 **Sedlak, J. & R.H. Lindsay. 1968.** Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev.*
1612 *Entomol.*, 50: 529-551.
- 1613 **Silva, C.P., G.K.D. Sakamoto, M.P. Pontes, R.R. Vieira, J.P.S. Natal & H. Conte. 2020.** Os
1614 riscos ambientais no Brasil devido ao uso do defensivo Malathion Emulsão Aquosa-EA

- 1615 44% no controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera: Culicidae): uma
1616 revisão. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, 11: 638-646.
- 1617 **Silva, C.T., V. Wanderley-Teixeira, G. S. Cruz, F. M. Cunha & Á.A.C. Teixeira. 2019.**
1618 Immune and nutritional responses of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae)
1619 nymphs sprayed with azadirachtin. Austral Entomology, 59: 215-224.
- 1620 **Silva, M.F.R., P.C. Bezerra-Silva, C.S.B.S. Lira, B.N.L. Albuquerque, A.C. Agra-Neto, E.V.**
1621 **Pontual, J.R. Maciel, P.M.G. Paiva & D.M.A.F. Navarro. 2016.** Composition and
1622 biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae).
1623 Exp. Parasitol., 1: 64-70.
- 1624 **Vantaux, A., A.I. Ouattarra, T. Lefrève & K.R. Dabirè. 2016.** Effects of larvicidal and larval
1625 nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for
1626 *Plasmodium falciparum*. Parasites & vectors, 9: 1-11.
- 1627 **Vargas L.D.L., S.M.B. Ferreira, M.D. Souza, C.A.L. Silva & W. Shimoyabittencourt. 2022.**
1628 Resistência das populações de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Insecta,
1629 Diptera, Culicidae) aos inseticidas utilizados para o controle: estado da arte do
1630 conhecimento. Rev. Ciênc. Méd. Biol., 21: 98-116.
- 1631 **Velki, M., D. Kodrik, J. Večeřa, B.K. Hackenberger & R. Socha. 2011.** Oxidative stress
1632 elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. Gen. Comp. Endocrinol., 172:
1633 77– 84.
- 1634 **Wu, J., L. Wang, Y. Zhang, S. Zhang, S. Ahmad & Y. Luo. 2021.** Synthesis and
1635 photoactivated toxicity of 2-thiophenylfuranocoumarin induce midgut damage and
1636 apoptosis in *Aedes aegypti* larvae. Journal of agricultural and food chemistry, 69: 1091-
1637 1106.
- 1638 **Yu, L., J. Yan & Z. Sun. 2017.** D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant
1639 properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK
1640 signaling pathways. Mol. Med. Rep., 15: 2339 – 2346.
- 1641

1642

1643 Tabela 1. Análise de toxicidade para associação dos compostos terpinoleno e 1-butil-3,4-
1644 metilenodioxibenzeno.

Composto	N ^a	GL ^b	CL ₅₀ (95% IC) ^{c,d} (LCL-UCL) ^e	CL ₉₀ (95% IC) ^{c,d} (LCL-UCL) ^e
Terpinoleno+BMBD	440	3	75,69 ± 2,37 ppm (67,83-83,55)	117,55 ± 2,37 ppm (108,35-124,68)

1645 ^a número de larvas usadas no teste; ^b graus de liberdade; ^c concentração letal e intervalo de
1646 confiança; ^d cálculos usando o startplus; ^e concentrações letais mínimas e máximas estimadas pelo
1647 estatístico.
1648

1649

1650

1651

1652

1653

1654

1655

1656

1657

1658

1659

1660

1661

1662

1663

1664

1665

1666

1667

1668

1669

1670

1671

1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718

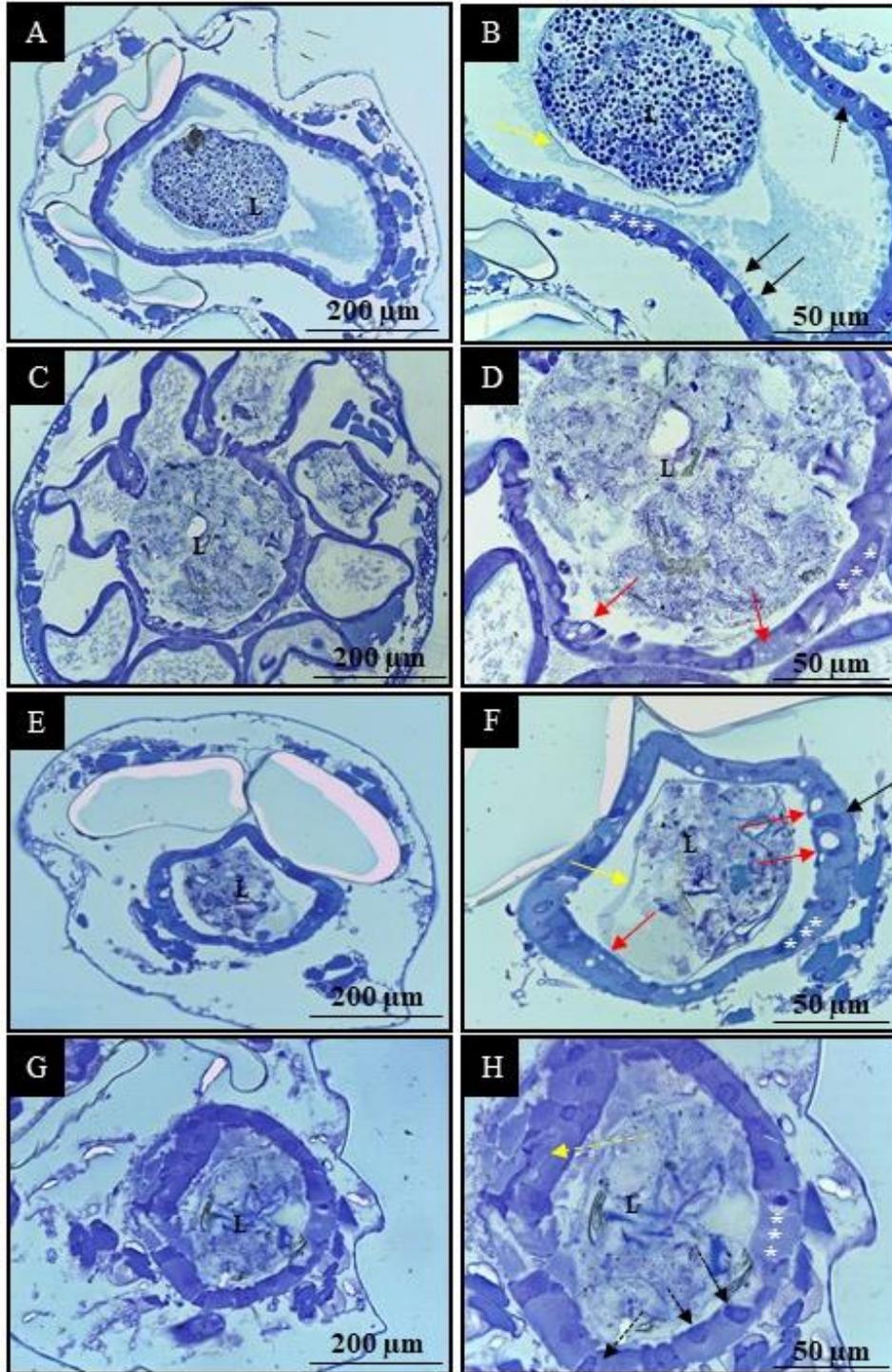


Figura 1. Fotomicrografia do intestino médio de larvas L4 de *Aedes aegypti*. A e B: Controle, C e D: Terpinoleno, E e F: BMDB e G e H: Associação (Terpinoleno+BMDB). L: lúmen, asterisco: epitélio colunar, seta amarela: matriz peritrófica, seta vermelha: vacúolos, seta preta: microvilos, seta preta tracejada: ninhos de células regenerativas, seta amarela tracejada: tumefação celular.

1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766

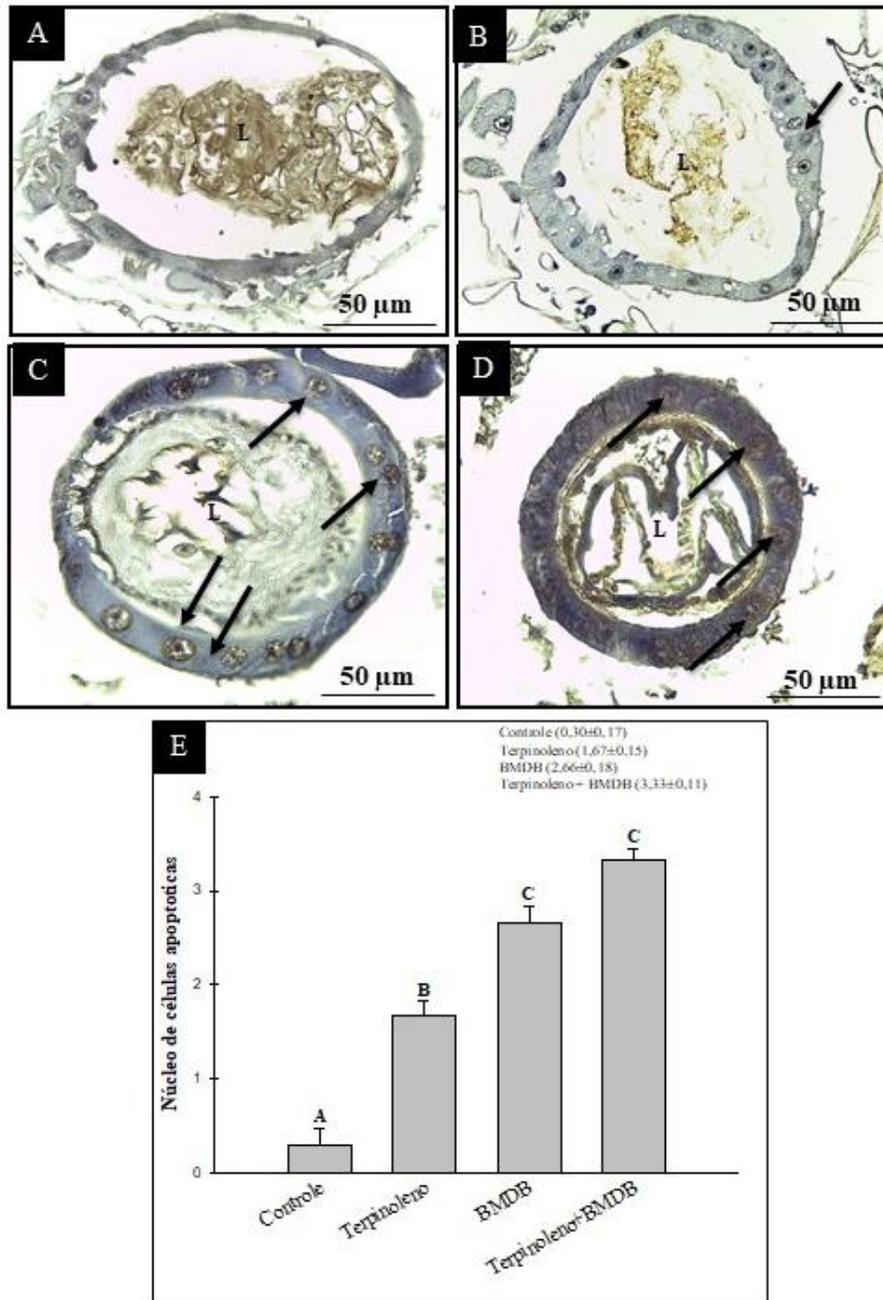


Figura 2. Teste de TUNEL para detecção da apoptose do intestino médio de larvas L4 de *Aedes aegypti* A: Controle, B: Terpinoleno, C: BMDB, D: Associação (Terpinoleno+BMDB) e E: Índice apoptótico (média ± EP). L: Lúmen. A presença da apoptose esta indicada pelas setas evidenciando os núcleos com coloração amarelada. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (F: 44,73; P<.0001).

1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810

1811
1812
1813

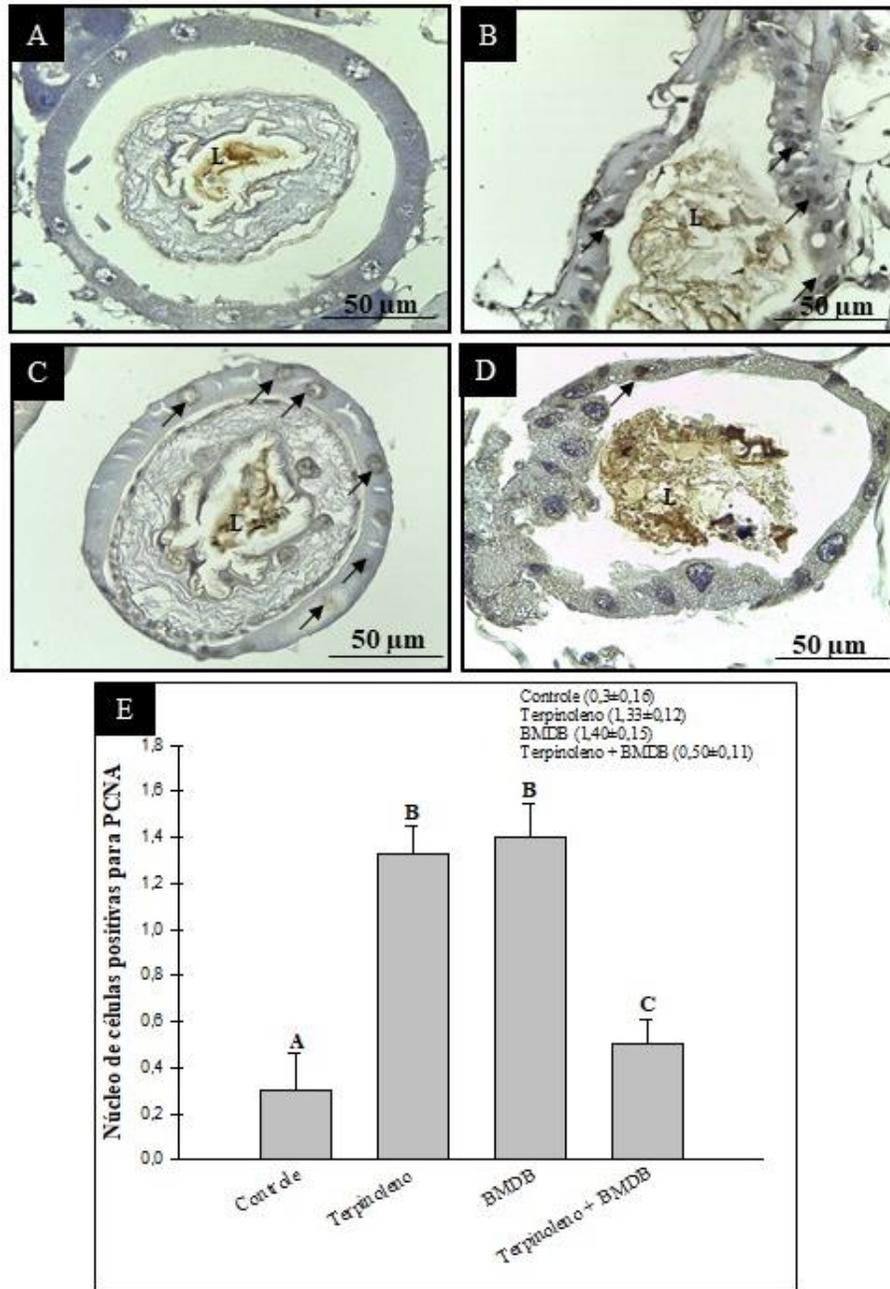


Figura 3. Expressão do marcador de proliferação celular. A: controle, B: Terpinoleno C: BMDB e D: Associação (Terpinoleno+BMDB) e E: Índice de proliferação celular (média ± EP). L: Lúmen. A presença da proliferação esta indicada pelas setas evidenciando os núcleos com coloração amarelada. Barras seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (F: 65,67; P<.0001).

1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858

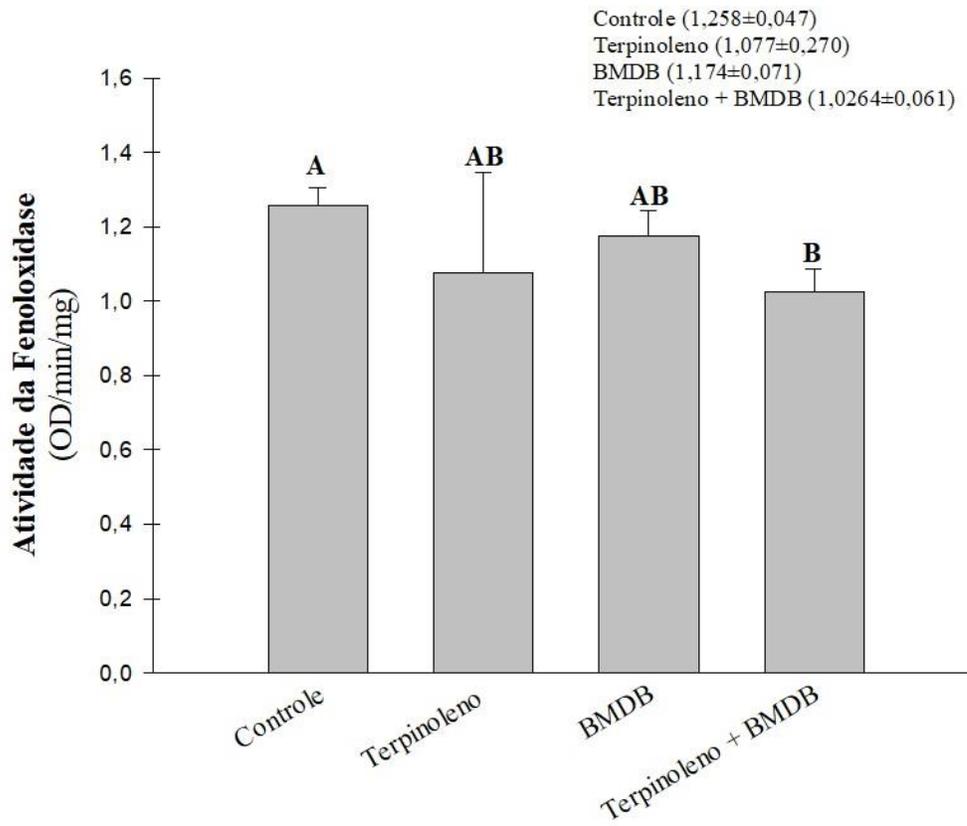


Figura 4. Atividade da enzima fenoloxidase (OD/min/mg) de larvas L4 de *Aedes aegypti* tratadas com Terpinoleno, BMDB e Associação (Terpinoleno+BMDB). Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (F=3,63; P=0,0218).

1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903

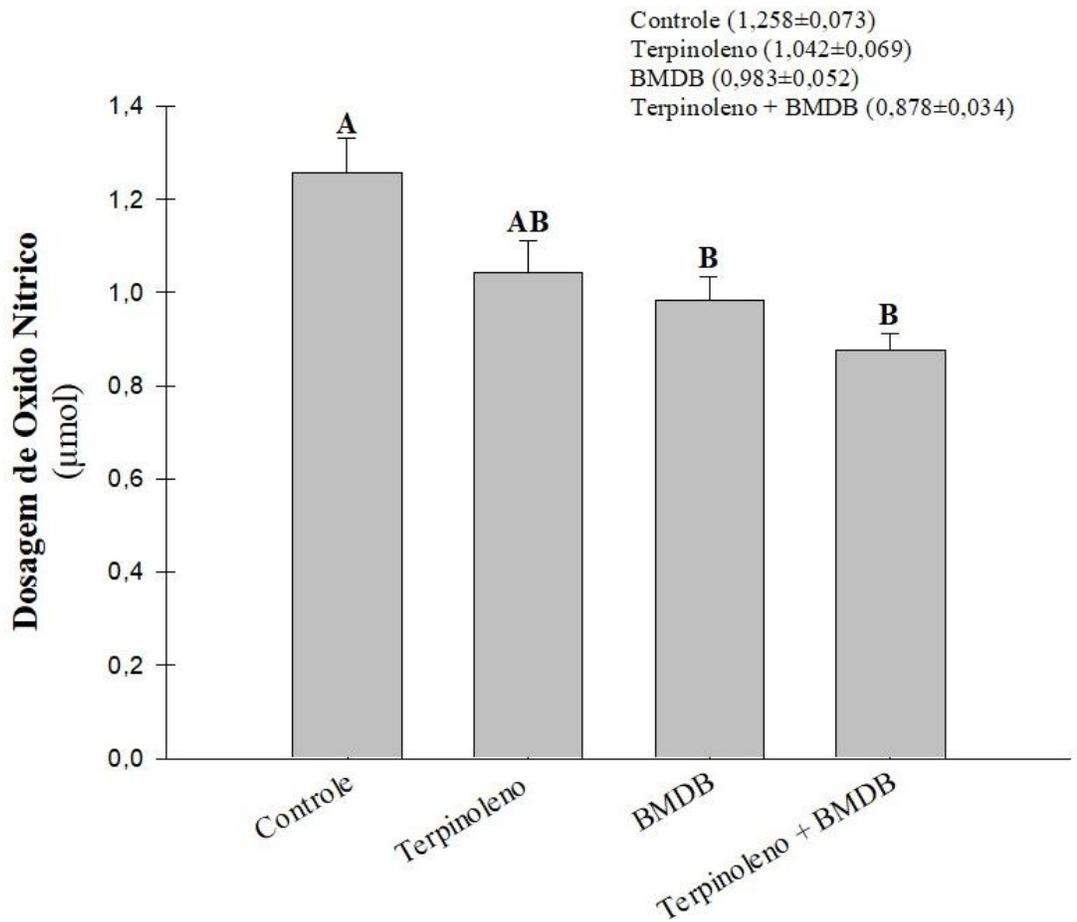
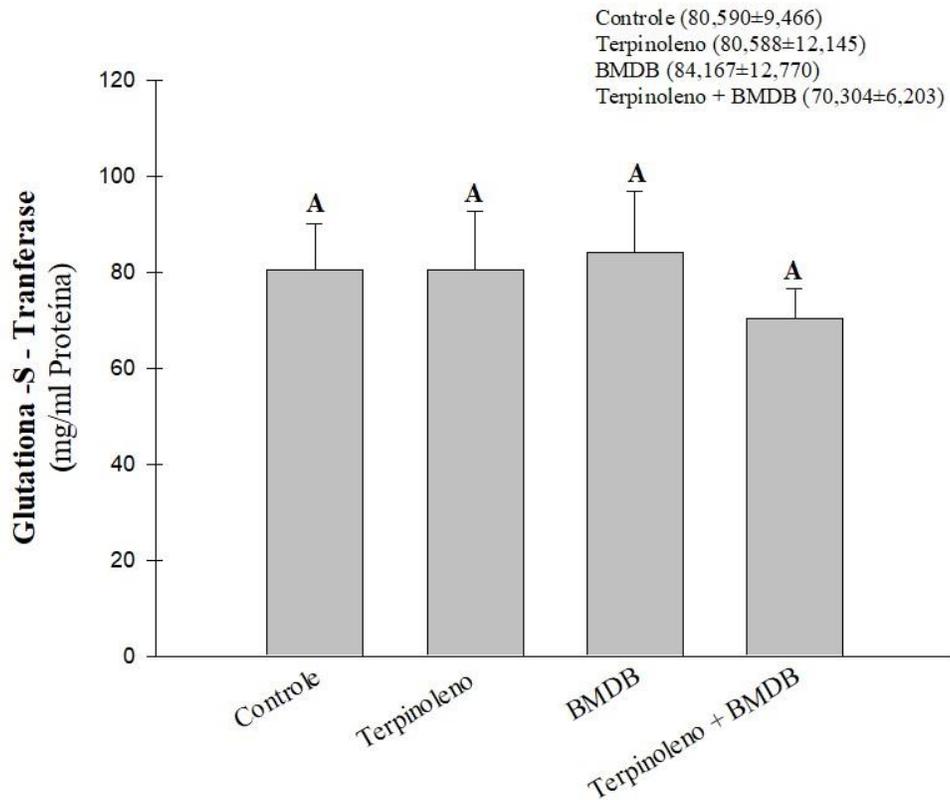


Figura 5. Concentração de Óxido Nítrico (μM de NO_2^- /mL de macerado) de larvas L4 de *Aedes aegypti* tratadas com Terpinoleno, BMDB e Associação (Terpinoleno+BMDB). Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ($F=7,37$; $P=0,0006$)

1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928



1929 **Figura 6.** Estresse oxidativo a partir da mensuração da Glutathione-S-Transferase (GSH) de larvas
1930 L4 de *Aedes aegypti* tratadas com Terpinoleno, BMDB e Associação (Terpinoleno+BMDB).
1931 Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de
1932 probabilidade. (F=3,05; P=0,0482)

1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943

1944

1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

1978

1979

1980

1981

1982

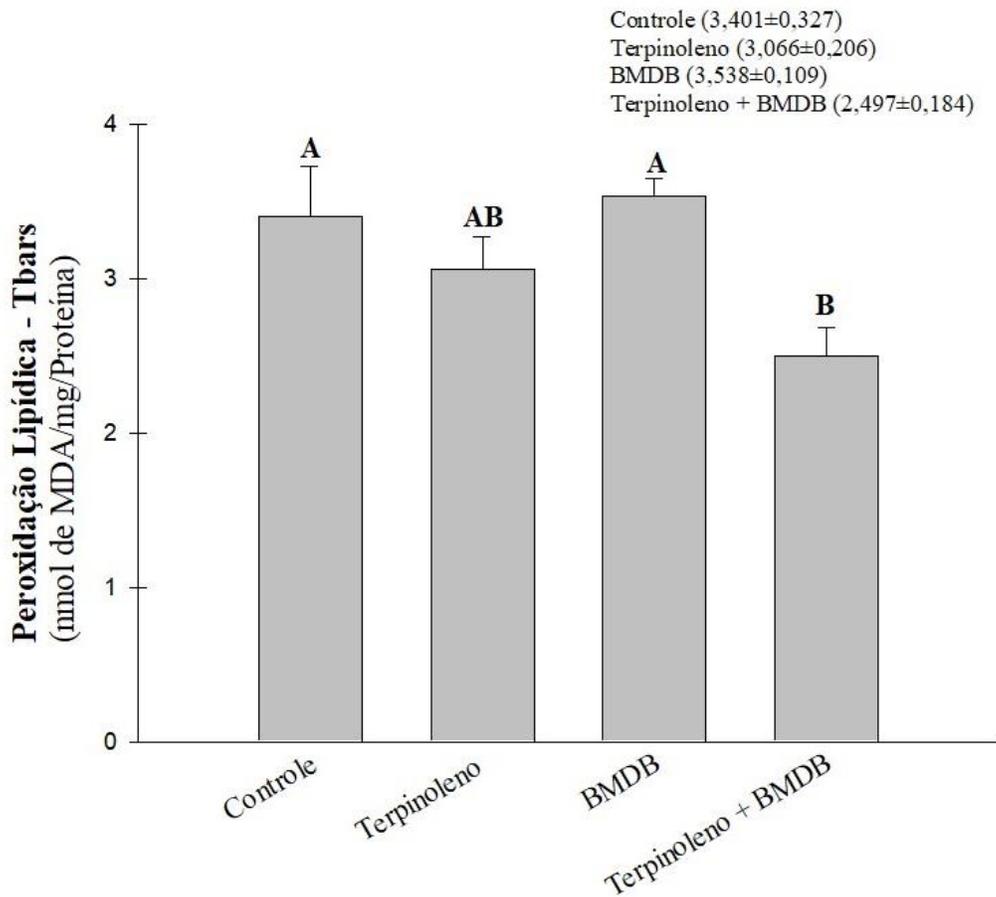


Figura 7. Estresse oxidativo a partir da mensuração do ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicativo de peroxidação lipídica (nmol de MDA/mg/proteína) de larvas L4 de *Aedes aegypti* tratadas com Terpinoleno, BMDB e Associação (Terpinoleno+BMDB). Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (F=4,66; P=0,0105)

1983

1984

1985

CAPÍTULO 4

1986

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1987

1988

1989

1990

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados nesta dissertação destacam o potencial que biomoléculas desempenham sobre o organismo de insetos vetores, contribuindo para ampliação do hall de possibilidades na formulação de novos produtos sob uma perspectiva mais consciente acerca de suas implicações ao meio ambiente.

1991

1992

1993

1994

1995

De maneira geral, todos os compostos aqui estudados ocasionaram distúrbios ao intestino médio de *Ae. aegypti*, sendo evidenciadas alterações estruturais no epitélio, por meio de vacuolização, tumefação celular e ausência de matriz peritrófica. No entanto, apesar de apresentar menor toxicidade em comparação aos compostos isolados, os danos mais acentuados foram observados para a associação.

1996

1997

1998

1999

2000

2001

2002

Foi observado que todos os tratamentos induziram a apoptose, provavelmente, almejando a eliminação de células danificadas ou potencialmente perigosas, visto a situação de estresse ao qual foi submetido. Todavia, expressões mais significativas foram verificadas para o BMDB isolado e associado. A fim de impedir o colapso do órgão, marcadores positivos para a proliferação celular foram registrados, indicando, possivelmente, um dano transitório e passível de regeneração, ainda assim as larvas tratadas com a associação apresentaram o menor índice entre os tratamentos, indicando a possibilidade de um dano permanente e letal.

2003

2004

2005

Em relação às defesas químicas e enzimáticas do inseto, foi verificado que a glutational-S-trasnferase e o Tbars, de um modo geral, não diferiram do controle, fato este que pode ser explicado devido ao terpinoleno e o BMBD serem antioxidantes naturais. Já a redução nas taxas

2006 de fenoloxidade e óxido nítrico, com destaque para associação, indica que o organismo deste
2007 culicídeo ficou exposto à toxicidade dos compostos.

2008 Diante do exposto, pode-se inferir que embora todos os tratamentos tenham ocasionado
2009 distúrbios às defesas estruturais e enzimáticas do inseto, danos mais intensos foram verificados
2010 decorrentes do uso do BMDB isolado e associado, com destaque para este ultimo. Estudos
2011 posteriores que englobem concentrações mais próximas das utilizadas em campo (CL₉₀) bem
2012 como variação nas proporções entre os compostos podem resultar em dados interessantes que
2013 auxiliem na comprovação da eficácia, construção da patente e posterior utilização em ambientes
2014 peridomiciliais.

2015

2016