

TOXICIDADE DE ROTENOIDE ISOLADO DE SEMENTES DE *Clitoria
fairchildiana* PARA *Aedes aegypti*

VITOR DEL CARO CRISTO

Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro – 2023

TOXICIDADE DE ROTENOIDE ISOLADO DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* SOBRE *Aedes aegypti*

VITOR DEL CARO CRISTO

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências parciais para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Orientadora: Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes

Co – orientadora: Dr^a Maria Aparecida Aride Bertonceli

Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Fevereiro – 2023

TOXICIDADE DE ROTENOIDE ISOLADO DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* SOBRE *Aedes aegypti*

VITOR DEL CARO CRISTO

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências parciais para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia. ”

Aprovada em 16 de fevereiro de 2023.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Olga Lima Tavares Machado (LQFPP – UENF)

Dr.^a Nathália Bastos Lima (IFF – Quissamã)

Prof. Rodrigo Maciel Lima (IFF – Campos)

Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes – UENF(Orientadora)

Dr^a Maria Aparecida Aride Bertonceli - UENF (Co-orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus, senhor de toda criação: glória e louvor por cada instante da minha vida, por tudo que Ele me proporciona e por cada conquista dedicada a seu santo nome.

À minha família, seio de amor e fraternidade, presentes de Deus na minha história: Cristina, minha mãe e melhor refúgio e amparo. Henrique, meu pai, meu maior exemplo e herói. Geovana, minha irmã e laço sagrado de companheirismo. Stella, minha noiva e melhor parte, aquela que completa em si aquilo que falta em mim. Angelo, meu irmão e melhor amigo. Estes que me ensinam que a vida só tem sentido quando o amor é a motivação para se viver.

À UENF e todo seu corpo docente, alunos, pesquisadores, técnicos e colaboradores: à professora Kátia por uma acolhida muito especial com imensa prontidão em me receber, ensinar e instruir, colaborando para o sucesso desta etapa da minha vida. À Cida pela disposição em me auxiliar, incentivar, aconselhar e acompanhar minha formação. À Barbara e Sara que me mostraram o que é ser um grupo de pesquisa. Aos professores e seus respectivos alunos que me auxiliaram de forma muito solícita e permitiram o êxito deste trabalho. De forma especial meu muito obrigado ao professor Franzé e todo o grupo do insetário; às professoras Elenir e Olga e todos os seus alunos companheiros de laboratório; ao professor Ivo e suas alunas; expresso aqui a gratidão por me permitirem trabalhar em conjunto e me receberem com tamanha fraternidade. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Aos órgãos de fomento e financiadores da pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e UENF por permitirem a construção de um país melhor ao dedicar recursos para a educação e ciência e possibilitar o trabalho de tantas pessoas dispostas e dedicadas à inovação e ao futuro.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. Introdução	13
1.1. Arboviroses e vetores	13
1.2. <i>Aedes aegypti</i>	15
1.3. Métodos de controle	17
1.4. <i>Clitoria fairchildiana</i> (R.A. Howard).....	19
1.5. Defesa Vegetal	21
1.5.1. Defesa Constitutiva vs. Induzida.....	22
1.6. Compostos vegetais bioativos	24
1.6.1. Moléculas de defesa de natureza proteica	24
1.6.2. Metabólitos secundários de defesa	24
1.6.3 As subclasses dos flavonoides	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Material vegetal	33
3.2 Inseto modelo	33
3.3 Extração de biomoléculas das sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i>	33
3.4 Dosagem de proteínas	34
3.5 Incorporação das frações na dieta de <i>Aedes aegypti</i>	35
3.6 Isolamento das biomoléculas por cromatografia líquida de exclusão molecular	35
3.7 Isolamento de biomoléculas por Cromatografia líquida em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	36

3.8 Visualização das biomoléculas por Cromatografia líquida em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	36
3.9 Visualização das proteínas por eletroforese.....	37
3.10 Caracterização dos efeitos fisiológicos dos compostos-teste sobre <i>Ae. aegypti</i>	38
3.10.1 Quantificação de biomoléculas energéticas e da atividade enzimática nas larvas de <i>Ae. aegypti</i>	38
3.10.2 Análises de compartimentos acidificados por microscopia de fluorescência.....	40
3.10.3 Análises de espécies reativas de oxigênio (ROS) por microscopia de fluorescência.....	41
3.10.4 Elucidação estrutural da substância isolada.....	41
3.11 Tratamento de dados e análises estatísticas.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Isolamento de compostos inseticidas das sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i>	42
4.2 Efeitos fisiológicos de 11Dx sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i>	55
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	78
7 REFERENCIAL TEÓRICO.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios imaturos do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 2: Representação esquemática de diferentes fases do ciclo de vida de <i>C. fairchildiana</i>	20
Figura 3: Rotoxen - Esqueleto base da classe dos rotenóides	29
Figura 4: Esquema canal alimentar de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	40
Figura 5: Frações proteicas das sementes de <i>C. fairchildiana</i> , com base na solubilidade	42
Figura 6: Sobrevivência das larvas de quarto estágio de <i>Ae. aegypti</i> em bioensaio com diferentes concentrações das frações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de <i>C. fairchildiana</i>	44
Figura 7: Visualização eletroforética do perfil proteico da Fração 1 do cotilédone de <i>C. fairchildiana</i>	45
Figura 8: - Cromatografia de F1 em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50	45
Figura 9: Representação esquemática do ciclo de vida do inseto <i>C. maculatus</i>	46
Figura 10: Visualização eletroforética do perfil proteico da Fração 1 e dos picos de Sephadex G-50 P1, P2 e P3	47
Figura 11: Cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários existentes nos grupos P1, P2 e P3	48
Figura 12: Cromatografia de P3 em coluna de exclusão molecular Sephadex G-25	49
Figura 13: Visualização eletroforética do processo de isolamento do composto bioativo, incluindo os perfis proteicos de F1, P3, PA, PB e PC	50
Figura 14: Cromatografia em camada delgada preparativa dos metabólitos secundários existentes no grupo P3	52
Figura 15: Letalidade de M3 às larvas de <i>A. aegypti</i> de 4 ^o estágio	52
Figura 16: A) Estrutura do 11-Desoxiclitoriacetal. B) Representação espacial da construção molecular de 11-Desoxiclitoriacetal	53
Figura 17: Observação das características morfológicas de larvas de 4 ^o ínstar de <i>Aedes aegypti</i> controle e tratadas (mortas) com CL ₅₀ de 11Dx	55

Figura 18: Microscopia de fluorescência em 365nm para observação de emissão de fluorescência por 11Dx ao logo da estrutura larval	56
Figura 19: Microscopia de fluorescência com marcador de ROS em 465nm para detecção de estresse oxidativo no intestino das larvas controle e tratadas com 11Dx	57
Figura 20: Microscopia de fluorescência com o marcador de acidificação dicloridrato de quinacrina	58
Figura 21: Níveis de fluorescência mensurados por ImageJ (v1.53t) nos compartimentos do trato digestivo das larvas de <i>Ae. aegypti</i>	59
Figura 22: Níveis corporais de (A) proteínas totais, (B) atividade lipásica e (C) glicose nos grupos de larvas	60
Figura 23: Níveis corporais de (A) colesterol e (B) triglicerídeos totais expressos em micrograma por miligrama de larva	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados do espectro de RMN do 11-Deoxiclitoriactal	54
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

11Dx	11-Desoxiclitriacetato
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
CCDA	Cromatografia líquida em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia líquida em Camada Delgada Preparativa
CHIKV	Vírus chikungunya
CL₅₀	Concentração Letal a 50% da população
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Acetato de sódio
ETI	Imunidade desencadeada por efetores
ETS	Suscetibilidade desencadeada por efetores
HAMPs	Padrões moleculares associados a herbívoros
IMP	Proteases de melanização imune
kDa	QuiloDaltons
LBT	Laboratório de Biotecnologia
M/PAMPs	Padrões moleculares associados a micróbios/patógenos
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
OPS	Organización Panamericana De La Salud
PAGE	Gel de poliacrilamida
PFTs	Toxinas formadoras de poros
pH	Potencial de hidrogênio
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
Ppm	Parte por milhão
PTI	Imunidade desencadeada por padrão
RIP	Proteínas inativadoras de ribossomos
RMN	Ressonância magnética nuclear

RNI Intermediários reativos de nitrogênio

ROI Intermediários reativos de oxigênio

ROS espécies reativas de oxigênio

SDS Dodecil sulfato de sódio

TMP Protease de melanização tecidual

TMS Tetrametilsilano

UENF Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UV Luz ultravioleta

V-ATPase ATPase vacuolar

WHO World Health Organization

ZIKV Virus Zika

RESUMO

O *Aedes aegypti* é responsável pela transmissão de arboviroses de relevância global, incluindo dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Como eliminar o vetor é, em geral, a forma mais eficaz de interromper a propagação destes arbovírus e o desenvolvimento de resistência pelo inseto aos métodos tradicionais de combate é um obstáculo a ser superado, o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas que apresentem maior efetividade e segurança se faz essencial. Compostos bioativos isolados de plantas demonstraram potencial para uso em novas formulações com seletividade do tratamento e menor rastro ecológico ao afetar processos fisiológicos-chave dos insetos. Espécies do gênero *Clitoria* foram pouco estudadas quimicamente e destaca-se a espécie *C. fairchildiana* como uma potencial fonte de bioativos ainda pouco explorada. O presente estudo investiga a presença de biomoléculas em sementes da espécie amazônica *C. fairchildiana*, com potencialidade para controle do inseto vetor *Ae. aegypti*. Nesta direção, as biomoléculas dos cotilédones das sementes foram fracionadas, submetidas a testes de atividade inseticida sobre *Ae. aegypti*, isoladas e identificadas. O composto-alvo principal do processo de isolamento foi identificado como um metabólito secundário, o rotenóide 11-desoxiclitoriactal, através da técnica de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional. A molécula demonstrou elevada atividade tóxica contra larvas de quarto estágio de *Ae. aegypti* (CL₅₀: 28,29 ppm) e foi capaz de desencadear um processo de geração de espécies reativas de oxigênio nas larvas tratadas. Adicionalmente o rotenóide reduziu os níveis corporais de proteínas, glicose, colesterol e triglicerídeos, reduziu os níveis de acidificação no trato digestivo e induziu a melanização, que culminou na formação de pseudotumores melanocíticos. Por meio da fluorescência intrínseca ao rotenóide, observou-se sua presença ao longo do corpo do inseto, com especial acúmulo no sistema digestivo. Estas análises indicaram que o 11-desoxiclitoriactal causou um distúrbio metabólico nas larvas, possivelmente mediado por estresse oxidativo.

ABSTRACT

Aedes aegypti is responsible for transmitting arboviruses of global relevance, including dengue, zika, chikungunya and yellow fever. As the elimination of the vector is, in general, the effective way to stop the propagation of these arboviruses and the development of resistance, by the insect, to traditional combat methods is an obstacle to be overcome, the development of new biotechnological tools that demonstrate more effectiveness and security is essential. Bioactive compounds isolated from plants demonstrate potential for use in new formulations with treatment selectivity and lower ecological footprint by affecting key physiological processes in insects. Species of the genus *Clitoria* have been little chemically studied and the species *C. fairchildiana* stands out as a potential source of bioactives still little explored. The present study investigates the presence of biomolecules in seeds of the amazonian species *C. fairchildiana*, with potential to control the insect vector *Ae. aegypti*. In this direction, the biomolecules of the cotyledons of the seeds were fractionated, submitted to tests of insecticidal activity against *Ae. aegypti*, isolated and identified. The main target compound of the isolation process was identified as a secondary metabolite, the rotenoid 11-deoxyclitoriacetal, by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance technique. The molecule demonstrated high toxic activity against fourth-stage larvae of *Ae. aegypti* (LC50: 28.29 ppm) and was able to trigger a process of generation of reactive oxygen species in the treated larvae. Additionally, the rotenoid reduced body levels of proteins, glucose, cholesterol and triglycerides, reduced levels of acidification in the digestive tract and induced melanization, which culminated in the formation of melanocytic pseudotumors. By means of intrinsic fluorescence to the rotenoid, its presence was observed throughout the insect's body, with special accumulation in the digestive system. These analyzes indicated that 11-deoxyclitoriacetal caused a metabolic disturbance in the larvae, possibly mediated by oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arboviroses e vetores

São conhecidos pelo homem centenas de vírus que vivem em ciclos envolvendo um vetor artrópode hematófago e hospedeiros vertebrados, os denominados arbovírus (do inglês, *arthropod borne virus*) (Rust, 2012). Dentre estes, aproximadamente, 150 espécies são capazes de infectar humanos (Cleton *et al.*, 2012) e hoje são motivo de elevada preocupação na saúde pública no mundo todo (Donalisio *et al.*, 2017).

Apesar de apresentarem distribuição geográfica quase global, à exceção do continente antártico, a maior prevalência dos arbovírus se dá em regiões tropicais que apresentam fatores ecológicos e ambientais favoráveis ao ciclo de transmissão viral (Mondet *et al.*, 2002). Os arbovírus conhecidos pertencem a cinco famílias virais, dentre as quais destacam-se as famílias Togaviridae e Flaviviridae como as mais incidentes em zoonoses e doenças humanas (Figueiredo, 2015).

As doenças transmitidas por vetores correspondem a um dos problemas de saúde pública mais significativos em todo o mundo, representando risco para 80% da população global. Arboviroses são particularmente preocupantes devido ao aumento de casos globais promovidos pela rápida disseminação dos vetores, tanto dos vetores primários quanto dos secundários (WHO, 2014. Liu *et al.*, 2017)

Dentre esta diversidade, algumas arboviroses são consideradas emergentes na população brasileira, como exemplo a dengue, a zika e a chikungunya, todas transmitidas via mosquito vetor hematófago (Weaver, 2018). No âmbito da saúde pública a preocupação em relação à incidência e prevalência de arboviroses deve-se à elevada possibilidade de dispersão, alta capacidade de adaptação a novos hospedeiros e ambientes, potencial para desenvolvimento de epidemias, sobrecarga do sistema de saúde, além da ocorrência de um elevado número de casos graves apresentando síndrome febril, encefalite, hemorragia e possíveis alterações imunológicas (Mourão *et al.*, 2015; Donalisio *et al.*, 2017).

A dengue compreende aproximadamente 390 milhões de infecções por ano distribuídas em todos os continentes, com exceção da Antártida. O número de casos relatados aumentou oito vezes e o número de mortes decorrentes quadruplicou nas últimas duas décadas (Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2022). Até o mês de outubro de 2022 registrou-se

aumento de 184,6% no quantitativo de casos prováveis de dengue comparando com o mesmo período em 2021, chegando ao número de 1,3 milhão de casos, com 909 óbitos neste ano, contra 478,5 mil casos no ano passado (Ministério da Saúde, 2022). O primeiro relato de Zika Virus (ZIKV) em humanos ocorreu na Nigéria em 1953 (Macnamara, 1954) e as primeiras epidemias relacionadas ao ZIKV foram relatadas em Yap, Micronésia (2007) e Polinésia Francesa (2013); surtos foram relatados no Brasil em 2015 e 2016 (Baud *et al.*, 2017; Ruchusatsawat *et al.*, 2019). O vírus chikungunya (CHIKV) foi relatado pela primeira vez na Tanzânia, em 1952, e desde então se espalhou rapidamente pelo mundo causando epidemias esporádicas e significativas na Ásia, Índia, Europa e Américas. Sua epidemiologia demonstra padrões esporádicos de surtos, provavelmente causados pela introdução do vírus em ambientes urbanos a partir do ciclo silvestre, sendo os primatas não humanos o principal hospedeiro reservatório mais provável (Thiberville *et al.*, 2013; Silva & Dermody, 2017; Wahid *et al.*, 2017).

A infecção pelo vírus da dengue (DENV) pode variar entre apresentações clínicas leves, como uma doença febril semelhante à gripe, e formas graves como síndrome do choque da dengue e febre hemorrágica da dengue (Kalayanaroj, 2011). A febre chikungunya, causada pelo CHIKV, pertencente ao gênero Alphavirus da família Togaviridae, é uma doença já identificada em mais de 60 países; a infecção é caracterizada por febre de início súbito, erupção cutânea e artralgia debilitante (dor nas articulações associada ao CHIKV) que apesar de normalmente durar alguns dias, pode permanecer muitos meses ou até anos (Dupuis *et al.*, 2012). Já o vírus Zika é um flavivírus, relatado em 65 países e suas apresentações clínicas podem incluir febre Zika e síndrome de Guillain-Barré. A infecção pelo ZIKV durante a gravidez gera uma preocupação devido à associação com síndromes congênitas que se referem a um grupo de defeitos congênitos, notadamente a microcefalia (Chan *et al.*, 2016; Miranda *et al.*, 2016).

A ocorrência destas doenças é relacionada, direta e indiretamente, aos fatores ligados ao controle de vetores das doenças, como carência de planejamento urbano, desmatamento, mudanças climáticas, saneamento básico ineficiente, políticas de combate ineficazes, entre outros fatores (Mota *et al.*, 2016).

O grupo dos arbovírus apresenta elevada plasticidade genética com grande frequência de mutação, favorecendo a adaptação a novos hospedeiros e a circulação em ciclos enzoóticos com certa especificidade, e que em algum momento pode passar a inserir o homem como hospedeiro vertebrado do ciclo (Lopes, 2014; Coffey, 2013). Observa-se que

o surgimento de novos sorotipos é um empecilho no desenvolvimento de vacinas. Desta forma, a vacinação como forma de controle de transmissão, no que tange às doenças transmitidas por *Ae. Aegypti*, corresponde a um cenário ainda distante (Pilaquina, 2019), à exceção da febre amarela (Frierson, 2010). A falta de tratamento específico para estas doenças faz com que atualmente as medidas de combate à propagação das arboviroses possuam enfoque no combate ao vetor viral, os mosquitos (Erlanger *et al.*, 2008; Marcombe, 2019).

Embora os arbovírus possam ser transmitidos por diferentes artrópodes hematófagos, como carrapatos e moscas hematófagas, os vírus mais significativos para a saúde humana são transmitidos por membros da família Culicidae (Weaver, 2010). Cerca de 300 espécies de mosquito (culicídeos) têm a capacidade de transmitir algum arbovírus. Nesta perspectiva, deve-se despender grande atenção ao gênero *Aedes*, cujas espécies relacionam-se à transmissão de 115 arbovírus (Liang *et al.*, 2015a).

1.2. *Aedes aegypti*

Espalhando-se pelo mundo a partir da África Ocidental há aproximadamente 500 anos, através do comércio de escravos, o *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) encontra-se largamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais (Powell, *et al.*, 2018). As condições meteorológicas influenciam diretamente na incidência de arbovírus ao modular as populações de mosquitos. A faixa de temperatura entre 20 e 35°C representa condição favorável ao desenvolvimento do mosquito, fertilização e competência vetorial, aumentando as taxas de replicação viral e a carga viral no corpo do inseto e, portanto, reduzindo os períodos de incubação extrínsecos e aumentando a transmissão (Morin *et al.*, 2013; Ciota & Keyel, 2019).

Fatores não climáticos que favorecem ecologicamente o mosquito incluem índice de urbanização, vegetação e acessibilidade às populações humanas. Fatores socioeconômicos também contribuem para disseminação dessa espécie altamente antropofílica, que vive dentro e nas proximidades de habitações humanas e utiliza recipientes de armazenamento de água doméstica na sua reprodução. Desta forma, a construção de moradias precárias, a alta densidade populacional e saneamento inadequado são fatores chave na promoção das populações do mosquito (Kraemer *et al.*, 2015; Dickens *et al.*, 2018). Na América Latina é significativa a presença do *Ae. aegypti* devido à sua adequação ambiental, clima tropical e

recursos muitas vezes limitados dos programas de controle de vetores (Rodriguez *et al.*, 2016; Lippi *et al.*, 2019).

Os representantes desta espécie vivem principalmente em áreas urbanas e são capazes de transmitir doenças de grande representatividade incluindo dengue, chikungunya, febre amarela e zika. Esta espécie desenvolveu um comportamento antropofílico e sinantrópico em sua trajetória evolutiva, configurando-se como o culicídeo mais associado ao homem. Como consequência, o mosquito está relacionado com a transmissão de várias doenças (Chhabra *et al.*, 2008; Silvério *et al.*, 2020). O avanço no desenvolvimento de possíveis ferramentas para seu combate tem sido lento, frente à necessidade mundial (Matthews *et al.*, 2018).

O desenvolvimento dos indivíduos desta espécie é holometábolo com quatro estágios (ovo, larva, pupa e adulto) e duração total do ciclo em média de 10 dias. Os ovos são depositados em recipiente úmido, próximo ao nível da água, possuem cerca de 1 mm de comprimento e podem eclodir, ao se completar o desenvolvimento do embrião, ou entrar em quiescência facultativa e se manterem viáveis por cerca de um ano, até que condições de eclosão sejam detectadas (Bicout *et al.*, 2002; Forattini, 2002; Farnesi *et al.*, 2009).

A fase larval, dividida em 4 estádios (L1-L4), é aquática, de respiração aérea, sua alimentação é oriunda de matéria orgânica particulada e microrganismos, permitindo o acúmulo de energia e crescimento da larva (Borror *et al.*, 1989). Fatores ambientais são importantes reguladores no tempo de duração do ciclo larval uma vez que baixas temperaturas, baixa disponibilidade alimentar e alta densidade larval podem prolongar esta fase por semanas até que a massa crítica permita iniciar a pupação (Telang *et al.*, 2007). A pupa é o último estágio imaturo, prolonga-se por aproximadamente dois dias, se movimenta, mas não se alimenta até o momento de surgimento do adulto (Forattini, 2002) (Figura 1).

Os adultos são alados, de hábito alimentar fitofágico, porém as fêmeas necessitam de proteínas e outros nutrientes presentes no sangue para maturação de seus ovos, praticando, para este fim, a hematofagia (Clements, 1993); três dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas põem entre 100 e 200 ovos e podem novamente iniciar outro processo de postura, sem necessitar de nova cópula, uma vez que espermatozoides são armazenados em espermatecas. A realização de múltiplos repastos sanguíneos a cada ciclo

gonotrófico, aliada à elevada capacidade de voo da espécie na área urbana (até 800 m) e à oviposição em saltos, favorecem a transmissão de agentes infecciosos (Reiter, 2007).

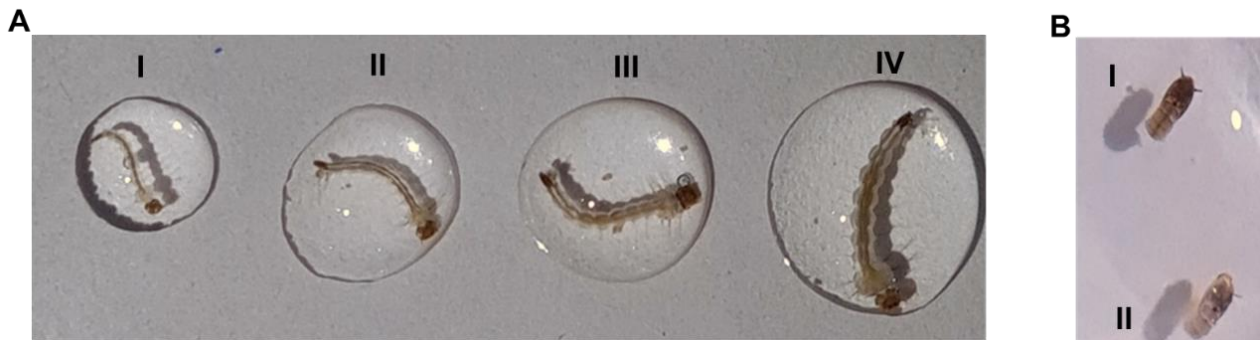


Figura 1: Estágios imaturos do ciclo de vida de *Aedes aegypti*. A – Estádios larvais (I, II, III e IV) e B – pupas (I e II). (Arquivo pessoal).

1.3. Métodos de controle

Os métodos primários mais utilizados para controle de mosquitos vetores incluem abordagens mecânicas, como eliminação de focos e criadouros e proteção de possíveis locais de reprodução; abordagens biológicas, por meio do emprego de espécies entomopatogênicas ou predadoras; e abordagem química, através de inseticidas sintéticos contra mosquitos adultos e larvas, seja por pulverização ou tratamento de criadouros (Achee, 2015; Corbel, 2016; Karthi *et al.*, 2020). O controle de vetores como medida de prevenção de doenças, se baseia em quatro tipos de intervenções: 1) Ambiental: modificação do meio ambiente; 2) Química: aplicação de repelentes e inseticidas; 3) Biológica: organismos que competem, parasitam e reduzem a população; 4) Novas tecnologias: mosquitos esterilizados, geneticamente modificados ou autocidas.

As intervenções ambientais podem ainda ser subclassificadas em: a) Modificação: transformações permanentes como rede de abastecimento de água, coleta e descarte de resíduos sólidos, planejamento urbano adequado ou drenagem de espaços públicos; b) Manipulação: mudanças temporárias que inviabilizam o vetor, como campanhas específicas de eliminação e armazenamento de resíduos sólidos, limpeza dos recipientes de armazenamento de água e utilização de tampas; c) Mudanças estruturais e comportamentais: uso de telas nas portas e janelas ou uso de mosquiteiros. (Benelli *et al.*, 2016; Escobar *et al.*, 2018; Ops, 2019)

Apesar da insistente intervenção e combate à propagação de mosquitos vetores, ainda há elevada ocorrência de arboviroses no Brasil e no mundo. Neste sentido, o desenvolvimento de resistência a inseticidas torna-se uma problemática influente (Achee, 2019), uma vez que o uso recorrente dos compostos disponíveis ao longo de décadas induz pressão seletiva para circulação de alelos de resistência (Ranson *et al.*, 2010; Moyes *et al.*, 2017).

Os primeiros compostos inseticidas foram sintetizados na década de 1940, sendo distribuídos como método de controle de mosquitos no mundo todo, levando ao uso de quantidades cada vez maiores de compostos como carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretroides (Manjarres & Olivero, 2013; Gubler, 2011). A aquisição de resistência de *Ae. aegypti* ao diclorodifeniltricloroetano (DDT) e ao organoclorado dieldrin foi detectada pela primeira vez ainda na década de 1960 (Mouchet, 1972). O expressivo aumento no desenvolvimento de resistência a inseticidas pelo *Ae. aegypti* nos últimos anos é considerado um obstáculo ao sucesso no seu controle (Corbel *et al.*, 2016; Moyes *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2018).

A aquisição de resistência em *Ae. aegypti* está associada principalmente à superexpressão de enzimas de desintoxicação, tendo, portanto, uma base metabólica, ou a mutações em proteínas-alvo, induzindo insensibilidade ao inseticida (Labbé *et al.*, 2011; Haddi *et al.*, 2017; Boyer *et al.*, 2018). O fracasso nos métodos atuais para controle de mosquitos vem estimulando a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de combate (Achee *et al.*, 2019).

O impacto ambiental gerado pelos resíduos de inseticidas é alarmante (Damalas & Eleftherohorinos, 2011), devido aos efeitos negativos estendidos aos organismos não alvo como outros artrópodes, peixes, vertebrados selvagens e até mesmo humanos (Roghelia & Patel, 2017; Desneux *et al.*, 2007). Essa problemática também grave leva ao desequilíbrio dos ecossistemas pelos efeitos adversos contra insetos predadores e polinizadores expostos aos inseticidas (Inocente *et al.*, 2019; Falkowski *et al.*, 2020).

Desta forma, reforça-se a necessidade da busca por métodos para controlar efetivamente as populações de mosquitos vetores, que sejam sustentáveis e ecologicamente compatíveis com o equilíbrio dos biomas, ao mesmo tempo em que diminuam a pressão de seleção sobre os genes de resistência a inseticidas (Sirisopa *et al.*, 2014; Alshehri *et al.*, 2020; Pilaquina *et al.*, 2019).

Vários estudos demonstram que centenas de compostos vegetais possuem papel de defensivo químico de menor potencial tóxico a organismos não-alvo, o que abriu uma nova área de pesquisa conhecida como bioquímica ecológica (Harborne, 2014).

Atualmente o estudo de extratos vegetais tem recebido especial atenção no âmbito da biotecnologia, por representar uma alternativa potencial no desenvolvimento de compostos inseticidas (Siegwart *et al.*, 2015) ao dispor de uma complexa e rica fonte de componentes bioativos e biodegradáveis (Chellappandian *et al.*, 2018; Pratheeba *et al.*, 2019). Diversas pesquisas vêm relacionando a capacidade de compostos vegetais de exercer controle sobre larvas de *Ae. aegypti* (Rahuman *et al.*, 2008; Samarasekera *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Kovendan *et al.*, 2012).

A alta diversidade biológica e complexidade de extratos possibilita variados métodos de ação, sobre diferentes alvos na fisiologia dos insetos, de forma sinérgica, reduzindo a chance de sobrevivência e a probabilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência (Thiyagarajan *et al.*, 2014). Compostos bioativos isolados de plantas, como proteínas e metabólitos, também apresentam comprovada capacidade para aplicação como inseticida sem apresentar relato de resistência adquirida por mosquitos vetores contra fitoquímicos (Senthilkumar *et al.*, 2012), até o presente momento. Apesar de diversos extratos vegetais serem relatados como inseticidas são poucos os compostos isolados bem caracterizados e na maioria das pesquisas o princípio ativo não é determinado (Kannathasan *et al.*, 2011).

1.4. *Clitoria fairchildiana* (R.A. Howard)

A família Leguminosae comporta importantes espécies da flora brasileira de importância alimentícia, farmacológica e de elevado potencial para isolamento de compostos inseticidas, representando a família de plantas lenhosas mais importante e destacando-se nos ecossistemas amazônicos. Espécies do gênero *Clitoria*, inclusas na maior subfamília das Leguminosae (Papilionoideae), foram pouco estudadas quimicamente. (Ducke, 1949; Ducke & Black, 1953; Silva & Parente, 2002; Souza & Lorenzi, 2005; Correia *et al.*, 2007; Shyamkumar & Ishwar, 2012).

Destaca-se aqui a espécie *Clitoria fairchildiana* (R.A. Howard) (Figura 2), planta-alvo do presente estudo, como potencial fonte de biodefensivos uma vez que pesquisas recentes têm demonstrado promissora ação inseticida de compostos extraídos desta espécie (Santos,

2014; Dantzger, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). De suas sementes foram identificadas proteínas com aplicabilidade em novos métodos de combate de artrópodes, como *Tribolium castaneum* e *Callosobruchus maculatus*, os quais sofreram atraso no desenvolvimento larval ou foram mesmo levados à morte quando alimentados com tais moléculas (Bertonceli, 2022b).

Clitoria fairchildiana, popularmente conhecida como sombreiro, faveira ou palheteira é uma espécie arbórea de grande porte, com copa frondosa, flores violáceas em pêndulos e legume deiscente como fruto. Nativa da Amazônia, esta espécie ocorre principalmente em formações secundárias nas florestas ombrófilas densas na Amazônia com preferência por solos úmidos e férteis, mas é recorrente também em áreas ecologicamente alteradas e abertas (Ducke, 1949; Lorenzi, 1992, Costa *et al.*, 2014).

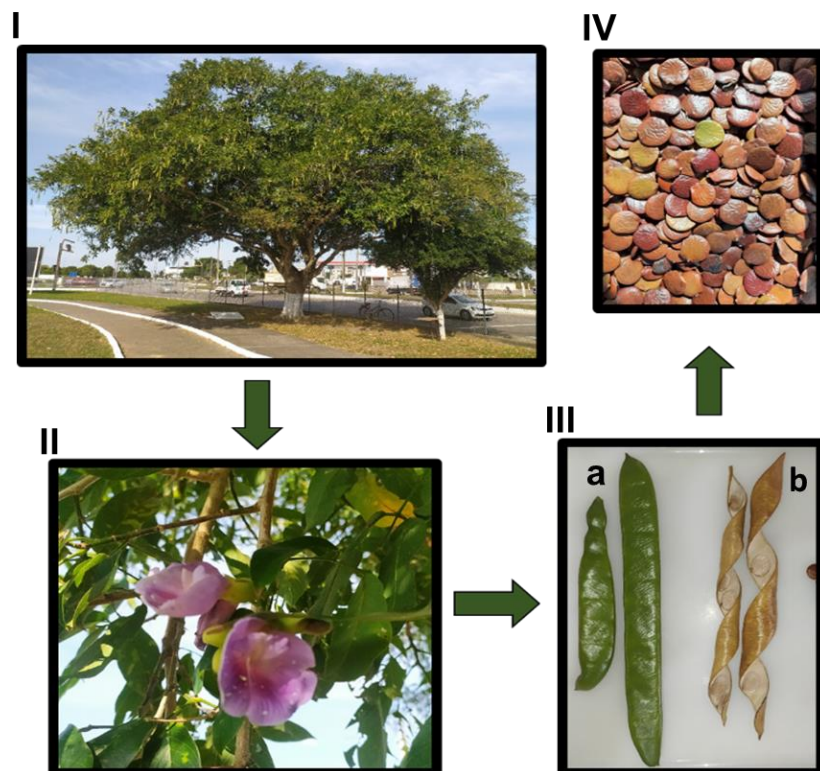


Figura 2: Representação esquemática de diferentes fases do ciclo de vida de *C. fairchildiana*. I - Árvore adulta, II - Flores, III.a - Vagem verde, III.b - Vagem seca, IV - sementes (Arquivo pessoal).

O sombreiro é empregado na construção civil devido à sua madeira de média resistência e moderadamente pesada; na arborização urbana, por possibilitar sombra aliada a características ornamentais; e na recuperação de áreas degradadas e reconstituição da vegetação, uma vez que demonstra rápido crescimento e atua como adubo verde ao ser capaz de nodular e fixar nitrogênio (Paula & Alves, 1997; Carneiro *et al.*, 1998; Portela *et al.*, 2001; Guajará e. al., 2003; Silva & Môro, 2008).

1.5. Defesa Vegetal

No organismo vegetal os produtos oriundos das rotas metabólicas são classificados em metabólitos primários e secundários. O primeiro grupo compreende as substâncias essenciais para realização das funções vitais e constituição do organismo, como as proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos; todas as plantas os produzem (García & Carril, 2009).

Já o metabolismo secundário, ou especializado, dá origem a substâncias geralmente de baixo peso molecular, estrutura química complexa, presentes em baixas concentrações e responsáveis por atividades biológicas variadas nos diferentes grupos de plantas, à exemplo dos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Tais compostos são altamente específicos e correspondem a uma importante característica evolutiva dos vegetais devido à possibilidade de adaptação gerada a partir de suas interações com outros seres vivos (Raskin *et al.*, 2002).

Como são produtoras primárias, as plantas constituem a base da maioria das cadeias alimentares e, sendo sésseis, estão propensas à invasão ou infecção por bactérias, fungos, insetos e herbívoros, sendo assim compelidas a se defender contra uma infinidade de estresses inevitáveis (Shewry & Lucas, 1997; Fernandes *et al.*, 2009; Mithöfer & Boland, 2012).

O desenvolvimento e o crescimento das plantas são constantemente desafiados por diferentes estresses abióticos e bióticos, como seca, frio, salinidade, injúria tecidual, metais pesados e ataques de patógenos e insetos. Por isso as espécies desenvolveram um sistema de defesa complexo para superar tais estresses, contrapondo as diversas forças opostas impostas pelos sistemas naturais. Cada planta responde a essas ameaças ativando certas cascatas de genes, codificando diferentes moléculas efetoras, receptoras, sinalizadoras e protetoras (Ballhorn *et al.*, 2009; Jain & Khurana, 2018).

No contexto de estresse, várias vias de resposta são ativadas, e na sinalização destas vias de resposta existem diversas interconexões. As plantas têm sistemas específicos de reconhecimento e sinalização que permitem a rápida detecção do estresse, como entrada de patógenos ou ataque de insetos, promovendo o início de uma resposta de defesa eficaz. Algumas vias de resposta são induzidas por agentes externos e outras são realizadas independentemente (Kosack & Jones, 1996. Kuśnierczyk *et al.*, 2007).

Os diversos metabólitos expressos nas diferentes espécies vegetais desempenham funções como desenvolvimento de tecidos; crescimento; proteções contra perda de água, raios solares e variação de temperatura do ambiente; atração de polinizadores; inibição de plantas competidoras e defesa contra patógenos, microrganismos e insetos predadores. Desta forma, as atividades biológicas exercidas por tais compostos despertam grande interesse no desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas, alimentares, agronômicas e de inseticidas (Gratão *et al.*, 2016).

1.5.1. Defesa Constitutiva vs. Induzida

Através de sua evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa constitutivos (imutáveis) e induzidos (plásticos) em resposta a ataques. A defesa constitutiva corresponde às características de adaptação que estão constantemente presentes nas plantas, evidenciadas, por exemplo, na presença de tricomas ou espinhos, de parede celular espessa, cutícula cerosa e casca rígida ou outras barreiras físicas eficientes contra o ataque insetos e microrganismos. Por serem mantidas mesmo em plantas não danificadas, essas defesas são consideradas fisiologicamente mais dispendiosas do que as defesas induzidas (Karban & Baldwin, 2007; Agrawal & Karban, 1999; War *et al.*, 2012).

Quando patógenos ou insetos são capazes de violar a primeira linha de defesa, inicia-se a tentativa de destruir o causador de injúrias, a fim de reduzir os danos estruturais para além do local da infecção, e evitando danos nos tecidos. As respostas imunes iniciadas podem ser divididas em imunidade inata e induzida. O sistema inato depende de moléculas pré-existentes nas células e da sua ativação através da percepção de um agente estressor. Já o sistema induzido depende de moléculas sinalizadoras que ativam a resposta de defesa para proteger o organismo vegetal de mais danos causados por estresses bióticos ou abióticos (Penninckx *et al.* 1998; Dodds & Rathjen, 2010; Sanabria *et al.*, 2010).

Uma elaborada rede de sinalização controlada por hormônios ajusta as respostas das plantas de acordo com circunstâncias altamente dinâmicas e heterogêneas do ambiente. A sinalização imunológica, finalidade desta rede abrangente, é então ativada e ajustada pela íntima comunicação molecular entre a planta e o microrganismo ou inseto relacionado. O entrelaçamento da rede imunológica com outras redes internas permite ajustes nas respostas de defesa da planta de acordo com a estratégia de infecção ou infestação do atacante e também de acordo com status internos e externos da planta, como estágio de desenvolvimento e as condições ambientais (Atkinson & Urwin, 2012; Lu *et al.*, 2017). Assim se determinam os hormônios que atuam e quais vias são ativadas para expressar as respostas de defesa apropriadas ao estresse em questão (Berens *et al.*, 2019; Nobori & Tsuda, 2019).

As duas vias de defesa mais estudadas, que são a base da regulação hormonal do sistema imunológico, são as vias reguladas pelo ácido jasmônico (ativada na infecção por patógenos com estilo de vida necrotrófico ou no ataque por insetos mastigadores) e pelo ácido salicílico (relacionada a patógenos de estilo de vida biotrófico) (Wasternack & Song, 2017; Zhang & Li, 2019).

O sistema imunológico vegetal divide-se em duas camadas. Na primeira camada, as plantas são capazes de reconhecer moléculas conservadas derivadas de insetos ou micróbios, chamadas “padrões moleculares associados a micróbios/patógenos” (M/PAMPs) ou “padrões moleculares associados a herbívoros” (HAMPs). Quando ocorre dano causado pelo invasor, pequenas moléculas derivadas da própria planta, chamadas padrões moleculares associados a danos (DAMPs), são liberadas e também são reconhecidas. P/M/HAMPs e DAMPs desencadeiam a sinalização imunológica que resulta na imunidade desencadeada por padrão (PTI), responsável por repelir a maioria dos micróbios e insetos não adaptados (Dangl *et al.*, 2013; Erb & Reymond, 2019).

Patógenos e insetos bem-sucedidos são capazes de secretar efetores para suprimir a sinalização de PTI, gerando suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) com repressão de vias efetivas de hormônios de defesa (Han & Kahmann, 2019). Plantas resistentes reconhecem esses efetores, desencadeando a segunda camada de imunidade, a imunidade desencadeada por efetores (ETI), que geralmente resulta em uma resposta de hipersensibilidade (HR), capaz de deter o patógeno invasor (Cui *et al.*, 2015). Durante as respostas, os hormônios vegetais desencadeiam a reprogramação transcricional regulando fortemente as respostas de defesa, levando à eliminação de micróbios e insetos nocivos e à

acomodação de micróbios e insetos benéficos, que podem ocorrer simultaneamente na planta (Berens *et al.*, 2017).

É importante para a saúde das plantas e a sobrevivência a longo prazo das espécies que as respostas de defesa sejam evolutivamente ajustadas para ativar defesas eficazes e desativar defesas ineficazes, equilibrando-as com respostas a outros estresses (Vos *et al.*, 2015; Butselaar & Ackerveken, 2020).

1.6. Compostos vegetais bioativos

Para sobreviverem, as plantas devem se proteger de várias condições estressantes como poluentes químicos, metais pesados, excesso de raios ultravioleta e outras condições desfavoráveis. Além disso vários patógenos, como nematoides, fungos, vírus e bactérias juntamente com o ataque de insetos afetam a sobrevivência das plantas (Thomma *et al.*, 1998; Castro & Fontes, 2005).

1.6.1. Moléculas de defesa de natureza proteica

As proteínas correspondem a uma classe diversa de moléculas orgânicas que são unidades estruturais e funcionais da célula. A sequência de aminoácidos de cada proteína permite inferências sobre sua estrutura tridimensional e sua função biológica, que pode também depender de sua interação física com outras moléculas.

As células necessitam continuamente de proteínas para manutenção, crescimento, desempenho de importantes reações bioquímicas e comunicações intercelulares, atuando como enzimas, hormônios e citocinas. Um papel importante das proteínas é a defesa contra moléculas estranhas e patógenos.

Nas plantas algumas proteínas de defesa são: lectinas; inibidores de amilases e proteases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIP - Ribosome inactivating protein); tioninas; defensinas; ciclotídeos; toxinas formadoras de poros (PFTs), arcelinas; canatoxina; ureases, dentre outras (Pelegriani & Franco, 2005; Puthoff *et al.*, 2005; Zaugg *et al.*, 2013; Dang & Damme, 2015; Chen *et al.*, 2018; Hellinger & Gruber, 2019; Odintsova *et al.*, 2020).

1.6.2. Metabólitos secundários de defesa

Uma diversidade de metabólitos secundários sintetizados por plantas age na proteção das plantas contra predadores e microrganismos. Alguns destes metabólitos permitem a comunicação da planta com outros organismos e outros protegem as plantas do estresse abiótico, por exemplo, radiações UV-B sendo então significativamente importantes para o crescimento e desenvolvimento (Rosenthal, 1991; Schafer & Wink, 2009).

O desenvolvimento de metabólitos é resultado de milhões de anos de interação da planta com agentes externos. Hoje são conhecidos mais de 100.000 metabólitos envolvidos no sistema de defesa da planta e apesar de serem consideradas mais resistentes as plantas com alta concentração de metabólitos secundários, uma alta produção é considerada energeticamente cara para o crescimento e reprodução das plantas (Simms, 1992; Karban & Baldwin, 2007).

A função e a estrutura dos metabólitos secundários das plantas explicam por que as plantas evoluíram mecanismos de defesa induzida, caracterizados pelo aumento da concentração desses compostos em situações de estresse (Tollrian & Harvell *et al.*, 1999).

São três os tipos principais de metabólitos secundários produzidos por plantas: os terpenos, os compostos contendo nitrogênio ou enxofre e os compostos fenólicos.

Os terpenos são hidrocarbonetos importantes para diversas funções estruturais e a diversos aspectos dos metabolismos secundários e primários das plantas. Eles variam de moléculas pequenas e voláteis (mono e sesquiterpenos) até hormônios (brassinosteróides, giberelinas e ácido abscísico) e componentes celulares estruturais (pigmentos carotenoides) (Kortbeek *et al.*, 2019).

Com mais de 55.000 moléculas descobertas, esta é a maior e mais complexa classe de produtos naturais. São classificados com base em unidades de cinco carbonos (C5) e os diferentes terpenos incluem hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (> C40) (Brock & Dickschat, 2013).

Os terpenos são estudados em seus diversos papéis funcionais, sendo frequentemente relatados como moléculas bioativas em relação aos insetos, seja como compostos voláteis que atuam como repelentes, prevenindo o contato planta-inseto, ou como toxinas para insetos e animais herbívoros (Aharoni *et al.*, 2005). Por exemplo, os piretroides (ésteres de monoterpenos), que naturalmente existem na folhagem das espécies

de crisântemo, demonstram resposta inseticida intensa a uma ampla gama de insetos constituindo, assim, um importante ingrediente nos inseticidas comerciais (Khan *et al.*, 2018).

Os óleos essenciais presentes em muitas espécies vegetais são constituídos por uma mistura complexa de monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (Sharifi-Rad *et al.*, 2017). Além de aroma característico, esses óleos essenciais apresentam um amplo espectro de atividade contra insetos-praga e microrganismos como fungos patogênicos (Singh & Pandey, 2018).

Alguns terpenos agem no sistema nervoso de insetos, que por sua vez corresponde a um alvo fisiológico de ação não compartilhado com os mamíferos atendendo, dessa forma, aos critérios para pesticidas de risco reduzido, sendo considerados de toxicidade relativamente baixa para mamíferos e peixes (Koul *et al.*, 2008).

Sintetizados a partir de metabólitos primários, os terpenos são formados por duas rotas principais de síntese: a rota do ácido mevalônico e a rota do metileritritol fosfato (Brock & Dickschat, 2013; Henry *et al.*, 2018).

Os compostos nitrogenados incluem os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não proteicos. Os alcaloides são encontrados em aproximadamente 20% das espécies vegetais vasculares e são os principais compostos nitrogenados (Pagare *et al.*, 2015).

Nas sementes, os alcaloides representam fontes de nitrogênio para a germinação, além de atuar em funções de defesa (Isah, 2019). A nicotina, alcalóide presente no gênero *Nicotiana* (Solanaceae), compete com o neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso dos insetos, o que permitiu, a partir do estudo da sua estrutura química, sintetizar os inseticidas neonicotinoides, um dos grupos de inseticidas largamente utilizados na agricultura (Dederer *et al.*, 2011).

Os glicosídeos cianogênicos e os glucosinolatos são decompostos liberando ácido cianídrico (HCN) quando a planta sofre algum tipo de dano mecânico por herbivoria (Taiz & Zeiger, 2009).

Os compostos nitrogenados são originados no ciclo do ácido tricarbóxico, a partir de aminoácidos alifáticos, e também no ciclo do ácido chiquímico, a partir de aminoácidos aromáticos (Herbert, 1981; Roberts *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos correspondem a um grupo quimicamente heterogêneo, marcado por substâncias que contêm um grupo fenol (hidroxila funcional em um anel aromático), com aproximadamente 10.000 compostos que podem ser solúveis em solventes orgânicos, outros solúveis em água (ácidos carboxílicos e glicosídeos) ou ainda polímeros insolúveis (Rosa *et al.*, 2019).

A grande diversidade química do grupo se reflete em uma variedade de funções nos vegetais: taninos, antocianinas, lignina, flavonoides, isoflavonoides e outros compostos simples agem, de diferentes maneiras, na defesa contra insetos e patógenos (Özeker, 1999). Compostos fenólicos mais simples participam na interação entre plantas e insetos, microrganismos e outras plantas, como as furanocumarinas e os fenilpropanoides tais como o ácido trans-cinâmico e as lactonas (Taiz & Zeiger, 2009; Najda *et al.*, 2015; Mithöfer & Maffei, 2017; Hosseinzadeh *et al.*, 2019).

Taninos são toxinas que afetam herbívoros e microrganismos devido à sua capacidade de ligação a enzimas digestivas, causando desde sensações agudas de adstringência até inativação da digestão (Pereira *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2016; Solla *et al.*, 2016).

Outro grupo de fenóis importantes são os flavonoides. O grupo pigmentado mais comum dos flavonoides compreende as antocianinas, com importante ação atrativa para polinizadores e dispersores de sementes (Kumar & Pandey, 2013); estes corantes também absorvem o excesso de radiação que chega à planta, minimizando o risco de danos oxidativos e gerando resistência ao estresse luminoso (Agati *et al.*, 2012; Trojak & Skowron, 2017).

A lignina é a substância orgânica mais abundante nas plantas; ela compõe a parede celular de diversos tecidos de condução e suporte, especialmente elementos do xilema (Taiz & Zeiger, 2017). Ao se ligar às proteínas e à celulose, a lignina diminui a digestibilidade dessas substâncias, além de exercer bloqueio ao crescimento de patógenos (Moura *et al.*, 2010).

As substâncias que pertencem ao grupo dos compostos fenólicos em plantas são derivadas da fenilalanina, seguindo a rota do ácido chiquímico (Lin *et al.*, 2016). Tanto o ácido cumárico, quanto seu precursor, o ácido cinâmico, e seus derivados subsequentes são considerados compostos fenólicos simples, denominados fenilpropanoides, como os ácidos cafeicos e cumarinas. Estes são componentes utilizados como base para construção de

compostos mais complexos como flavonoides (flavonas e flavonóis), isoflavonoides (isoflavonas), antocianinas e taninos (Lattanzio *et al.*, 2001; Taiz & Zeiger, 2009).

Os flavonoides são a maior classe de compostos fenólicos vegetais. Plantas pertencentes à família Fabaceae são ricas em flavonoides, porém acumulam também outros metabólitos, como alcaloides, terpenoides e esteroides (Hegnauer & Barkmeijer, 1993; Amen *et al.*, 2015). De modo geral apresentam em sua estrutura várias hidroxilas ligadas a anel aromático, por isso também são denominados de compostos polifenólicos. O esqueleto básico dessa classe, oriundo de rota biossintética mista (ácido chiquímico e ácido malônico), é formado por 15 átomos de carbono dispostos em dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbonos - C6-C3-C6. São aproximadamente 5.000 as estruturas conhecidas de flavonoides, as quais estão agrupadas em oito subclasses, de acordo com o estado oxidativo da cadeia de três carbonos: flavanois, flavandiois, flavanonas, di-hidroflavanois, flavonas, flavonois, antocianidinas e isoflavonoides (Dewick *et al.*, 2009; Sharma & Ramawat, 2013).

O esqueleto base desta classe pode apresentar diversas substituições: grupos hidroxila que normalmente estão nas posições 4, 5 e 7 podem estar presentes em outras posições; a ocorrência de porções açúcares é comum, aumentando a hidrofilia (a maioria dos flavonoides possuem); éter metílico e isopentil modificados são substituintes recorrentes responsáveis por tornar os flavonoides hidrofóbicos. São diversos os tipos de flavonoides e diversas as funções desempenhadas por eles, compreendendo desde pigmentação até defesa (Taiz & Zeiger, 2006).

1.6.3 As subclasses dos flavonoides

A subclasse dos isoflavonoides possui cerca de 1.000 estruturas conhecidas e é encontrada em uma grande variedade de espécies de Papilionoideae, sendo considerada um marcador quimiotaxonômico desta subfamília. Diferentemente de outros flavonoides, os isoflavonoides apresentam o anel B ligado na posição C-3 em vez de C-2, além de sofrer várias modificações estruturais que geram subclasses de isoflavonoides mais simples, como isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanas e isoflavanois, bem como estruturas mais complexas, incluindo rotenoides, pterocarpanos e cumestanos (Dewick *et al.*, 2009; Sharma & Ramawat, 2013).

Apesar das sutis diferenças estruturais, isoflavonoides foram experimentalmente considerados mais ativos do que os flavonoides (Larrea *et al.*; 1997; Rüfer & Kulling, 2006).

Os possíveis substituintes no esqueleto estrutural básico (metoxila, ácidos aromáticos ou alifáticos, prenila, metilenodioxi ou isoprenila), a ocorrência de anéis heterocíclicos extras e os diferentes níveis de oxidação destes compostos explicam a multiplicidade de subgrupos entre os isoflavonoides. Os isoflavonoides também podem ser encontrados como dímeros (Pal *et al.*, 1995; Mbing *et al.*, 2003).

Inicialmente, o estudo dos isoflavonoides tinha por objetivo a compreensão de suas características de marcadores quimiossistemáticos. Porém, à medida que foram melhor compreendidos, suas propriedades bioativas tornaram-se conhecidas, demonstradas por meio das capacidades antifúngicas, inseticidas e antioxidantes, além de suas aplicabilidades descritas na saúde humana, incluindo tratamentos de doenças cardiovasculares, osteoporose e sintomas da menopausa (Fritz *et al.*, 1998; Ishimi *et al.*, 1999; Setchell & Cassidy, 1999; Reynaud *et al.* 2005, Fossen *et al.*, 2006; Amen *et al.*, 2015).

Estruturalmente os isoflavonoides são semelhantes ao hormônio estrogênico animal (testosterona e estradiol). Logo, certos compostos desta subclasse desempenham atividade estrogênica e seu consumo na alimentação humana é então indicado por alguns autores, visando a proteção contra tipos de câncer dependentes de estrogênio, como o de mama (Dewick *et al.*, 2009; Umehara *et al.*, 2009).

Os rotenoides constituem um grupo de substâncias naturais que têm em comum um sistema de quatro anéis (cromanocromanona) como unidade básica estrutural (Figura 3). Tratam-se de substâncias que são formalmente isoflavonoides, possuindo um átomo adicional, o átomo de carbono 6. Todos os rotenoides possuem o esqueleto rotoxen (Crombie, 1984; Crombie & Whiting, 1998).

Rotenoides são uma importante classe de produtos naturais, cuja ocorrência conhecida é confinada à divisão Papilionatae da família Leguminosae (Fabaceae), especialmente às subseções Phaseoleae, Galegeae, Dalbergieae e Genisteeae. São frequentemente isolados de espécies dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus* e incluem uma variedade de compostos naturais estruturalmente relacionados baseados em um esqueleto comum (Gerhäuser *et al.*, 1995; Deyou *et al.*, 2015).

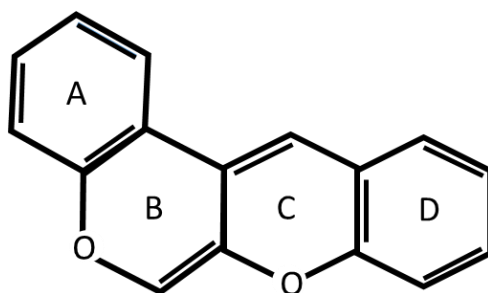


Figura 3: Rotoxen - Esqueleto base da classe dos rotenóides (Acervo pessoal).

Os diferentes rotenoides apresentam uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo ações antibacteriana, antiviral, antifúngica, anticâncer, antiplasmodial, anti-inflamatória e inseticida (Fang & Casida, 1998; Fang & Casida, 1999; Yang *et al.*, 2001; Phrutivorapongkul *et al.*, 2002; Takashima *et al.*, 2002; Yenesew *et al.*, 2003a; Mathias *et al.*, 2005). Como exemplos, a molécula 12a-hidroximunduserona apresenta atividade antitumoral eficiente para proliferação de HepG2 (Wu *et al.*, 2016); tefrosina e deguelina são potentes rotenoides apoptóticos e antiangiogênicos contra várias células cancerígenas humanas, como de pulmão, próstata, cabeça, pescoço e estômago (Luyengi *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012); rotenona e 12a-hidroxirotenona têm efeito inibitório sobre câncer de mama e câncer de pulmão (Cheenpracha *et al.*, 2007; Leuner *et al.*, 2013); tefrosina, miletosina e rotenona também são pesticidas importantes (Puyvelde *et al.*, 1987; Belofsky *et al.*, 2014).

A rotenona foi o primeiro rotenoide isolado, em 1892 (Geoffrey, 1892). A sua estrutura foi determinada em 1932 e em 1961 a sua estereoquímica foi elucidada (Forge *et al.*, 1933; Büchi *et al.*, 1961). As propriedades da rotenona a tornam ideal para uso como inseticida agrícola. É um anel multicarbonado, semelhante a um composto esteroide, e é suscetível à fotodecomposição por luz ultravioleta. Por ser facilmente decomposto pela exposição à luz solar apresenta toxicidade com meia-vida entre 1 e 3 dias e perda completa após 6 dias; além disso, deteriora-se rapidamente no solo e não representa um poluente das águas subterrâneas (Dawson *et al.*, 1991). Atualmente, a rotenona é reconhecida como o pesticida e piscicida mais ambientalmente benigno em todo o mundo (Ling, 2002).

A natureza tóxica da rotenona se deriva de sua alta afinidade com a holoenzima do complexo I das mitocôndrias, resultando na inibição da respiração celular. O complexo I é o

primeiro local de acesso para elétrons na cadeia respiratória, oxida NADH e transfere elétrons para a ubiquinona. A rotenona bloqueia a transferência de elétrons dos aglomerados de ferro-enxofre no complexo I para ubiquinona (Sharma *et al.*, 2009; Wirth *et al.*, 2016).

Além da toxicidade decorrente da diminuição da capacidade de produção de ATP, a degradação da força próton-motriz também contribui para a disfunção celular, uma vez que o gradiente estabelecido pelo complexo I participa da regulação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (poro dependente de cálcio na membrana das mitocôndrias). Logo, a abertura deste poro durante a inibição pela rotenona, leva à disfunção mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, e subsequente morte celular.

Rotenoides inseticidas, como a deguelina, compartilham a capacidade de inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons (Sherer *et al.*, 2007; Lazo *et al.*, 2014). Além disso, os elétrons que vazam pelo complexo I podem reduzir o oxigênio que não foi reduzido no complexo IV a espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido e peróxido de hidrogênio (Sherer *et al.*, 2001).

Nos insetos, a rotenona, além de interromper o metabolismo energético das mitocôndrias, é convertida em metabólitos tóxicos, mas nos mamíferos ela é destoxicada. Ela afeta a atividade da fosforilação de proteínas e outros sistemas enzimáticos (H-ATP-bomba de prótons; ATPase). Sua eficácia deve-se à ação neurotóxica rápida. Além de gerar mortalidade, afeta negativamente a reprodução, fazendo com que os insetos deixem de se alimentar, sendo considerada um agressor estomacal e diminui a absorção de nutrientes pelas larvas e também a capacidade de conversão de alimento em biomassa (Rattan, 2010; Cavoski *et al.*, 2011; Grdiša & Gršić, 2013; Velasques *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Objetiva-se identificar compostos bioativos armazenados em sementes de *Clitoria fairchildiana* que sejam tóxicos a larvas de *Aedes aegypti*, e avaliar os aspectos fisiológicos do inseto afetados por tais compostos.

2.2 Objetivos Específicos

Fracionar biomoléculas de sementes de *C. fairchildiana* com base em sua solubilidade em diferentes solventes;

Submeter as frações obtidas a testes de atividade larvicida sobre *Ae. aegypti*, por incorporação destas na alimentação das larvas;

Determinar, identificar e isolar a molécula mais bioativa componente da fração de toxicidade mais relevante;

Investigar, por técnicas bioquímicas e de microscopia, possíveis alvos fisiológicos de ação do composto bioinseticida sobre *Ae. aegypti*;

Visualizar alterações morfofisiológicas decorrentes da ação do composto tóxico;

Medir os teores corporais de biomoléculas energéticas de larvas crescidas em condições de dietas controle e dietas com incorporação do fitoquímico isolado;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As sementes de *Clitoria fairchildiana* foram coletadas no mês de julho de 2021, do espécime localizado no campus UENF Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes – RJ, nas coordenadas 21°45'47.8"S 41°17'33.8"W. Em seguida, as sementes foram secas em estufa com temperatura constante de 28°C por 48h, descascadas e seus cotilédones triturados até formação de uma fina farinha com auxílio de gral com pistilo.

3.2 Inseto modelo

Os mosquitos *Aedes aegypti* foram utilizados no estágio larval L4, obtidos a partir de uma colônia da linhagem Rockfeller mantida em insetário do Laboratório de Biotecnologia da Uenf, sob temperatura de 27 graus e regime de luminosidade 12h de luz e 12h de escuridão, no LBT-UENF.

Os indivíduos adultos são mantidos em gaiola com recipiente com água para manutenção da umidade ambiente, solução esterilizada de sacarose a 10% para alimentação e, para reprodução, são alimentados com sangue de carneiro para que ocorra a oviposição em papel filtro, inserido na gaiola.

As larvas eclodidas dos ovos dessecados são mantidas em recipientes plásticos medindo 20 x 25 cm, nos quais ocorre periódica limpeza e troca de água. São alimentadas com ração comercial para peixes, mantidas e monitoradas até a coleta para uso em experimentos ou até a transformação em pupa, quando são coletadas e transferidas para gaiolas.

3.3 Extração de biomoléculas das sementes de *Clitoria fairchildiana*

Os cotilédones das sementes secas em estufa e descascadas foram triturados com o auxílio do Moinho de Facas SL-30 SOLAB, e posteriormente a farinha passou por trituração por meio de gral com pistilo de porcelana, a fim de obter-se uma farinha de baixa granulometria, que foi peneirada em malha de 48 mesh.

A farinha de cotilédones passou pelo processo de extração sequencial com seis diferentes solventes para obtenção de diferentes grupos proteicos de acordo com suas solubilidades (Luo *et al.*, 2014). Após cada etapa de extração, a solução foi submetida a centrifugação por 10 minutos na rotação de 10.000g em temperatura de 4°C, para separação entre precipitado e sobrenadante.

A primeira etapa de extração se deu com água destilada como solvente, na razão de 1:10 (massa semente/volume solvente). Mantida a solução sob agitação por 30 minutos prosseguiu-se para a centrifugação e repetindo este procedimento com o sedimento obtido foram extraídas as proteínas albuminas, nomeadas Fração 1 (F1).

Sequencialmente, o sedimento passou por extração em solução NaCl 0,5M durante 60 min sob agitação resultando, após centrifugação, na obtenção da solução contendo as proteínas globulinas (Fração 2 [F2]). A extração sequencial com 2-propanol a 60% (v / v) durante 4 h resultou nas kafirinas; Fração 3(F3). A Fração 4 (F4), glutelinas, foi extraída em tampão borato 0,1 M, pH 10,8, durante 4h de agitação. As kafirinas com ligações cruzadas (Fração 5 [F5]) foram obtidas na solução 2-propanol a 60% com 1% de β -mercaptoetanol durante 4h. Por fim a Fração 6 (F6), glutelinas com ligações cruzadas, foi resultado da extração durante 18h em solução tampão borato 0,1 M, pH 10,8, contendo 1% de β -mercaptoetanol e 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS).

As frações, exceto F1, foram dialisadas em água destilada com membrana para diálise de celulose (Dialysis Tubing, Benzoylated, D2272, SIGMA) para separar compostos com peso molecular menor ou igual a 1.200 Daltons de compostos com peso molecular maior que 2.000 Daltons. O procedimento foi repetido quatro vezes em recipiente de 5 litros. Essas frações foram então liofilizadas até a sublimação total de líquidos e o pó obtido foi armazenado sob refrigeração em -20°C.

3.4 Dosagem de proteínas

A inferência da concentração proteica nas amostras foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA), descrito por Smith *et al.* (1985), utilizando solução com albumina isolada do ovo como proteína de referência, para estabelecimento de uma curva padrão associando concentração e leituras de absorbância a 540nm.

As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro modelo Thermo Plate – TP Reader, a 540nm.

3.5 Incorporação das frações na dieta de *Aedes aegypti*

A alimentação artificial dos insetos foi realizada por meio da incorporação de diferentes concentrações dos pós correspondentes às frações nas soluções aquosas em que são mantidas as larvas. Larvas de quarto estágio foram transferidas para recipientes contendo as soluções com as concentrações a serem testadas, a partir do tratamento de menor concentração, utilizando-se três réplicas por tratamento mais controle. Após 24h de exposição (28°C; 12 luz/12 escuro) a mortalidade larval é registrada, acompanhando o número de larvas sobreviventes ao longo do tempo, de acordo com o protocolo estabelecido pela WHO (2005).

3.6 Isolamento das biomoléculas inseticidas de *C. fairchildiana* por cromatografia líquida de exclusão molecular

Dentre as frações analisadas ao longo do estudo aquela que demonstrou maior toxicidade ao inseto foi selecionada para etapas futuras de separação e testes de toxicidade.

Realizou-se a cromatografia de exclusão molecular com uso das resinas Sephadex® G-50 e Sephadex® G-25, como meios de filtração em gel para separação de biomoléculas com diferentes massas moleculares. Foi utilizada um volume de 100cm³ de resina G-50 em coluna com 55cm de altura e diâmetro de 1,7cm e uma coluna de 30 cm de altura e diâmetro de 1cm preenchida com 20cm³ de resina G-25. A fase móvel para ambas foi água destilada. O perfil de separação das moléculas ocorre entre 30.000 e 1.500 altons na G-50 e entre 5.000 e 1.000 Daltons na G-25.

A aplicação da amostra foi de 40mg de pó solubilizado em 1ml de água destilada na coluna com resina G-50 e 3mg de pó solubilizado em 0,5ml de água destilada na coluna com resina G-25. Com auxílio de bomba peristáltica foi mantido um fluxo de 0,9 ml/min na coluna G-50 e 0,7 ml/min na coluna G-25 e com aparelho coletor de frações Fraction Collector FC 204 GILSON® foram coletados 900 µl por tubo de ensaio nas cromatografias com resina G-50 e 700 µl por tubo com G-25. O conteúdo coletado em cada um foi submetido a leituras de

absorbância, em espectrofotômetro UV mini 1240 SHIMADZU®, em comprimento de onda de 280nm.

Os valores da leitura de cada tubo foram tabelados e plotados em gráfico para discriminação dos picos de separação das moléculas.

3.7 Isolamento de biomoléculas por Cromatografia líquida em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Para a confecção da placa de cromatografia de camada delgada preparativa foi realizada uma mistura contendo 50ml de água destilada e 15g de sílica em gesso (SílicaGel 60G – F254 para cromatografia em camada fina da marca Vetec). As placas foram confeccionadas sobre vidro de 20 cm x 20 cm, mantidas por 24 horas à temperatura ambiente para o processo de secagem e em seguida foram colocadas em uma estufa a 100°C por 2 horas para o processo de ativação.

Para aplicação, as amostras foram diluídas em diclorometano e em seguida aplicadas à CCDP, formando uma linha distante 2cm da borda inferior. Foi demarcada uma fração latitudinal distante 2 cm da borda direita para ser revelada por meio de aquecimento utilizando solução de vanilina sulfúrica. A fase móvel utilizada foi composta por diclorometano:metanol (98:02). Após o processo de eluição e visualização, por exposição à luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm e por revelação com vanilina, as bandas de interesse foram demarcadas, raspadas da placa e solubilizadas em diclorometanol por 15 minutos em banho ultrassônico. As amostras obtidas foram então filtradas, a extração foi repetida três vezes para prosseguir com a secagem do material por evaporação dos solventes.

3.8 Visualização das biomoléculas por Cromatografia líquida em Camada Delgada Analítica (CCDA)

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para visualização dos metabólitos secundários existentes na amostra. Foram utilizadas cromatofolhas de fase normal de gel de sílica (TLC sílica gel 60 F254 aluminium sheets, MERCK®), cortadas com 5cm de altura e largura proporcional ao número de amostras aplicadas. As amostras foram solubilizadas em diclorometano e aplicadas na base inferior com espaçamento de 0,5 cm entre as

amostras e extremidades horizontais, e 1 cm das extremidades verticais. Após saturação da cuba com solução de diclorometano:metanol (98:02), as placas foram inseridas para eluição dos compostos por meio da fase móvel.

Ao final da corrida foi realizada a visualização das bandas por meio da exposição à luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254nm e 365nm e utilizando solução de vanilina sulfúrica e posterior aquecimento da placa como método de revelação térmica.

3.9 Visualização das proteínas por eletroforese

As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970) e à eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE (Schägger & Von Jagow, 1987). O gel utilizado é composto primeiramente por uma fase concentradora (SDS – PAGE a 12% e Tricina a 4% T [T = acrilamida e bis-acrilamida]; 3% C [C = bis-acrilamida em relação ao total]) seguida de uma fase separadora (SDS – PAGE a 6% e Tricina a 16,5% T; 3% C)

O tampão composto por glicerol 12%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 1%, Tris-HCL 50 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 1% foi misturado à amostra a ser analisada, na proporção de 1:4 (razão v/v); a solução da amostra foi fervida por 7 minutos e então aplicada nas raias do gel. Proteínas comerciais de pesos moleculares conhecidos foram usadas em raia de referência e nos poços vazios adicionou-se tampão de amostra.

A corrida eletroforética ocorreu no sistema Mini-Protean Tetra Cell, marca BIO-RAD®. Os géis SDS – PAGE foram submetidos à tensão inicial de 80v até que a amostra atingisse o gel separador, quando a tensão foi então elevada para 100v até o final da corrida. O tampão de corrida foi Tris 250mM, glicina pH 8,3 2,5M, SDS 1%. Os géis Tricina SDS – PAGE foram submetidos à tensão inicial de 20v até que a amostra atingisse o gel separador, quando a tensão foi então elevada para 40v até o final da corrida. Utilizaram-se dois tampões de corrida: Anodo (Tris 0,2M, pH 8,9) e Catodo (Tris 0,1M, Tricina 0,1M, SDS 0,1%).

Após as corridas, os géis foram mantidos em solução fixadora (metanol 40%, ácido acético 10% e água 50%) e depois coradas com Coomassie Brilliant Blue ou revelados pelo método de precipitação por prata. Para visualização final das bandas proteicas, os géis corados com Coomassie foram descolorados com solução metanol 40%, ácido acético 20% e água 40%.

3.10 Caracterização dos efeitos fisiológicos dos compostos-teste sobre *Ae. aegypti*

3.10.1 Quantificação de biomoléculas energéticas e da atividade enzimática de lipase nas larvas de *Ae. aegypti*

Larvas desenvolvidas em condição controle (água destilada) e em condições de tratamento com os compostos analisados (rotenoide isolado [11-desoxiclitoriactal] para larvas teste e rotenona comercial para controle positivo, na concentração CL₅₀ [Concentração Letal a 50% das larvas]) foram submetidas a análises dos teores corporais de alguns grupos de biomoléculas. A extração foi realizada por meio da maceração mecânica das larvas com auxílio de pistilo em microtubo eppendorf em solução de cloreto de sódio 0,15M (1 mg/15 µL) com posterior agitação durante 30 min a 4 °C, seguida de centrifugação a 5.000g, sendo o sobrenadante utilizado para as dosagens de glicose, proteínas e lipases.

Outro grupo de larvas passou por um processo de extração com solução 0,5% de tween 20 (10mg/15µL), sob agitação por 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido após centrifugação foi usado para dosagens de triacilgliceróis e colesterol.

Todos estes ensaios foram realizados em placa de 96 poços e em triplicata experimental.

Para quantificação das proteínas foi utilizado o método de BCA de acordo com Smith *et al.* (1985). O extrato larval (10 µL) foi pipetado nos poços, foram adicionados 200 µL de solução sulfato de cobre e BCA (2 mL de BCA para 0,04 mL de sulfato de cobre). A placa foi incubada a 37 °C durante 30 min e as absorbâncias foram lidas a 540 nm. Uma curva de ovalbumina (Sigma Aldrich), com concentrações entre 0,2 e 1 µg/µL foi utilizada como padrão para calcular a concentração de proteína das amostras.

Para quantificação da glicose foi utilizado o kit Glicose Monoreagente seguindo o manual do fabricante (BioClin). Ao extrato larval (2 µL) foram adicionados 200 µL do reagente enzimático (contendo tampão, fenol, 4-aminoantipirina, glicose oxidase, peroxidase, estabilizante, surfactante e conservante). Ao reagente nº 2 - padrão (2 µL), constituído de glicose (100 mg/dL) e conservante, também foram adicionados 200 µL do reagente enzimático. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 10 min. As

absorbâncias foram lidas em 492 nm. A quantidade de glicose das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit.

O kit Triglicérides Monoreagente da Bioclin foi utilizado para dosagem destas biomoléculas, seguindo manual do fabricante (BioClin). Ao extrato larval (2 µL) foram adicionados 200 µL do reagente enzimático (4-clorofenol, lipase lipoproteica, glicerol kinase, peroxidase, glicerol-3-fosfato oxidase, 4-aminoantipirina, ATP, ativador, estabilizante, surfactante e conservante). Ao reagente nº 2-padrão (2 µL) (triglicérides (100 mg/dL) e diluente triglicérido) também foram adicionados 200 µL do reagente enzimático. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C durante 10 min. As absorbâncias foram lidas em 500nm. A quantidade de triglicéridos das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit.

Para quantificação do colesterol foi utilizado o kit Colesterol Monoreagente, seguindo o manual do fabricante (BioClin). Ao extrato larval (2 µL) foram adicionados 200 µL do reagente enzimático (contendo tampão, fenol, 4-aminoantipirina, colesterol oxidase, lipoproteína lipase, peroxidase, quelante, estabilizante, surfactante e conservante). Ao reagente nº 2 - padrão (2 µL), constituído de colesterol (200 mg/dL) e conservante, também foram adicionados 200 µL do reagente enzimático. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 10 min. As absorbâncias foram lidas em 500 nm. A quantidade de colesterol das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit.

A determinação da atividade de lipase se deu por meio do kit Lipase Monoreagente da Bioclin, seguindo as instruções de uso do fabricante. Ao extrato larval (5 µL) foram adicionados 100 µL de tampão (Tris 100 mM, pH 8,5), 5 µL de inibidor enzimático (fenilmetilsulfonil fluoreto - PMSF - e solubilizante) e 10 µL de reagente de cor (DTNB, acetato de sódio e estabilizador). Para cada amostra havia um controle, onde não havia inibidor enzimático. As amostras foram incubadas durante 2 min a 37°C. O volume de 10 µL de substrato foi adicionado às amostras e 10 µL de tampão salina (solução de cloreto de sódio 0,15 M) foram adicionados aos controles. Estas amostras foram incubadas durante 30 min a 37°C. A reação foi interrompida com 200 µL de acetona. As amostras foram homogeneizadas, mantidas sob repouso por 5 min e centrifugadas a 2.000 x g durante 5 min. As absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas em 405 nm. A atividade de lipase das amostras foi calculada a partir da fórmula fornecida pelo kit.

3.10.2 Microscopia de fluorescência para análises de compartimentos acidificados

Larvas de *Ae. aegypti* de quarto estágio foram divididas em grupos controle, em água destilada e teste, tratado com CL_{50} do rotenoide 11-Desoxiclitoriactal, mantidos a 28°C por 24h, sob fotoperíodo de 12/12h. Em seguida as larvas foram lavadas e inseridas em solução de dicloridrato de quinacrina 10mM (Sigma Aldrich-Q3251) durante 2h no escuro. Por fim, as larvas vivas foram lavadas e transferidas para lâminas de vidro e a marcação pelo corante foi observada por microscopia de fluorescência com emissão no comprimento de onda de 465nm com intensidade da luz em 35% (2,61 volts) e filtro verde (Axioplan-Carl Zeiss).

Para quantificação dos níveis de intensidade de emissão foi empregado o software de processamento e análise de imagens digitais ImageJ (v1.53t). Foram selecionadas três larvas controle e três larvas teste, e nestas a intensidade de fluorescência foi mensurada nas regiões do ceco gástrico, intestino médio e intestino posterior (nos segmentos dois, cinco e oito) (Figura 4) por meio da seleção de uma área circular igual nas réplicas (902520). Os dados foram plotados e analisados quanto à significância da variação (Bertonceli, 2022a).

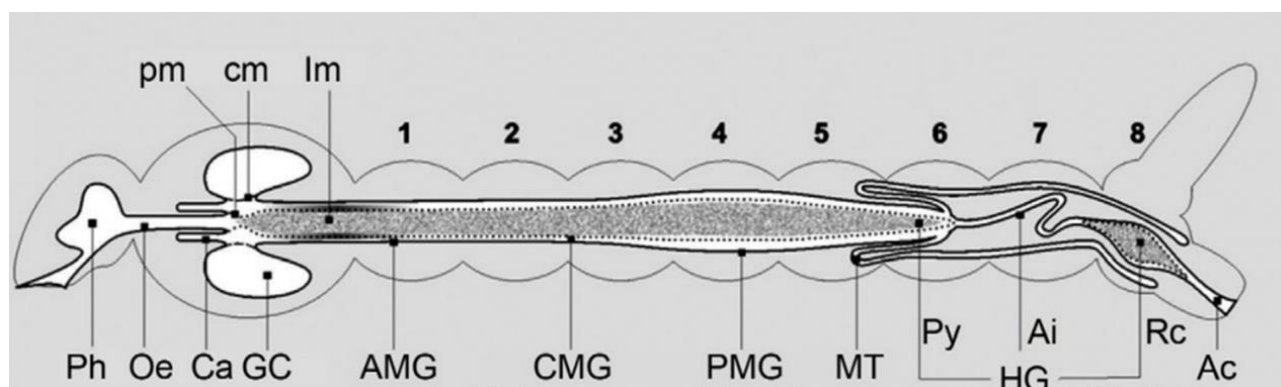


Figura 4: Esquema canal alimentar de larvas de *Ae. aegypti*. Os números de 1 a 8 indicam os segmentos abdominais. GC, ceco gástrico; AMG, intestino médio anterior; CMG, intestino médio central; PMG, intestino médio posterior; MT, túbulos de Malpighi; HG, intestino posterior; Py, piloris; Ai, intestino anterior; Rc, reto; Ac, canal anal; Ph, faringe; Oe, esôfago; Ca, cárdia; pm, membrana peritrófica; cm, membrana cecal; lm, lúmen intestinal. (Fonte: Linser & Dinglasan, 2014).

3.10.3 Análises de espécies reativas de oxigênio (ROS) por microscopia de fluorescência

Larvas de quarto estágio foram divididas em grupo controle negativo, mantidas em água destilada, e grupo tratado com concentração equivalente a CL_{50} durante 24h (28°C, 12 escuro/12 luz). Posteriormente, as larvas vivas foram lavadas com água ultrapura e então transferidas a solução de água destilada a qual foi adicionado o marcador de ROS, o 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (Sigma Aldrich - D6883) a 10 μ M. As larvas ficaram por 2 h nessa solução, no escuro. Finalmente, as larvas foram lavadas e transferidas para lâminas e a fluorescência foi observada por meio do microscópio Axioplan-Carl Zeiss, em um comprimento de onda de excitação de 465nm com um filtro verde (Wahab *et al* 2021).

3.10.4 Elucidação estrutural da substância isolada

A caracterização molecular do metabólito se deu por meio do espectrômetro Brücker, modelo Ascend500, operando a 500 MHz para RMN 1H e a 125 MHz para RMN 13C, com a amostra solubilizada em clorofórmio deuterado - $CDCl_3$. Usou-se o padrão interno Tetrametilsilano (TMS), e foram obtidos os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) contendo deslocamentos químicos (δ) em parte por milhão (ppm), bem como as constantes de acoplamento (J), medidas em Hertz (Hz). Os espectros analisados foram provenientes de técnicas de RMN uni (1H e 13C) e bidimensional (1H-1H-COSY, 1H-1H-NOESY, HSQC e HMBC), o que permite a elucidação estrutural.

3.11 Tratamento de dados e análises estatísticas

Os dados obtidos na caracterização da ação proteica sobre os insetos, como taxa de sobrevivência do inseto, variação da composição corporal e variação da ação enzimática, foram submetidos a análises estatísticas por meio do programa GraphPad Prism 6 definindo a significância da ação biológica.

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Tukey, realizados para determinar diferenças entre tratamentos e concentrações. Apenas valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

A concentração letal responsável pela morte de 50 % dos indivíduos (CL_{50}) foi obtida por meio de regressão não linear (log inibitor vs. normalized response -- Variable slope).

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento de compostos inseticidas das sementes de *Clitoria fairchildiana*

A farinha obtida dos cotilédones de sementes de *C. fairchildiana* foi inicialmente submetida a fracionamento proteico, segundo suas propriedades de solubilidade em diferentes solventes. Foram obtidas seis frações de biomoléculas (denominadas F1 até F6), que correspondem às classes de albuminas - F1, globulinas - F2, kafirinas - F3, glutelinas - F4, kafirinas com ligações cruzadas - F5, glutelinas com ligações cruzadas - F6, em fase líquida (Figura 5).

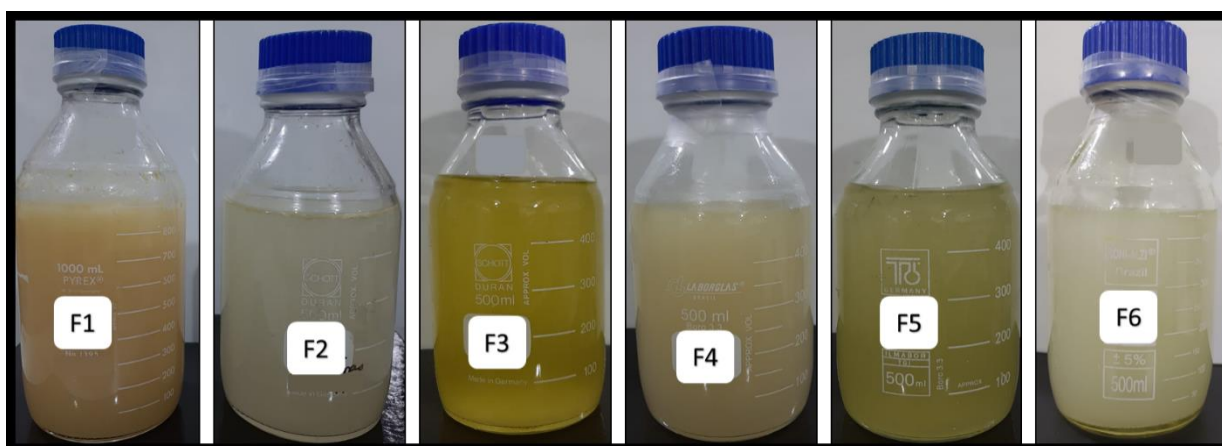


Figura 5: Frações proteicas das sementes de *C. fairchildiana*, com base na solubilidade dos solventes água (F1), NaCl 0,15 M (F2), 2-propanol a 60% (v/v) (F3), Borato 0,1 M, pH 10,8 (F4), 2-propanol a 60% + 1% de β -mercaptoetanol (F5), Borato 0,1 M, pH 10,8 + 1% de β -mercaptoetanol + 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) (F6).

Ao longo de todo o processo de isolamento de compostos-alvo, as frações e amostras obtidas foram sempre verificadas em sua potencialidade de controle ao inseto *Ae. aegypti*. Neste sentido, as seis frações foram submetidas a bioensaios de atividade inseticida, e portanto incorporadas em meio de crescimento das larvas do inseto, a fim de demonstrar a capacidade tóxica à sobrevivência do mesmo. As frações foram usadas nas concentrações de 500, 250, 125 e 62 $\mu\text{g/ml}$, utilizando a dosagem proteica como referencial, e

acompanhando visualmente o processo nos tempos de 1, 16, 20, 24 e 40 horas após o início do teste, quando as larvas sobreviventes eram contadas a cada um desses momentos.

Os dados de sobrevivência larval obtidos para cada fração foram expressos graficamente, em porcentagem, de acordo com cada concentração nos diferentes tempos (Figura 6).

Dentre as frações analisadas, F2 e F6 não demonstraram nenhuma atividade inseticida, mesmo após um longo tempo de exposição (40h). As frações F4 e F5 apresentaram baixa toxicidade, com nenhuma variação significativa na sobrevivência em todas as concentrações em F5, e variação significativa apenas nas duas maiores concentrações no maior tempo observado em F4. As frações F1 e F3 demonstraram as mais altas atividades inseticidas: F1, em 16h, já havia acarretado a morte total das larvas nas duas maiores concentrações e variação significativa em 125 µg/ml, chegando a um patamar de ação praticamente mantido até o final do bioensaio; enquanto F3 demonstrou ação inicial brusca com redução significativa da sobrevivência já em 16h (à exceção da concentração 62 µg/ml) e mortalidade de pelo menos 50% em todas as concentrações após 24h.

No prosseguimento da investigação foi escolhida a F1, obtida em água, para posterior identificação de seu componente bioativo. Esta fração foi submetida à eletroforese para visualização das proteínas (Figura 7A) e à CCDA para visualização de metabólitos especiais existentes (Figura 7B).

Seguiu-se o processo de particionamento posterior da fração de interesse, F1, através de sua percolação por uma resina Sephadex G-50, para separação de seus componentes de acordo com seu peso molecular. Essa análise cromatográfica mostrou a formação de três grupos proteicos (picos) denominados P1, P2 e P3 (Figura 8).

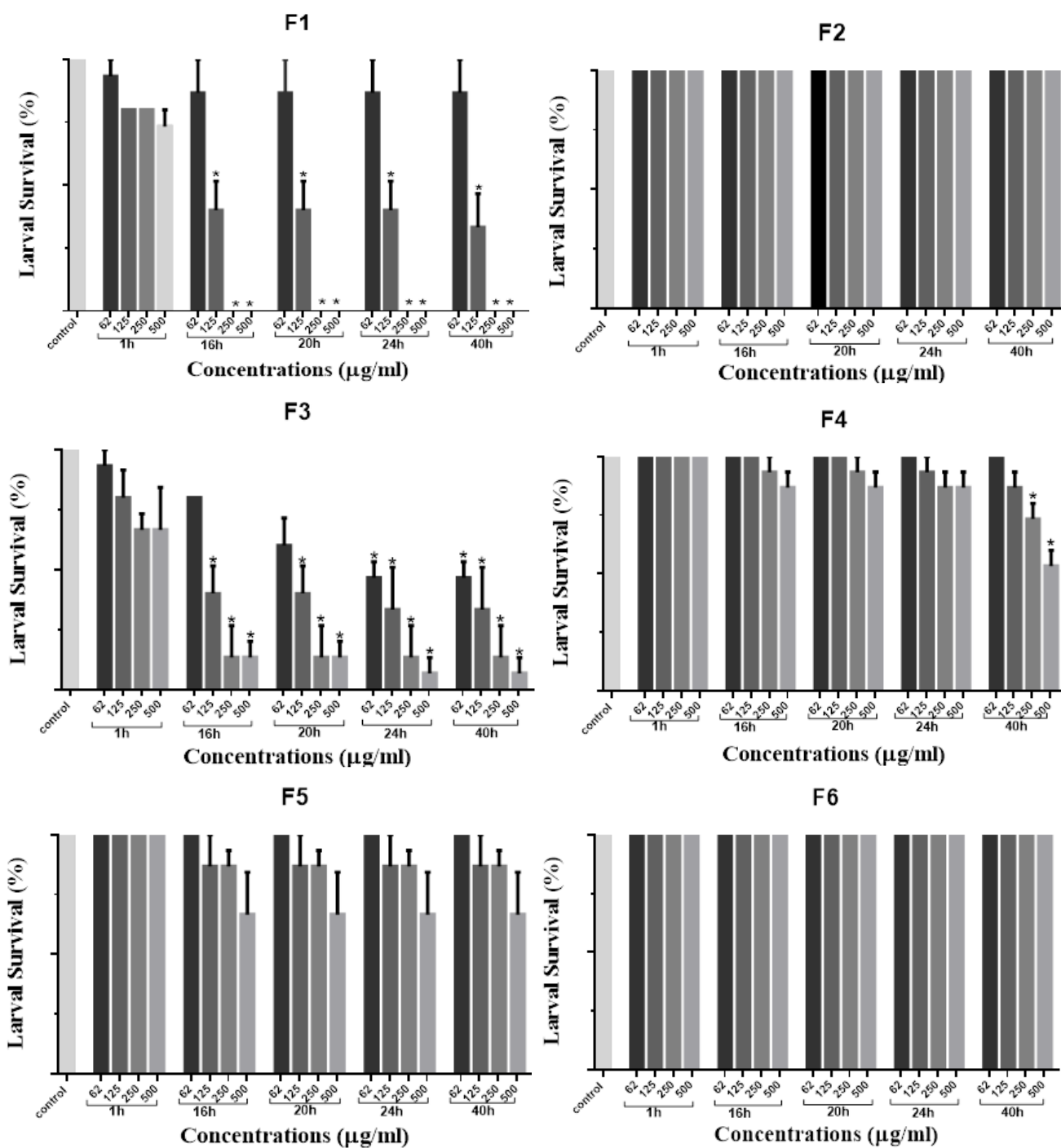


Figura 6: Sobrevivência das larvas de quarto estágio de *Ae. aegypti* em bioensaio com diferentes concentrações das frações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 de *C. fairchildiana*, ao longo de 40 horas. Controle em água destilada. Concentrações testadas: 62, 125, 250 e 500 µg/ml ou ppm). Dados coletados nos diferentes tempos de observação: 1, 16, 20, 24 e 40 horas. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). O desvio padrão é representado sobre cada barra.

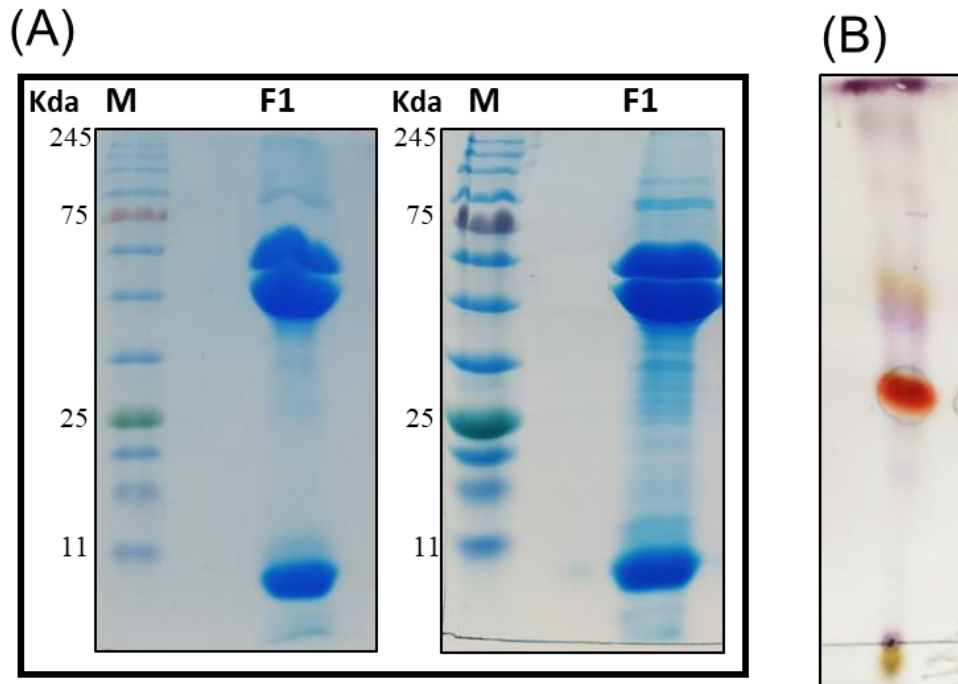


Figura 7: Visualização eletroforética do perfil proteico da Fração 1 do cotilédone de *C. fairchildiana* em gel a 12% SDS-PAGE, corado com Coomassie Brilliant Blue (A); M - marcadores de massa molecular de 245 a 11 kDa; (B) Cromatografia em camada delgada da Fração 1, em placas de sílica reveladas com vanilina sulfúrica e aquecimento.

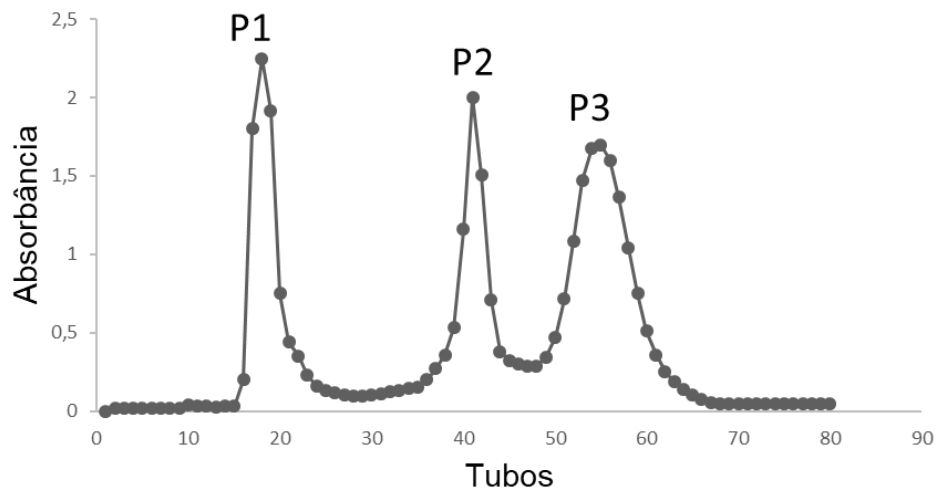


Figura 8: Cromatografia de F1 em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50. Coleta de 900 μ L por tubo.

Estes picos (P1, P2 e P3), após liofilizados e dosados quanto ao porcentual proteico, foram testados em bioensaios de atividade larvicida, a fim de determinar em qual grupo estariam presentes os bioativos de interesse (Figura 9). Dentre os picos analisados, P1 e P2 não demonstraram nenhuma atividade larvicida. O pico P3 apresentou toxicidade no tempo mínimo analisado, de três horas, capaz de eliminar 100% das larvas, na concentração mais baixa testada de 60 ppm (Figura 9).

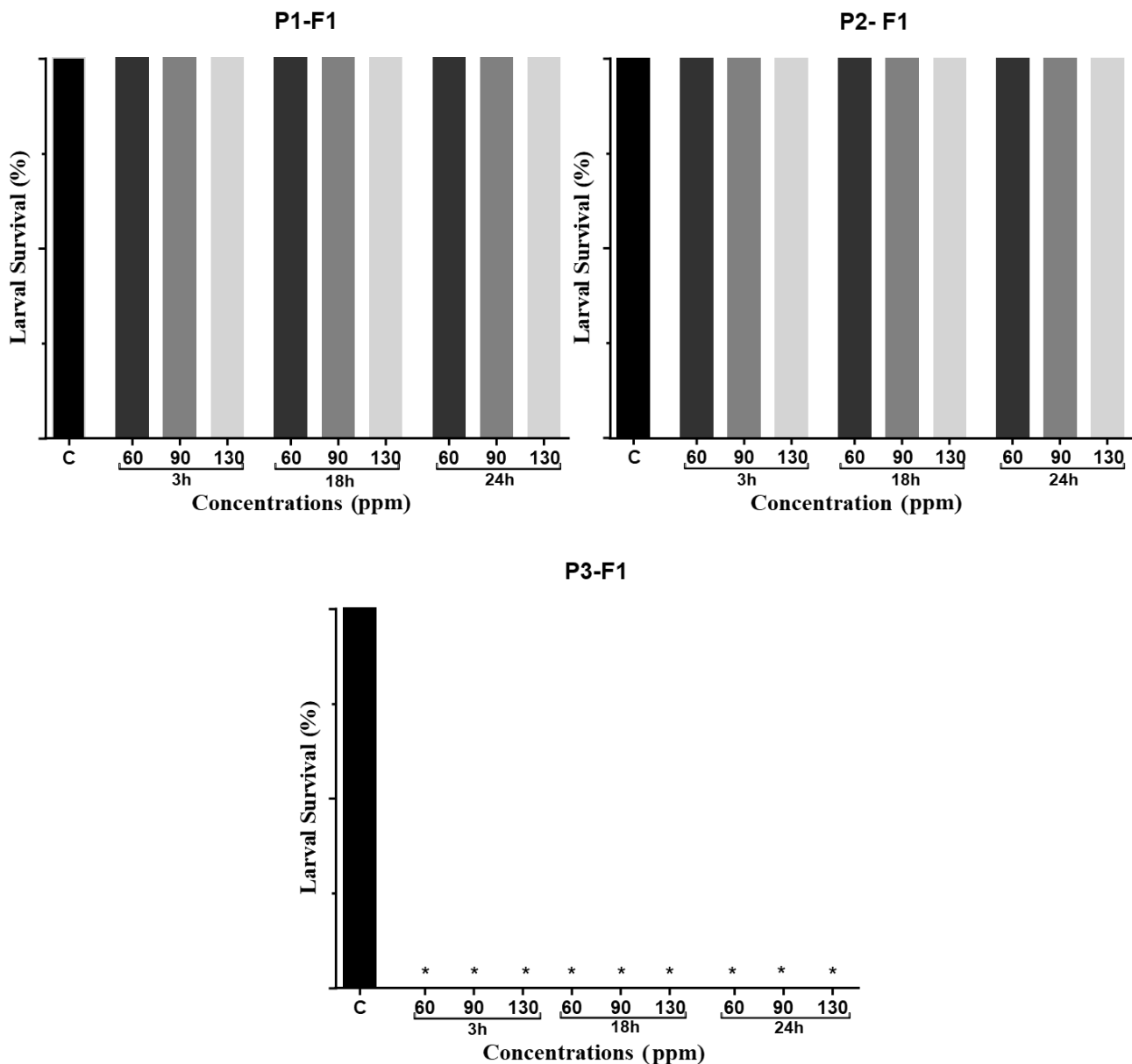


Figura 9: Sobrevivência das larvas de quarto estágio de *A. aegypt* em presença de diferentes concentrações dos picos P1, P2 e P3, ao longo de 24 horas de ensaio. Controle em água destilada. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). As barras representam o desvio padrão

A partir destes dados foi possível determinar que o grupo de interesse é o P3, uma vez que foi o único grupo capaz de exercer atividade inseticida. Este pico foi então analisado quanto aos seus componentes proteicos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figuras 10A, 10B e 10C), e metabólitos secundários, por meio de CCDA (Figuras 11A e 11B).

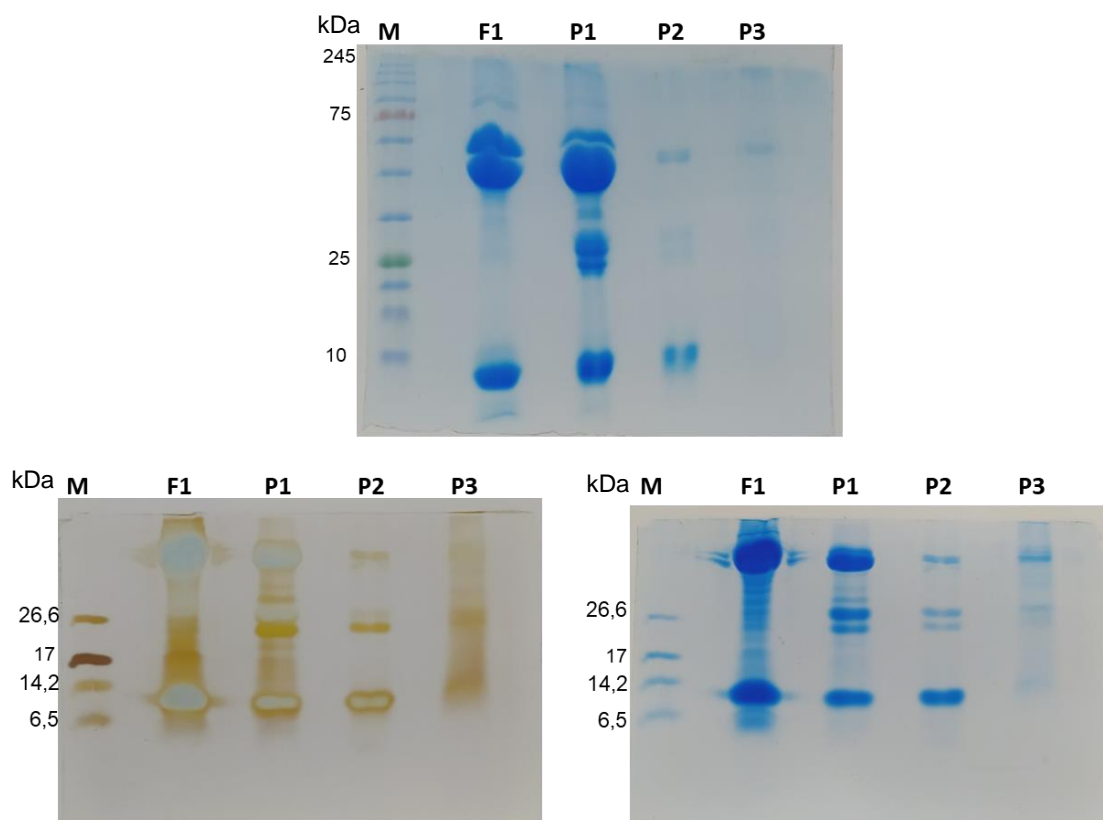


Figura 10: Visualização eletroforética do perfil proteico da Fração 1 e os picos de Sephadex G-50 P1, P2 e P3, em gel a 12% SDS-PAGE (A), em gel Tricina SDS-PAGE, corado com Coomassie Brilliant Blue (B) e gel Tricina SDS-PAGE revelado com nitrato de prata (C); M - marcadores de massa molecular de 245 a 11 kDa.

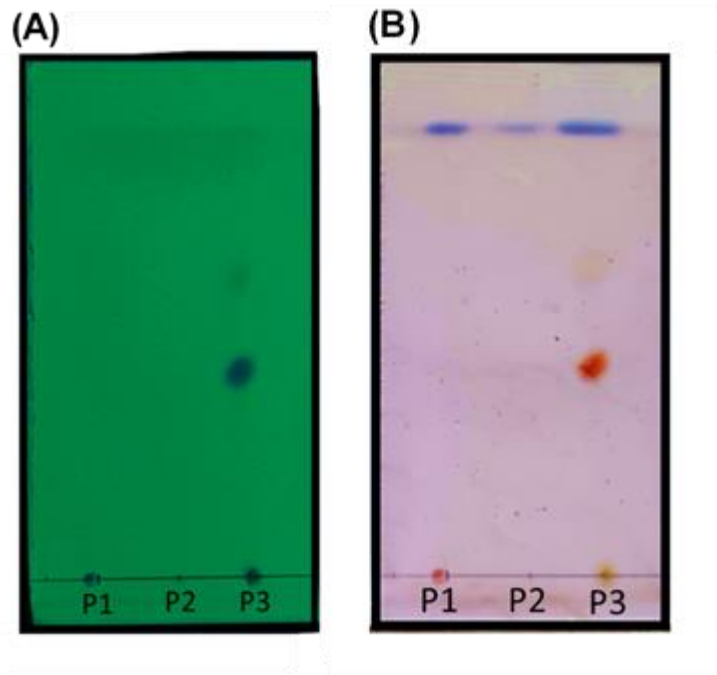


Figura 11: Cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários existentes nos grupos P1, P2 e P3, em cromatofolha de sílica A) visualizado em luz UV 254nm e B) revelada com vanilina sulfúrica.

A atual fração de maior interesse, P3, teve, então, seus componentes separados de acordo com seu peso molecular em coluna Sephadex G-25 (Figura 12). Na cromatografia formaram-se três novos agrupamentos proteicos, denominados PA, PB e PC. A partir de novos bioensaios para avaliação da toxicidade larval desses PA, PB e PC, foi possível determinar que o grupo de interesse é o PC, uma vez que foi o único grupo capaz de exercer atividade inseticida, eliminando 100% das larvas na concentração de 60 µg/ml no primeiro tempo analisado, de três horas (dados não mostrados).

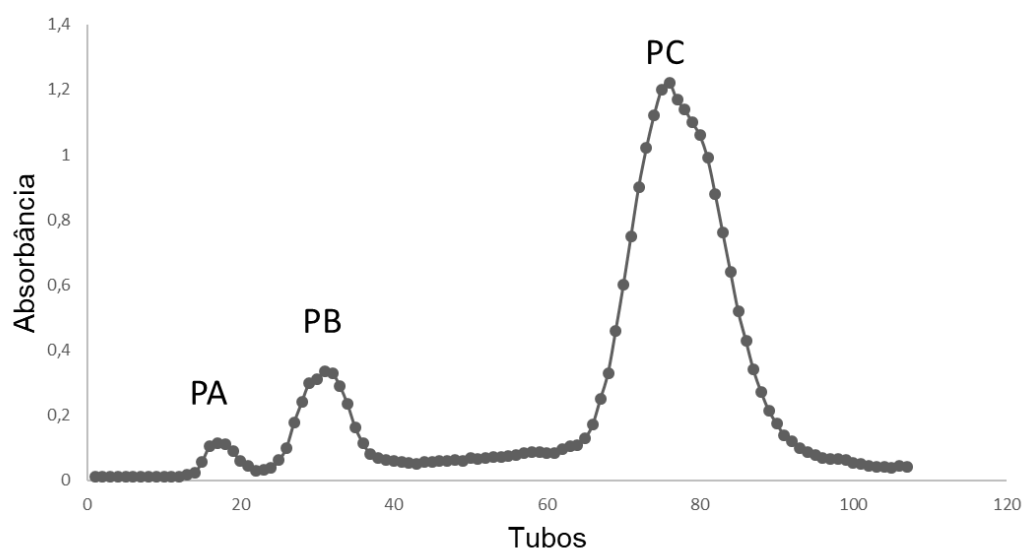


Figura 12: Cromatografia de P3 em coluna de exclusão molecular Sephadex G-25. PA, PB e PC são os grupos coletados, discriminados pela leitura em espectrofotômetro a 280nm com lâmpada D2.

Este pico PC foi então analisado quanto aos seus componentes proteicos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 13A) e metabólitos secundários por meio de CCDA (Figuras 13B1 e 13B2).

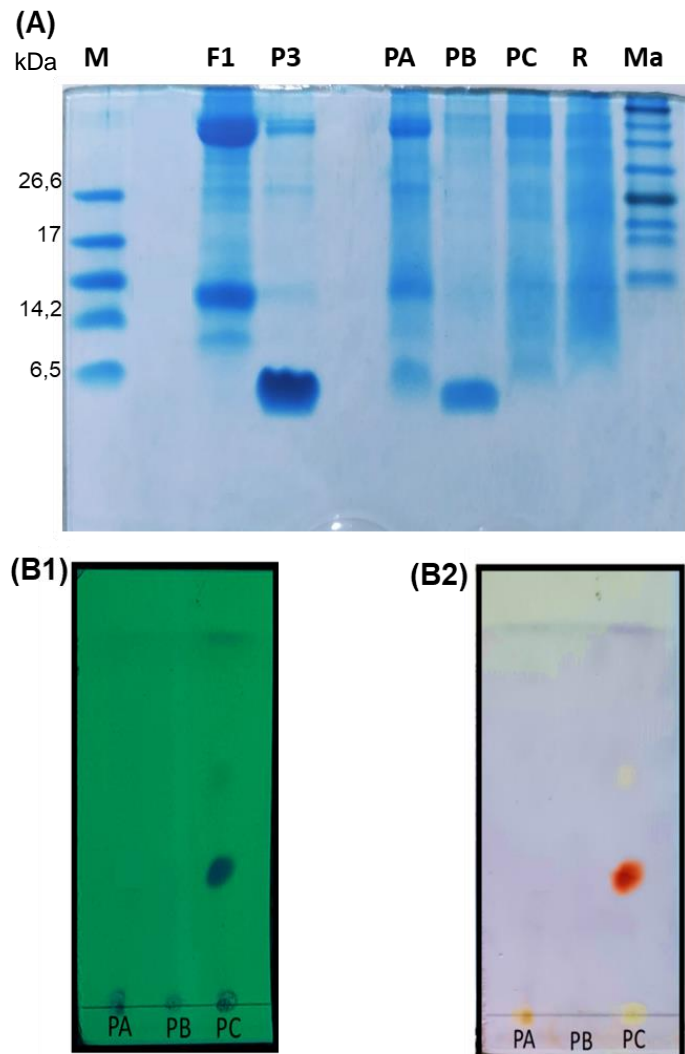


Figura 13: Visualização eletroforética do processo de isolamento do composto bioativo, incluindo os perfis proteicos de F1, P3 da Sephadex G-50 e os picos PA, PB e PC da Sephadex G-25; R (resto – líquidos coletados entre tubos, não constituente de picos cromatográficos na Sephadex G-25) em gel Tricina SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue (A); Cromatografia em camada delgada dos metabólitos em PA, PB e PC, em cromatofolhas de sílica, visualizadas em luz UV 254nm (B1) e reveladas com vanilina sulfúrica (B2). e - M - marcadores de massa molecular de 26,6 a 6,5 kDa; Ma – marcadores de alta massa molecular de 245 a 11 kDa.

A fim de definir a forma de isolamento de acordo com a classe da molécula bioativa foram realizados testes de diálise e aquecimento.

Ao dialisarmos a fração de maior interesse nesse ponto do trabalho, o PC, observou-se que este pico perdeu a capacidade larvicida e que a solução saída através da membrana de diálise conservava tal atividade (dados não mostrados). Isso nos levou a conclusão de que a molécula inseticida possuía baixa massa molecular, abaixo de 2 KDa.

Para então investigar a termoestabilidade deste bioativo, PC foi submetido a 100°C por 15 minutos e a molécula inseticida não perdeu a capacidade larvicida (dados não mostrados).

Estas observações nos direcionaram à sugestão de que o principal bioativo de interesse seria da classe de metabólitos secundários.

Como os perfis cromatográficos visualizados para P3 (Figura 10) e PC (Figuras 13B1 e B2) foram semelhantes, a amostra utilizada para isolamento de metabólitos por meio da aplicação na placa de cromatografia de camada delgada preparativa foi P3 devido ao maior rendimento em termos de massa recuperada desta amostra.

A CCDP possibilitou a separação de 3 grupos, denominados M1, M2 e M3, sendo: M1, a demarcação do limite superior da corrida, distância máxima percorrida pelos eluentes com índice de Fator de Retenção (R) igual a 1; M2, o grupo com visualização amarela após revelação com vanilina e aquecimento, visualizado fluorescente em luz UV, com comprimento de onda de 365nm e com índice de R igual a 0,61; e M3, o grupo com visualização vermelha após revelação e visualizado azul sob luz UV em 254nm com índice de R igual a 0,38 (Figura 14).

Estes grupos foram retestados em bioensaios para determinar qual apresenta toxicidade às larvas. Dentre os 4 grupos, somente M3 apresentou atividade larvicida na concentração de 60ppm (resultados não mostrados).

A fim de determinar a CL₅₀ deste M3 foi realizada a curva de letalidade do composto incorporado em diferentes concentrações no meio de cultivo das larvas (Figura 15). Foi obtido um valor de CL₅₀ de 28,29 ppm.

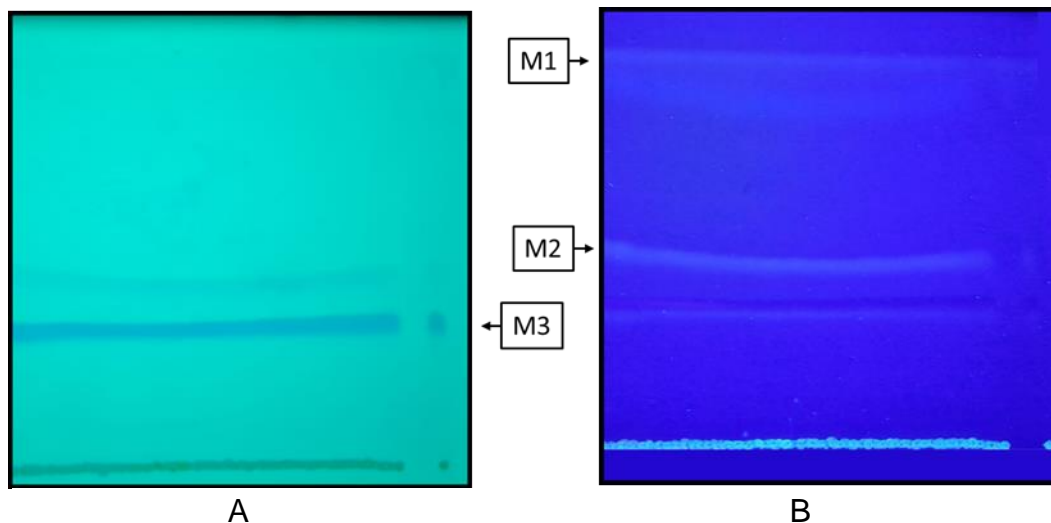


Figura 14: Cromatografia em camada delgada preparativa dos metabólitos secundários de P3, em cromatoplaça de sílica em gesso e fase móvel diclorometano:metanol (98:02) visualizada com luz UV em 254nm (A) e com luz UV em 365nm (B). A extremidade direita foi revelada com solução de vanilina sulfúrica e posterior aquecimento.

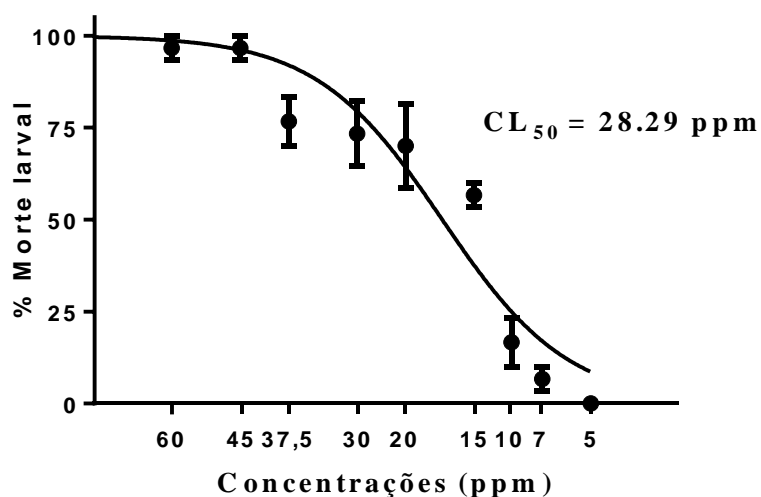


Figura 15: Letalidade de M3 às larvas de *A. aegypti* de 4^o estágio. A partir da curva obtida, foi possível o cálculo da concentração letal responsável pela morte de cinquenta por cento dos indivíduos (CL_{50}).

Por técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), foi possível identificar que o composto bioativo presente em M3 é o 11-Desoxiclitoriactal, que passaremos a chamar de 11Dx nesse trabalho, um rotenóide com fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_8$, massa molecular de 374.34 g/mol, de junção do anel B/C determinada como cis (Figura 16 e Tabela 1).

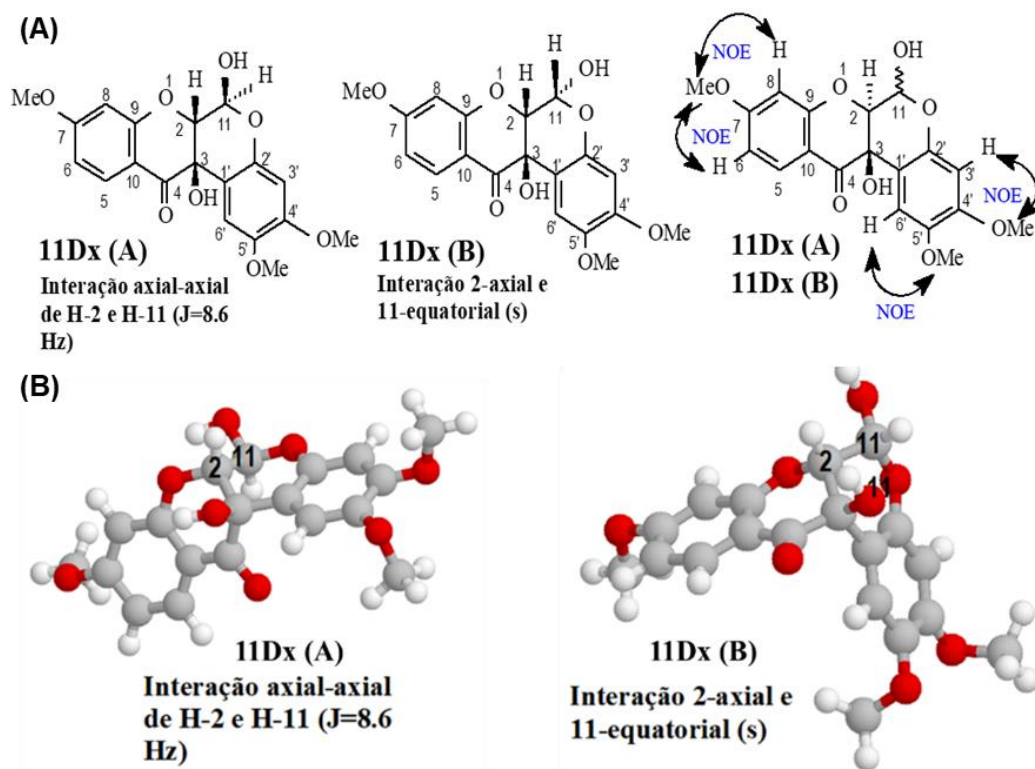


Figura 16: A) Estrutura do 11-Desoxiclitoriactal. B) Representação espacial da construção molecular de 11-Desoxiclitoriactal.

Tabela 1 Dados do espectro de RMN do 11-Desoxiclitoriacetal.

	11Dx (A)				11Dx (B)				Literatura	
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC			
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C										
3	68.50	-	H-2	H-6'	70.18	-	H-2	H-6'	69.2	-
4	189.78	-		H-5	170.59	-		H-5	191.2	-
7	167.32	-	H-8	H-5; MeO-7	167.21	-	H-8	H-5; MeO-7	167.6	-
9	162.22	-	H-8	H-5	161.69	-	H-8	H-5	162.3	-
10	110.72	-		H-6; H-8	111.16	-		H-6; H-8	108.2	-
1'	107.58	-	H-6'	H-2; H-3'	107.96	-	H-6'	H-2; H-3'	108.6	-
2'	148.11	-	H-3'		148.11	-	H-3'		148.8	-
4'	153.34	-	H-3'	H-6'; MeO-4'	151.72	-	H-3'	H-6'; MeO-4'	151.2	-
5'	144.42	-		H-3'; MeO-5'	145.12	-		H-3'; MeO-5'	144.8	-
CH		-								
2	75.20	4.78 (d, 8.6)			77.84	4.65 (s)			75.7	4.60 (m)/4.80 (d, 2.0)
5	129.35	7.88 (d, 8.9)			129.41	7.88 (d, 8.9)		-	129.7	7.85 (d, 8.8)
6	111.02	6.64 (dd, 8.9, 2.2)			111.45	6.64 (dd, 8.9, 2.2)			111.9	6.65 (dd, 8.8, 2.3)
8	100.74	6.41 (d, 2.2)		H-6	100.83	6.43			92.3	6.40 (d, 2.3)
11	91.77	5.77 (d, 9.2)*			90.67	5.68 (sl)**		-	91.3	5.60 (sl)/5.80 (d, 02.0)
3'	101.94	6.58 (s)			101.09	6.54 (s)			101.2	6.45 (s)
6'	108.89	6.53 (s)			108.70	6.53 (s)			110.1	6.70 (s)
MeO										
7	55.90	3.78 (s)				3.78 (s)			56.1	3.90 (s)
4'	55.94	3.83 (s)				3.82 (s)			56.2	3.75 (s)
5'	56.37	3.75 (s)				3.74 (s)			56.4	3.70 (s)

*Interação axial-axial de H-2 e H-11 (δ_H 5.77, d, 9.2 Hz) na VT-A

**Interação axial-equatorial (H-11, δ_H 5.68, sl) – ângulo diedro em torno de 90°.

Os dados de RMN sugerem que 11Dx existe como uma mistura de dois epímeros C-6 em quantidades quase iguais. O anel D possui apenas um grupo metoxila e os anéis A e B possuem dois grupos metoxila e dois grupos hidroxila (Figura 16).

4.2 Efeitos fisiológicos de 11Dx sobre larvas de *Ae. aegypti*

Alterações morfológicas decorrentes do tratamento com a CL₅₀ de 11Dx puderam ser visualizadas em estereomicroscópio (Figura 17). A ocorrência de manchas escuras, classificadas como pseudotumores melanocíticos com diferentes tamanhos ao longo do corpo, desde a nadadeira posterior até o ceco gástrico, é perceptível nas larvas mortas submetidas ao tratamento com o rotenoide durante 24h.

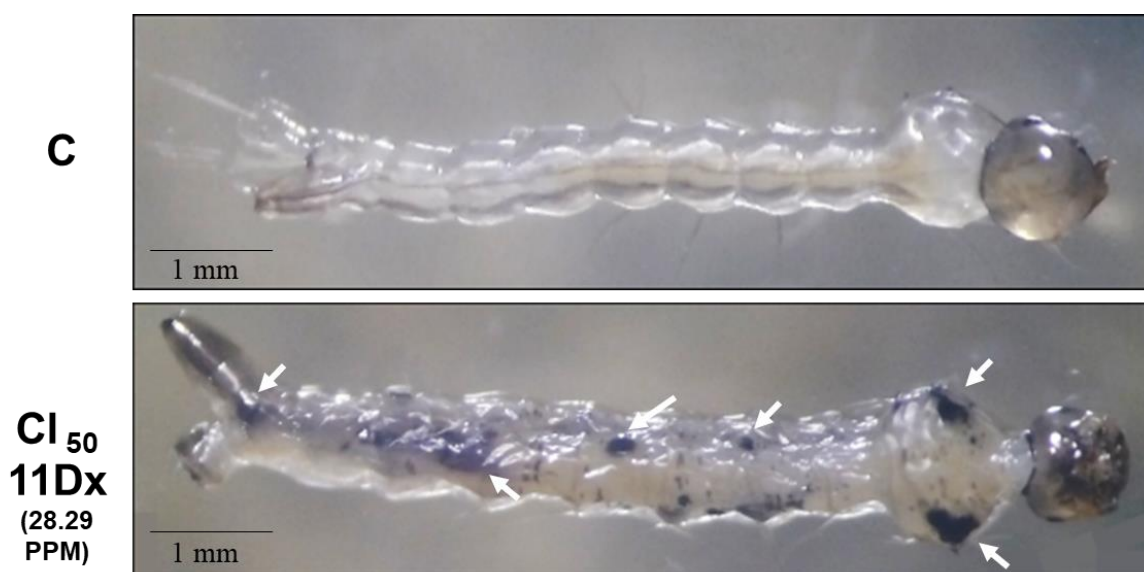


Figura 17: Observação das características morfológicas de larvas de 4^o ínstar de *Aedes aegypti* controle (A) e tratadas (mortas) com CL₅₀ de 11Dx (B), em estereomicroscópio. As setas brancas indicam pontos de melanização. Barra de escala = 1 mm.

Através da microscopia de fluorescência foi possível detectar que o rotenoide possui fluorescência intrínseca, quando excitado em 365nm e filtro de emissão azul. Essa propriedade permitiu a observação da presença de 11Dx ao longo do corpo das larvas ainda vivas tratadas com a CL₅₀ do composto (Figuras 18B, 18C e 18D) e ausência de qualquer emissão nas larvas controle (Figura 18A).

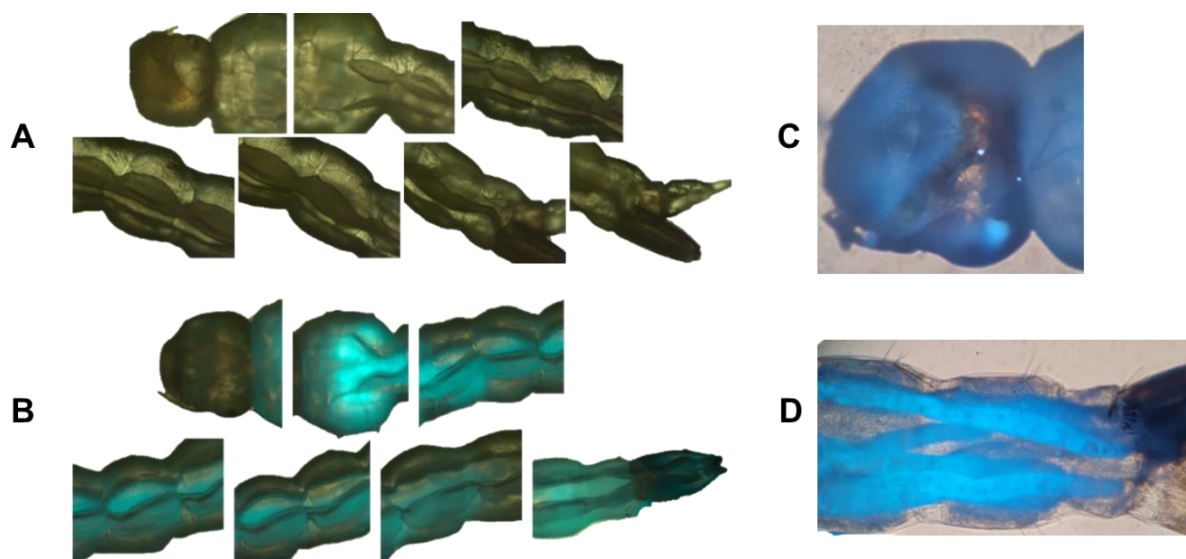


Figura 18: Microscopia de fluorescência em 365nm para observação de emissão de fluorescência por 11Dx ao longo da estrutura larval. A – Controle (água destilada). B – Larvas tratadas com $CL_{50} = 28,29$ ppm de 11Dx. C – Destaque da cabeça da larva tratada. D – Destaque dos túbulos dos Malpighi da larva tratada. 10x de aumento no microscópio óptico.

Através da análise de produção de ROS por meio da visualização de marcador específico em microscopia de fluorescência foi possível detectar a emissão de fluorescência quando excitado em 465nm (Figura 19).

A captação da fluorescência indica a produção de espécies reativas de oxigênio em larvas controle e tratadas com CL_{50} com padrões diferentes. Nas larvas sem tratamento a concentração de fluorescência ocorre na região anterior do trato gastrointestinal, no ceco gástrico e intestino médio anterior. Já em larvas que tiveram contato com o rotenoide 11Dx, a emissão de fluorescência ocorre em todo o trato digestivo de forma constante, com destaque para a presença diferencial no intestino médio posterior.

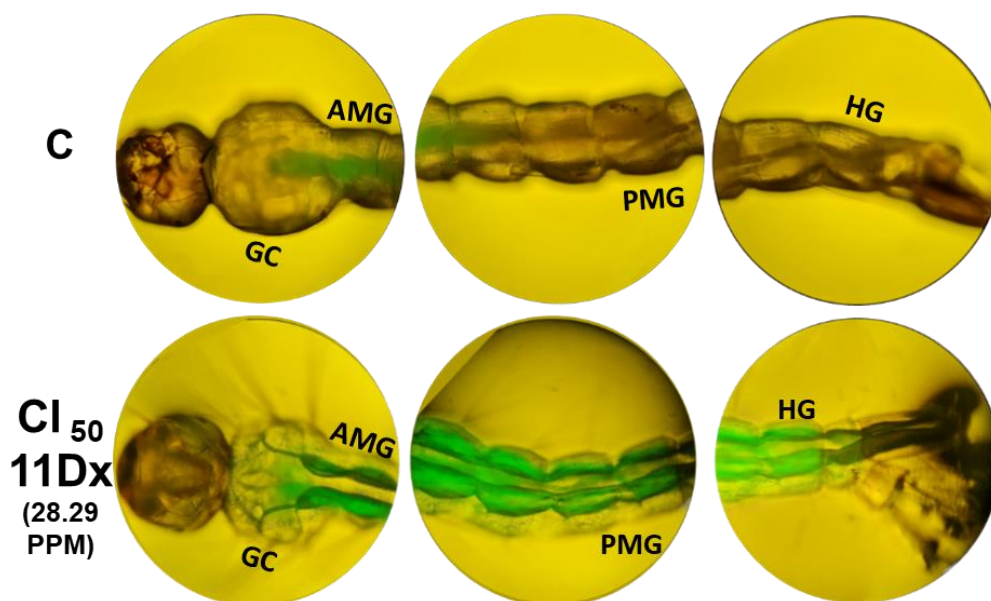


Figura 19: Microscopia de fluorescência com marcador de ROS em 465nm para detecção de estresse oxidativo no intestino das larvas controle e tratadas com Cl₅₀ (28.29 ppm) de 11Dx. C – controle em água destilada. GC - ceco gástrico; AMG - intestino médio anterior; PMG - intestino médio posterior; HG - intestino posterior. Com luz visível de fundo e aumento de 10x.

Quando tentando investigar alguma provável alteração nos pHs dos diferentes compartimentos intestinais das larvas, através do uso do dicloridrato de quinacrina, observou-se que houve marcação efetiva de regiões acidificadas dos dois grupos analisados: larvas tratadas com 11Dx e as larvas não tratadas que apresentaram acidificação mais intensa (Figura 20). É possível observar a marcação tanto no ceco gástrico quanto no intestino.

O tratamento com o rotenoide 11Dx ocasionou diminuição da acidificação dos compartimentos intestinais, detectada através da extinção da fluorescência.

Essas alterações no caráter ácido dos compartimentos intestinais foram quantificadas pela medida indireta da fluorescência emitida pela quinacrina (Figura 21). Constata-se que na larva teste a emissão de fluorescência foi menor que o observado no controle: no ceco gástrico foi 48% menor; no segmento dois, 52% menor; no segmento cinco, 55% menor; e

no segmento oito, 38% menor. Somente não foi significativa a diferença entre controle e tratamento no segmento oito.

A acidificação apresentou padrão decrescente, tanto no grupo controle quanto no teste, sendo maior nos segmentos iniciais das larvas e diminuída à medida que se avança a observação aos segmentos finais.

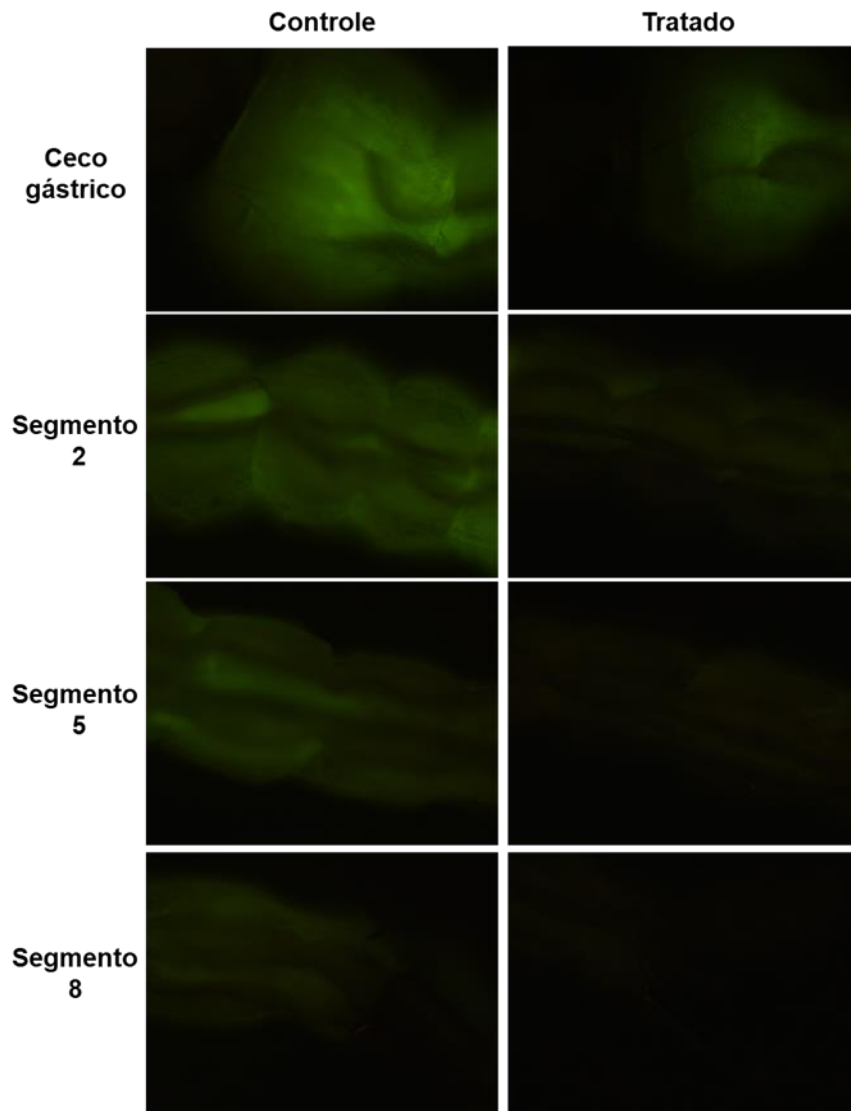


Figura 20: Microscopia de fluorescência com o marcador de acidificação dicloridrato de quinacrina, em 465nm sem luz visível de fundo e aumento de 10x da larva controle e larva tratada com CL₅₀ de 11Dx.

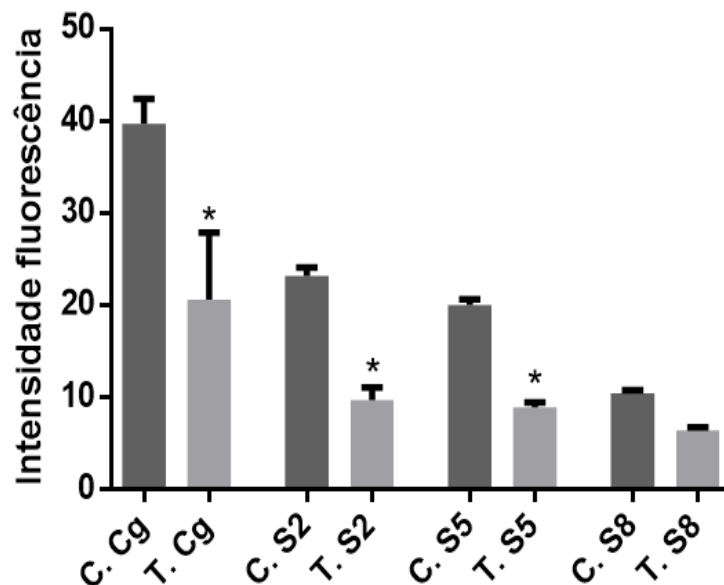


Figura 21: Níveis de fluorescência mensurados por ImageJ (v1.53t) nos compartimentos do trato digestivo das larvas de *Ae. aegypti*. C.: Controle em água destilada. T.: Teste tratado com CL₅₀ de 11DX. Cg.: Ceco Gástrico. S2, S5 e S8: porções do intestino nos segmentos abdominais 2, 5 e 8, conforme esquema mostrado na figura 4.

As dosagens de biomoléculas corporais nas larvas controle e teste submetidas ao 11Dx demonstraram variação na composição corporal das larvas. Para essas análises, as larvas foram divididas em: controle - C (vivas mantidas em água destilada); controle positivo - Cp (larvas mortas mantidas em presença de Cl₅₀ rotenona comercial); tratadas vivas - Tv (vivas mantidas em presença de Cl₅₀ de 11Dx por 24h) e tratadas mortas - Tm (mortas após tratadas com Cl₅₀ de 11Dx).

Os níveis corporais de glicose foram semelhantes entre as larvas controle (C) e as tratadas vivas (Tv) e entre as larvas controle positivo (Cp) com as tratadas mortas (Tm). Houve diferença significativa nas dosagens entre estes dois agrupamentos e visível redução de glicose nas larvas mortas (por rotenona [Cp] ou por 11Dx [Tm] em relação aos grupos de larvas vivas (C e Tv) (Figura 22).

Os níveis corporais de proteínas no grupo controle foram os maiores e apresentaram diferenças significativas em relação aos outros grupos. As larvas Tv demonstram redução dos níveis de proteína em relação ao controle, porém em níveis significativamente maiores

que os grupos com larvas mortas (Cp e Tm), uma vez que os estas foram semelhantes entre si com diferença significativa em relação aos outros grupos (Figura 22).

Os níveis de atividade da enzima lipase no grupo C foram os mais elevados e significativamente diferentes dos outros três grupos (Cp, Tv e Tm) que foram semelhantes entre si. Dentre estes, o Tm apresentou os maiores valores de unidade enzimática e o Tv os menores níveis (Figura 22).

Tanto os níveis de colesterol quanto de triglicérides foram reduzidos em larvas Tv em comparação com aquelas sem contato com o rotenoide 11Dx, sendo respectivamente 30,9% e 41,1% de redução (Figura 23).

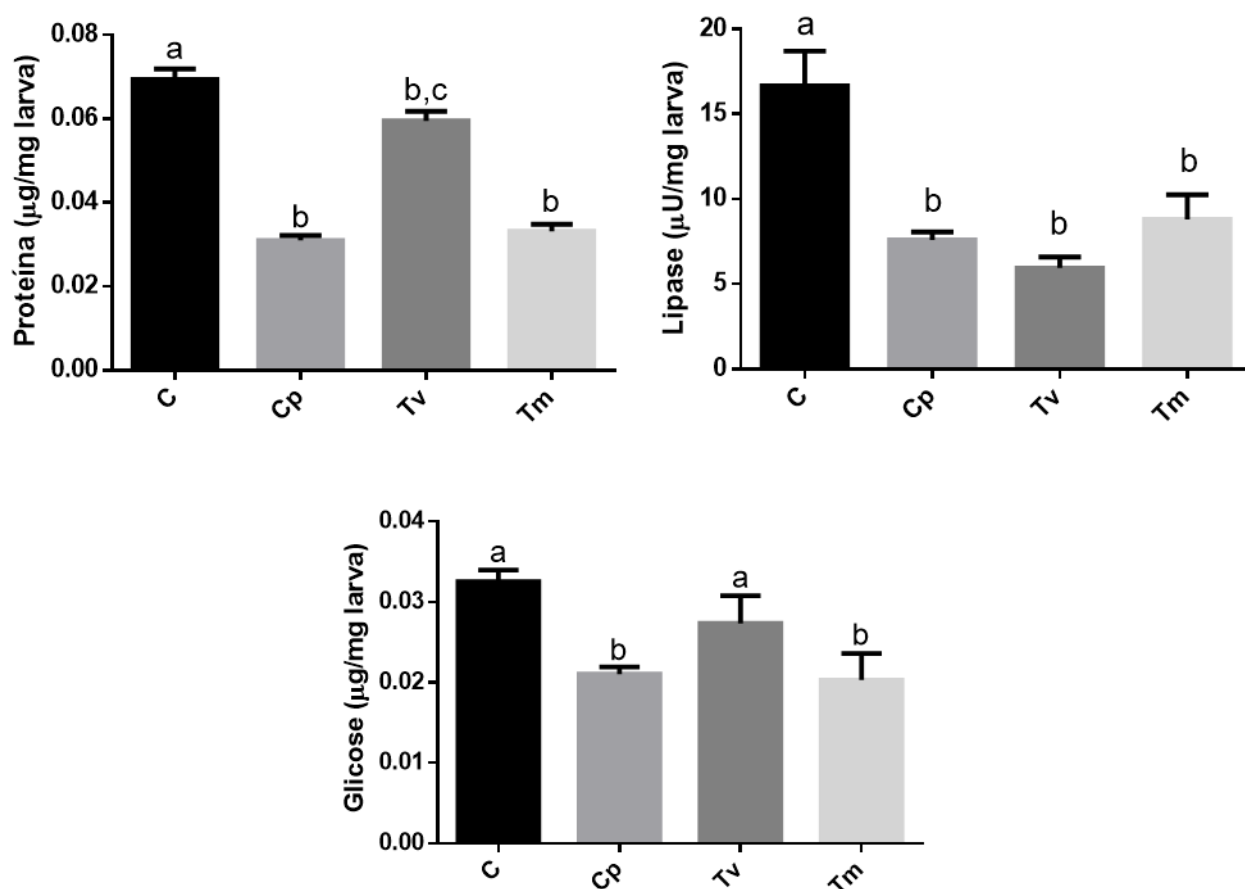


Figura 22: Níveis corporais de (A) proteínas totais, (B) atividade lipásica e (C) glicose nos seguintes grupos de larvas: C: grupo controle em água destilada (larvas vivas); Cp: grupo controle positivo em inseticida rotenona (larvas mortas); Tv: grupo de larvas tratadas com 11Dx (sobreviventes à $Cl_{50}/24\text{h}$); Tm: grupo de larvas tratadas com 11Dx (mortas com Cl_{50}). ($p > 0,05$).

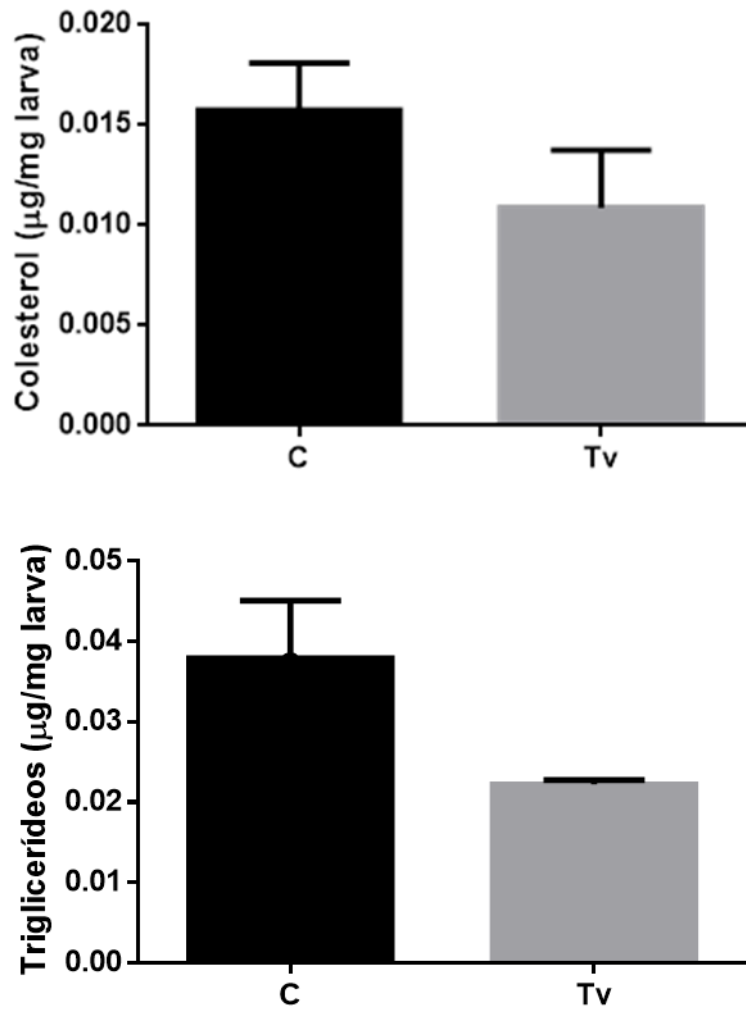


Figura 23: Níveis corporais de (A) Colesterol e (B) triglicerídeos totais expressos em micrograma por miligrama de larva. C: grupo controle em água destilada (larvas vivas); Tv: grupo de larvas tratadas com 11Dx (sobreviventes à DI50/24h) ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

As atuais medidas de controle adotadas por Programas de Controle de Mosquitos vetores ao redor do planeta envolvem o uso de inseticidas sintéticos, que além de apresentarem toxicidade a diversos organismos não-alvo, incluindo o homem, e persistirem no ambiente, apresentam hoje menor eficácia devido ao desenvolvimento de resistência em espécies alvo como *Ae. aegypti* (WHO, 2012).

A toxicidade para organismos não-alvo envolve envenenamento e morte, câncer, por mecanismos não genotóxicos, desencadeando processos carcinogênicos por diversas vias, efeitos nocivos nos sistemas nervoso, renal, respiratório e reprodutivo, e indução de estresse oxidativo (Pavela, 2016).

Os danos indiretos causados ao meio ambiente são decorrentes dos produtos de degradação destes inseticidas, que podem ser mais tóxicos do que o próprio composto original. Estudos demonstram que os produtos de degradação do temefós (larvicida organofosforado) já foram documentados em ambientes aquáticos (Lacorte *et al.*, 1996), e produtos da degradação de malatião (inibidor da acetilcolinesterase), encontrados em crustáceos aquáticos não-alvo (Zhang *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de populações de insetos resistentes é uma problemática global, de aspecto local, e envolve diferentes níveis de adaptação. Estudos na Tailândia relataram mosquitos do *Ae. aegypti* resistentes à uma ampla gama de inseticidas, incluindo deltametrina, permetrina, fenitrotiona, temefós, propoxur, diclorodifeniltricloroetano (DDT), ciflutrina e alfa-cipermetrina (Somboon *et al.*, 2003; Jirakanjanakit *et al.*, 2007; Thongwat *et al.*, 2015). Na Malásia, cepas coletadas em campo apresentaram resistência a piretroides, com ausência de mortalidade, ao DDT e ao carbamato bendiocarb (Hasan *et al.*, 2015; Leong *et al.*, 2018; Rasli *et al.*, 2018). No Vietnã, a resistência do *Ae. aegypti* ao DDT e piretroides foi relatada pela primeira vez em 1999 (Huong & Ngoc, 1999) e estudos atuais relatam indivíduos resistentes a lambda-cipermetrina, ciflutrina, etofenprox, DDT e alfa-cipermetrina (Duong, 2016; Thi *et al.*, 2016). Nos EUA, *Ae. aegypti* coletados em campo demonstram potencial para resistência a piretroides e organofosforados (Yang *et al.*, 2020). No Senegal, foram detectados mosquitos resistentes ao DDT, aos carbamatos, à permetrina, aos piretroides tipo II, ao Pirimiphos-methyl 0,05%, ao Fenitrothion 1% (Sene, 2021).

No Brasil, nos últimos 20 anos, a resistência do *Ae. aegypti* a organofosforados e piretroides foi detectada em todas as regiões do país, mesmo em localidades onde o uso do

inseticida se deu a menos de 10 anos até o desenvolvimento de resistência (Lima *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006; Beserra *et al.*, 2007; Macoris *et al.*, 2007; Montella *et al.*, 2007). Populações de *Ae. aegypti* também já foram classificadas como resistentes a temefós e cipermetrina (Santos *et al.*, 2009).

Em um estudo no nordeste brasileiro, Lima e colaboradores (2011) compararam a resistência de mosquitos de cidades onde o início do uso do inseticida temefós foi concomitante: em Crato, onde o uso do inseticida não foi interrompido, os índices de resistência passaram de 9,0, em 2003, para 192,7, em 2009. Já na cidade vizinha, Juazeiro do Norte, onde tal inseticida foi substituído sete anos antes da pesquisa, os índices de resistência passaram de 10,2, em 2003, para 7,2, em 2009. Estudos neste sentido norteiam a necessidade da elaboração de novos inseticidas que possibilitem ampliar a gama de compostos aplicados visando diminuição do desenvolvimento de resistência.

O combate às arboviroses transmitidas por tais mosquitos é considerado crítico, uma vez que estratégias baseadas em inseticidas continuam sendo as mais prontamente implementadas em escala global, porém o painel de inseticidas disponíveis para a saúde pública é limitado (Hemingway *et al.*, 2006). Portanto, o manejo da resistência a inseticidas é crucial para prevenir o surgimento e evolução de resistência ou revertê-la, minimizando os efeitos negativos sobre o meio ambiente por meio do monitoramento de resistência no espaço e no tempo, e avaliação do impacto das atividades de controle de vetores para aplicação de novas técnicas aplicadas de acordo com a espécie-alvo e da natureza dos mecanismos de resistência (Dusfour *et al.*, 2019).

Embora, no curto prazo, utilizar misturas e rotações dos inseticidas indicados pela OMS sejam estratégias eficientes contra larvas de *Ae. aegypti* multirresistentes, como demonstrado em estudo realizado em populações resistentes a piretróides e organofosforados no Caribe (Darriet *et al.*, 2010) ou contra mosquitos adultos resistentes (Hougard *et al.*, 2003; Darriet *et al.*, 2013), a médio prazo, no entanto, será necessário integrar novos inseticidas com novos modos de ação (Dusfour *et al.*, 2019).

Neste sentido, Silvério *et al.* (2020) consideram o teste larvicida como um bioensaio eficiente para a busca de inseticidas para *Ae. aegypti*, pois a fase larval é a mais longa no estágio imaturo, é mais sensível e os locais onde se desenvolvem as larvas são geralmente acessíveis.

Inseticidas derivados de produtos naturais de plantas são considerados fontes promissoras de novos produtos e mais seguros para o controle de mosquitos ao minimizarem, via de regra, perturbações do ecossistema uma vez que os resíduos de sua degradação natural, tanto no campo quanto na água, são mínimos (Park *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2012). Também há relatos de que tenham efeitos colaterais mínimos em organismos não-alvo, bem como no meio ambiente, como demonstrado por Pavela (2014) que relatou a eficácia de um óleo essencial obtido dos frutos de *Pimpinella anisum* sobre todos os estágios de desenvolvimento do mosquito vetor *Culex quinquefasciatus*, e nenhum efeito negativo na mortalidade ou fertilidade de *Daphnia magna* (microcrustáceo bioindicador) em doses baixas do óleo. Pavela *et al.* (2013) também demonstraram a elevada toxicidade do extrato de sementes de *Angelica archangelica* aos pulgões *Acyrtosiphon pisum*, e nenhum efeito negativo significativo do extrato sobre a mortalidade ou fertilidade de adultos de *Harmonia axyridis* (espécie predadora dos pulgões).

Assim, pesquisas envolvendo metabólitos secundários vegetais produzidos como mecanismos naturais de defesa nas plantas são valiosas na busca por inseticidas de origem natural (Williams *et al.*, 1989; Isman, 2017). A família Fabaceae se mostra uma importante fonte de biopesticidas uma vez que é frequentemente relatada dentre as majoritárias fontes de extratos bioativos. Na revisão de Pavela *et al.* (2019), 429 espécies de plantas foram avaliadas quanto à sua eficácia larvicida contra mosquitos vetores e dentre as 101 famílias botânicas as três mais representativas foram: Asteraceae (49 espécies), Lamiaceae (41 espécies) e Fabaceae (40 espécies). Falkowski e colaboradores (2020) demonstraram a família Fabaceae como a mais representada (17 gêneros e 20 espécies) em um estudo com *A. aegypti* envolvendo 144 extratos de plantas provenientes de 85 espécies pertencentes a 36 famílias. Nossa espécie de estudo, *C. fairchildiana*, de origem amazônica apesar de pertencente à fabaceae não é citada nos estudos referenciados acima.

Na revisão de Ghosh e colaboradores (2012), dentre 139 extratos analisados são 17 os princípios ativos isolados. Pavela *et al.* (2019) encontraram estudos que elucidam os compostos larvicidas de 19 dentre 429 extratos de plantas. Wuillda e colaboradores (2019) revisaram, no período de seis anos anteriores à publicação, os metabólitos secundários descritos como tóxicos para *Ae. aegypti*, demonstrando a existência de 86 metabólitos recentemente descritos, com valores de CL₅₀ para larvas de quarto estágio chegando até 232,04 ppm.

Nossa espécie de trabalho, assim como outros membros da família Fabaceae, apresentou atividade bioativa em seus extratos, porém foi único o estudo encontrado que envolva o isolamento de metabólitos secundários de *Clitoria fairchildiana* tóxicos para *A. aegypti*, o de Bertonceli *et al.* (2022). No caso específico de rotenóides com atividade inseticida encontrados na literatura, podemos citar a rotenona, a denguelina, o usararotenoide-A (Bosire *et al.*, 2014), o 11 α -O- β -D-glucopiranosilrotenoide (Bertonceli *et al.*, 2022), a miletona, a miletosina, a tefrosina (Gutiérrez *et al.*, 2005) e a 8'-hidroxirotenona (Liang *et al.*, 2015).

O rotenoide 11-Desoxiclitoriactal, isolado neste estudo, é alvo de pesquisa em apenas quatro publicações de artigos científicos: sua descoberta em sementes de *C. fairchildiana* no ano de 1998 (Mathias *et al.*, 1998); sua identificação em raízes da mesma espécie, também em 1998 (Silva *et al.*, 1998); a demonstração de atividade anti-inflamatória em ensaios de permeabilidade capilar, em 2002 (Silva & Parente, 2002) e, por fim, a demonstração de atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos (Santos *et al.*, 2018).

Falkowski e colaboradores (2020), em sua pesquisa com 452 diferentes extratos, consideraram ativos aqueles capazes de causar mais de 50% de mortalidade após 48 h de exposição a 100 ppm. Pavela (2015) considera eficiente o composto inseticida cujo CL₅₀ seja menor que 50 ppm. Em relação à aplicabilidade comercial e em campo, Pavela *et al.* (2019) consideram como principais os extratos aquosos e alcoólicos, devido à sua fácil formulação em água sem uso de surfactantes.

A demonstração de toxicidade do 11-Desoxiclitoriactal (11Dx) por meio desta pesquisa permite classificá-lo como um composto ativo, eficiente e passível de ser aplicado como ferramenta de controle de larvas de mosquito já que ele apresentou CL₅₀ de 24ppm e é solúvel em água, características estas que atendem aos critérios supracitados.

O método de extração empregado neste trabalho que permitiu o isolamento de um rotenóide a partir de uma extração aquosa de sementes, apesar de não tradicional em pesquisas que visam o isolamento de metabólitos secundários, é corroborado por Vieira e Fernandes (1999), que demonstram que o método de decocção e o método de sistema fechado são utilizados desde a década de 40 para a extração de rotenoides. Estas são extrações que consistem em manter o material vegetal em água em ebulição (decocção) ou em sistema fechado (fervura sob refluxo). Aliado a isso, Maciel *et al.* (2010) ressaltam que plantas pertencentes à família Fabaceae são ricas em rotenoides.

Novos testes poderão vir a estender a toxicidade do 11Dx para espécies cujo combate seja desejável, assim como ocorre com outros rotenoides que apresentam toxicidade para *Aedes* e outras espécies de artrópodes a exemplo de: rotenona, um inseticida comercial tóxico para uma ampla gama de pragas; a tefrosina que exibiu alta atividade contra a lagarta do cartucho (*Spodoptera exempta*) e ao gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) (Zhang *et al.*, 2020); denguelina, eficaz contra *Aphis gossypii* (pulgão do algodoeiro) e *Bemisia tabaci* (mosca-branca) (Zhang *et al.*, 2022), e para *Callosobruchus maculatus* (caruncho-do-feijão) (Belmain *et al.*, 2012).

Da mesma forma, investigações farmacológicas podem ser propostas para avaliar o potencial farmacológico do 11Dx baseando-se no largo espectro de ação fornecida para rotenoides pela literatura: 12-hidroxirotenona, além de inseticida, demonstra potente atividade citotóxica em linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7) e câncer de pulmão (A-549), em CI_{50} de 0.008 e 0.04 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Sakurai *et al.*, 2006). Yenesew e colaboradores (2003a) demonstraram que os usararotenoide C, 12a-epimillettosina e 6a,12a-Dehidromillettosina apresentaram atividades contra *Plasmodium falciparum*, tanto em cepa sensível quanto resistente à cloroquina. Estes pesquisadores sugeriram ainda que o teste de uma ampla gama de rotenoides quanto à atividade antiplasmodial permitiria estabelecer o requisito estrutural para atividades antiplasmodiais. Nguyen *et al.* (2022) demonstraram que o novo rotenoide berectona C apresenta forte inibição da enzima alfa-glicosidase e propriedade antimicrobiana contra cepa resistente a antibióticos de *Acinetobacter baumannii*.

Destacamos aqui, de forma especial, o rotenoide 6-Desoxiclitoriactal, uma vez que possui extrema semelhança estrutural com 11Dx e exibe forte citotoxicidade *in vitro* contra várias linhagens celulares de câncer humano, incluindo carcinoma de cólon (SW620), carcinoma gástrico (KATO), carcinoma de pulmão (CHAGO), carcinoma de mama (BT474), hepatocarcinoma (HEP-G2), carcinoma oral humano (KB), câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão de pequenas células (NCI-H187), graças a sua capacidade de inibir fortemente a atividade da topoisomerase II, além da propriedade de intercalação de DNA (Fang & Casida, 1998; Roengsumran *et al.*, 2003; Shiangthong *et al.*, 2015).

Além da atividade biológica original intrínseca, estudos como o de Sangthong e colaboradores (2011) demonstram que modificações estruturais podem ser realizadas com a finalidade do melhoramento da bioatividade. Por exemplo, um rotenoide com substituinte de amina alifática (morfolina) apresentou atividade citotóxica contra carcinoma de mama

(BT474) (IC_{50} 340 nM, inibição 93% da ação da topoisomerase II), em comparação com o composto original (IC_{50} >100.000 nM, inibição 72% da ação da topoisomerase II).

Certos trabalhos envolvendo rotenoides relacionam a estrutura química com a atividade biológica exercida. A atividade de rotenoides contra insetos está associada ao sistema de quatro anéis fundidos (aneis A, B, C e D). Havendo junção cis no anel B/C, como na rotenona, a ação é geralmente maior. Além disso, rotenoides com junção trans dos anéis B/C ou anéis modificados se mostraram menos inseticidas ou não tóxicos (Fukami e Nakajima, 1971; Joseph & Casida, 1992). Bosire *et al.* (2014) concluíram que, inesperadamente, o usararotenoide-A, apesar de ter uma junção de anel trans-B/C mostrou alta atividade larvicida comparável com a da denguelina contra *Ae. aegypti* de 4º estágio.

Yenesew e colaboradores (2003b) relacionam, com surpresa, a falta de atividade tóxica contra *Ae. aegypti* dos rotenoides millettona e millettosina, mesmo sendo extremamente semelhantes a dois rotenoides com forte atividade larvicida conhecida, a denguelina e a trefosina. A estrutura química destes rotenoides é quase idêntica, a única diferença presente entre os pares millettona/denguelina e millettosina/trefosina é a natureza dos substituintes no anel A em C-2 e C-3, onde os rotenoides inativos possuem grupos metilendioxo em vez de metoxi. Isso indica a importância dos grupos metoxi (um ou dois) em C-2 e C-3 para a atividade larvicida observada em denguelina e trefosina.

A comparação do rotenoide trefosina (potente atividade larvicida) com seu derivado dehidrodenguelina (sem toxicidade relatada), preparado por desidratação sob condições ácidas, indica a importância da saturação na junção do anel B/C (presença de H e OH) para a atividade larvicida dos rotenoides. Da mesma forma, podemos comparar a estrutura da rotenona com seu derivado 6a,12a-dehidrorotenona que é inativa contra insetos ou do rotenoide toxicarol (CL_{50} 3,22 para *Ae. aegypti*) com 6a,12a-dehidro- α -toxicarol (sem atividade larvicida nas condições testadas) ou da 6a,12a-dehidrodenguelina (insaturada na junção B/C) inativa contra *Ae. aegypti* quando comparada com denguelina (Fukami & Nakajima, 1971; Yenesew *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2012).

11Dx é um rotenoide com a presença de características estruturais favoráveis à ocorrência de atividades biológicas: ocorrência de junção CIS entre os anéis B/C; presença dos grupos metoxi com a mesma localização dos referidos exemplos supracitados e saturação na junção do anel B/C, pela presença de H e OH ligados ao carbono.

O isolamento deste rotenoide sob a forma de duas moléculas epímeras, que variam quanto à orientação de um radical hidroxila (α OH e β OH), foi relatada para o próprio 11-Desoxiclitoriacetal por Mathias e colaboradores (1997). Recentemente, Bertoncilli *et al.* (2022) isolaram rotenoides isômeros com atividade larvídica contra *Ae. aegypti*.

Ha e colaboradores (2005a) demonstram que insetos estimulados por produtos microbianos relacionados aos microrganismos comensais do sistema digestivo geram espécies reativas de oxigênio (ROS) que são necessárias para homeostase intestinal. A geração de ROS no epitélio é necessária para o controle da flora presente no lúmen, limitando a proliferação microbiana de comensais não patogênicos. Esta observação sugere um papel para a geração epitelial de ROS que vai além da defesa mediada por fagócitos, sendo importante na homeostase intestinal e no controle de microbiota exógena (HÁ *et al.*, 2005b; Jones *et al.*, 2012)

Como diferentes populações de bactérias colonizam o intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* (Strand, 2018), a presença de ROS pode ocorrer nesta região do trato gastrointestinal como demonstrado pela microscopia de fluorescência. Já no intestino posterior das larvas tratadas (Figura 19) foram observadas ocorrências de ROS, ausentes nas larvas controle. Esses resultados sugerem que o rotenoide 11Dx causa estresse oxidativo no intestino dessas larvas.

O estresse oxidativo gera diferentes resultados na forma de dano oxidativo intracelular: baixos níveis de ROS regulam positivamente os genes apoptóticos, incluindo *Dronc* (Death regulator Nedd2-like caspase), promovendo assim a apoptose; níveis médios induzem necrose; e altas concentrações de ROS causam disfunção mitocondrial e aumento da concentração de Ca^{2+} , causando diretamente a necrose celular (Samara *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Vaseva *et al.*, 2012).

Anoopkumar e colaboradores (2020) atribuem à produção excessiva de radicais livres promovida por fotoquímicos a responsabilidade pela morte de larvas de *Ae. aegypti*, uma vez que um nível elevado de espécies reativas de oxigênio pode ativar um conjunto diversificado de eventos ligados ao funcionamento anormal das células, como interrupção das vias de sinalização redox, apoptose dependente de p53 (proteína de resposta celular para parada do ciclo celular), juntamente com anormalidades em vários processos fisiológicos (Huang *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2017).

A mitocôndria é considerada a principal fonte de ROS e também o principal alvo do ataque de ROS: estresse oxidativo destrói as mitocôndrias e libera mais ROS (Luckhart *et al.*, 2003). Certos metabólitos secundários são capazes de gerar danos à crista mitocondrial ou às enzimas da cadeia transportadora de elétrons. Especificamente a inibição do complexo I é considerada crítica, pois é esse um local primordial na produção de ROS (Quinlan *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2018).

Zhang e colaboradores (2019) demonstraram que o metabólito secundário por eles estudado (α -tertienil) apresentou distribuição ao longo do intestino, ceco gástrico e túbulos de Malpighi das larvas de *Ae. aegypti* (visualização esta possibilitada pela emissão de fluorescência própria do fitoquímico); induziu ao aumento nos níveis de ROS mitocondriais, relacionado à inibição da enzimática da cadeia transportadora de elétrons (CTE), causando dano mitocondrial e liberação de fatores apoptóticos no citoplasma; e em concentrações mais elevadas gerou indução de autofagia, resultando em necrose celular devido à grande quantidade de Ca^{2+} excretada no citoplasma. O intestino médio pode ser o principal local de ação do metabólito, pois se acumula principalmente no trato digestivo e à medida que as células do intestino morrem, a estrutura e a permeabilidade da membrana peritrófica mudam, contribuindo para o colapso fisiológico das larvas (Edwards *et al.*, 2000).

Wu e colaboradores (2021) demonstraram a disfunção mitocondrial de células do intestino médio de *Ae. aegypti* induzida pelo composto fenólico 2-tiofenilfuranocumarina. Enzimas da CTE, especificamente os complexos I e III, e do ciclo de Krebs foram inibidas, o que inevitavelmente afetou a produção de energia (os níveis de ATP foram significativamente menores) e ocasionou a produção de ROS (visualizados por meio de ensaio fluorescência) no intestino médio posterior, culminando em estresse oxidativo nas células que levou à indução de apoptose. *Dronc* foi visto como o gene iniciador de apoptose que ativou as caspases de efeito *downstream*, características típicas da cariopinose apoptótica.

Nossos resultados demonstram, através da fluorescência própria do fitoquímico, um acúmulo do 11Dx ao longo do trato digestivo (cego gástrico e intestino médio) e túbulos de Malpighi das larvas, além da ocorrência de ROS no intestino médio posterior indicando um possível mecanismo de ação do rotenoide por meio de estresse oxidativo no trato digestivo. Esse achado se relaciona com as semelhanças do 11Dx com a rotenona, um clássico inibidor de classe A do complexo I da CTE, que aumenta a produção de ROS, e com o 11 α -

O- β -D-glucopiranosilrotenoide, capaz de inibir a atividade de V-ATPases e gerar ROS no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* (Fato *et al.*, 2010; Bertonceli *et al.*, 2022).

A ocorrência excessiva de ROS nas larvas induzidos pelo tratamento com 11Dx pode estar relacionada ao desencadeamento da resposta fisiológica de melanização.

Um componente essencial da resposta imune mediada por células em insetos é a melanização, uma resposta que se manifesta prontamente nas superfícies de patógenos invasores ou em locais de injúria tecidual ou feridas cuticulares. São conhecidas duas vias de melanização em *Ae. aegypti*: i) melanização imune, que é ativada pelo reconhecimento de moléculas de superfície celular de patógenos e regulada por cascatas de proteases de melanização imune (IMP-1 e IMP-2) e Serpin-1, mediando a clivagem da pró enzima profenoxidase em fenoxidase, que hidroxila monofenóis em catecois e oxida catecois em quinonas, as quais se polimerizam em melanina; ii) melanização tecidual, que é mediada pela protease de melanização tecidual (TMP), IMP-1 e Serpin-2, e é representada por tumores de melanina, frequentemente associados a danos em tecidos (Nappi *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

A via de melanização tecidual resulta na formação de pseudotumores melanocíticos, sendo estes o resultado de um encapsulamento melanótico formado pela deposição de grãos de melanina na forma de massas pigmentadas na superfície do tecido, juntamente com aglomerados de hemócitos aderentes ou outros tecidos endógenos encapsulados por essas células (Harshbarger e Taylor, 1968; Christensen *et al.*, 2005; Cerenius *et al.*, 2008).

Como são polímeros redox-ativos, as melaninas estão envolvidas em processos de transferência de elétrons com uma variedade de espécies oxidantes ou redutoras (O'Brien, 1991). O potencial redox celular regula os processos de transferência de elétrons mediados pela melanina, produzindo intermediários com diferentes funções. A polimerização de intermediários melanogênicos ocorre por reações de radicais livres resultantes de reações redox envolvendo quinonas e semiquinonas derivadas de indois e seus precursores de difenol (Riley, 1988). A tendência desses intermediários de se engajar no ciclo redox promove cascatas de radicais livres e gera intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio (ROI e RNI) (Wink *et al.*, 1999; Nappi e Vass, 2001).

A ativação de fenoxidase é estritamente controlada pois a produção de semiquinonas reativas e espécies reativas de oxigênio pode ser prejudicial ao inseto. A melanina é derivada da oxidação de monofenóis e difenóis e a polimerização de suas

respectivas ortoquinonas, numa cascata de reações. Esta polimerização ocorre por meio de reações repetidas de transferência de elétrons envolvendo intermediários melanogênicos redox-ativos. Esses precursores de pigmento, funcionando sozinhos ou em combinação com ROI e RNI, compõem um sistema citotóxico. Precursores de melanina, bem como níveis elevados de $O^{\cdot -}$, H_2O_2 e NO, são encontrados durante melanização em insetos (Nappi *et al.*, 1995; Nappi *et al.*, 2000).

A alteração de pH, presença de íons de metais de transição (por exemplo, Fe^{3+} e Cu^{2+}) ou ocorrência de ROS em níveis elevados são fatores que podem afetar as propriedades redox da melanina. Na presença de ROS, a dopamina e outras catecolaminas são oxidadas pela xantina oxidase em melaninas derivadas de indol (Foppoli *et al.*, 1997, Sugumaran, 2002).

Existe relação direta da melanização com danos oxidativos, uma vez que a peroxidação lipídica ou outras formas de dano oxidativo causadas por ROI e RNI podem ser aumentadas por certos intermediários melanogênicos, incluindo a semiquinona que tem a mesma reatividade que o ânion superóxido (Nappi & Christensen, 2005).

Evidências em diversos insetos demonstram que ROI e RNI não são apenas moléculas citotóxicas induzidas por desafio imunológico, mas também importantes moléculas de sinalização celular, devido a sua capacidade de reagir com diversas moléculas como proteínas, DNA, compostos tiólicos de baixo peso molecular e grupos prostéticos (Bauer, 2002; Stefano & Ottaviani, 2002). Como exemplo, níveis elevados dessas moléculas foram identificados em *Anopheles* e *Drosophila* imunorreativas (Foley & O'farrell, 2003; Nappi & Vass, 2001; Dimopoulos, 2003; Kumar *et al.*, 2003).

Perturbações que geram espécies reativas de oxigênio, seja na cadeia de transporte de elétrons, via NADPH oxidase, ou no curso da atividade de certas enzimas (como aldeído oxidase, xantina oxidase ou citocromo P450), interrompem a homeostase redox celular, alteram os processos de transporte de elétrons, ativam fatores de transcrição, iniciam a peroxidação lipídica aberrante e modificam o metabolismo do ácido araquidônico e a produção de eicosanoides. Há evidências do envolvimento de prostaglandinas (derivados do ácido araquidônico) e outros eicosanoides como moléculas de sinalização celular na resposta imune inata dos insetos. Além disso, a citotoxicidade e as perturbações na homeostase redox celular são aumentadas durante a melanogênese pela ciclagem redox de quinonas e semiquinonas (O'Brien, 1991; Rad *et al.*, 2004; Carton *et al.*, 2002).

Estes indícios demonstram a intrínseca relação entre ROS e psedotumores melanóticos, num esquema de indução, retroalimentação e citotoxicidade. Nesta realidade a indução excessiva de ROS por 11Dx nas larvas pode estar relacionada ao desenvolvimento de psedotumores melanóticos nas larvas tratadas com o rotenoide (Figura 19).

A família de ATPases de translocação de prótons H^+ , as ATPases vacuolares (V-ATPase), funciona principalmente no bombeamento de prótons consumindo ATP. Além de estar presente na membrana plasmática de células eucarióticas, a V-ATPase é amplamente distribuída na membrana de várias organelas, como lisossomos, complexo de Golgi e grânulos secretores (Nelson, 1992; Grüber *et al.*, 2001).

A atividade de bombeamento de prótons da V-ATPase desempenha papéis essenciais em vários processos celulares vitais, como regulação de pH, homeostase iônica, tráfico de proteínas, autofagia, endocitose, sinalização e liberação de neurotransmissores. Cada organela mantém um pH interno característico e específico para o funcionamento de seus processos como endocitose, exocitose, fluxos através de membrana e transporte de substâncias. A V-ATPase é a principal força motriz do pH ácido do sistema vacuolar em células eucarióticas, ao bombear prótons para o lúmen de uma organela usando a energia gerada pela hidrólise do ATP (Wada *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012; Vavassori *et al.*, 2014).

A atividade da V-ATPase é regulada por múltiplos mecanismos: força iônica; abundância de suas subunidades; sua localização na membrana; entre outros. Destaca-se aqui a modulação por presença de ATP (Feng & Forgac, 1992; Toyomura *et al.*, 2003).

As V-ATPases presentes nas membranas de células epiteliais do intestino de insetos são responsáveis por alterações do pH luminal; elas também acidificam o lúmen de várias organelas intracelulares, como endossomos, lisossomos e vesículas secretoras, uma vez que a alta concentração de prótons nessas organelas é a chave para as funções biológicas específicas como dissociação de complexos proteicos, ativação de enzimas, tráfico vesicular, defesa contra patógenos, desintoxicação e digestão intracelular (He & Klionsky, 2009; Sahu *et al.*, 2011; Zoncu *et al.* 2011).

Nos túbulos de Malpighi dos insetos, a ciclagem de prótons da célula para o lúmen do intestino através da V-ATPase está associada a mudanças no pH, a fluxos de cátions (Na^+ ,

K⁺) e a altas taxas de fluxo osmótico de água (Wieczorek *et al.*, 1989; Shanbhag & Tripathi, 2005; Onken & Moffett, 2009).

Beyenbach *et al.* (2000) demonstraram que ao inibir V-ATPase em *Ae. aegypti* é completamente impedida a secreção transepitelial de NaCl e KCl e, com ela, a secreção de fluidos nos túbulos de Malpighi e as voltagens da membrana apical e basolateral diminuem para zero sugerindo forte ligação entre o fluxo de H⁺ e o transporte epitelial nos túbulos de Malpighi. Weng *et al.* (2003) confirmam que os mecanismos de secreção transepitelial nos túbulos de Malpighi de larvas de *Ae. aegypti* dependem da V-ATPase como o principal energizador do transporte epitelial.

A concentração intracelular de ATP e a eletrogênese pela V-ATPase na membrana plasmática celular estão intimamente associadas (Wu & Beyenbach, 2003). Além disso, de forma específica, as V-ATPases são densamente expressas nas células dos túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti* em uma região que também é densamente povoada por mitocôndrias. Esta estreita relação espacial entre a síntese de ATP pelas mitocôndrias e a utilização de ATP pelas V-ATPases sugere uma relação funcional entre o metabolismo de geração de ATP, o funcionamento de V-ATPases e o transporte transepitelial. A inibição da síntese de ATP despolariza a voltagem da membrana apical (de 111 mV para 9 mV em 1 min) ocasionando rápida inibição do transporte transepitelial no órgão excretor (Pannabecker *et al.*, 1992, Beyenbach, 2001).

A possível inibição da CTE promovida por 11Dx, ocasionando depleção nos níveis de ATP celular, pode inibir indiretamente a atividade das V-ATPases por falta de ATP, impedindo assim a acidificação correta (Figura 20) dos compartimentos afetados pela ação do rotenoide, principalmente da região do intestino posterior devido ao funcionamento inadequado do sistema de bombeamento de H⁺. De forma concomitante, o acúmulo de 11Dx nos túbulos de Malpighi observados nas larvas tratadas (Figura 18D) corrobora com a hipótese de inibição das V-ATPases, uma vez que o mal funcionamento destas bombas impede os mecanismos de secreção do órgão.

David *et al.* (2010) consideram que características físico-químicas como a molaridade e a lipofilicidade das moléculas administradas em larvas de *Ae. aegypti* sejam fatores chave que afetam a magnitude e a especificidade das variações do transcriptoma associadas às respostas fisiológicas de ajuste às modificações metabólicas causadas pelos xenobióticos, pois são essas características que definem a distribuição das moléculas nos tecidos e

células. Ao considerar os xenobióticos orgânicos, a resposta fisiológica aumenta proporcionalmente à molaridade e os compostos lipofílicos afetam diferencialmente genes transcritos que codificam proteínas cuticulares e transportadores (Roche *et al.*, 2002; Sandermann, 2003).

Relacionando os dados de diminuição dos níveis corporais de biomoléculas energéticas em larvas tratadas com 11Dx com a literatura disponível, Rai e Carpinella (2006) mencionam que a administração de rotenona diminui o conteúdo total de proteína de larvas de Lepidoptera, altera os componentes proteicos no tegumento, inibe a montagem de canalículos do corpo do fuso e a formação de canalículos de insetos por conjugação reversível com a proteína do canalículo. Liang *et al.* (2015) demonstram que a rotenona e a amorfigenina (metabólito que possui semelhança com a estrutura química da rotenona e também é inibidor do complexo mitocondrial I), na concentração de 10,45 µmol/L, diminuíram o conteúdo de proteína das larvas do quarto ínstar de *Culex pipiens pallens* em 1,89 e 1,98 vezes, respectivamente, relacionando a diminuição do teor total de proteínas dos mosquitos com a capacidade de inibição da síntese de proteínas no tegumento.

Sharma *et al.* (2011) correlacionam a diminuição dos níveis proteicos com deformidades estruturais produzidas nas larvas de *Anopheles* quando expostas ao extrato vegetal inseticida estudado. Da mesma forma, Sharma *et al.* (2009) relataram que as larvas de *Culex* apresentam danos na parede quitinosa e outros tecidos, como cascas de ovos e intestino, sendo estes tecidos proteicos afetados resultado da diminuição geral na dosagem nos níveis de proteína (Sharma *et al.*, 2006).

Devi & Bora (2017) demonstram que o nível de lipídios, glicose e glicogênio diminuíram significativamente em larvas de *Ae. aegypti* de 4^o estágio, nas pupas originadas das larvas sobreviventes e nas larvas e pupas da geração filial após o tratamento com extrato de compostos fenólicos, resultando no prolongamento significativo da duração do estágio larval, redução da expectativa de vida adulta dos mosquitos, redução da fecundidade e da fertilidade dos insetos tratados, sendo as reduções significativas tanto na geração parental quanto na geração filial um (F1). A diminuição da glicose e lipídios também foi relatada por Sharma e colaboradores (2011) em larvas de *Anopheles* e *Culex*, após o tratamento com extratos da planta *Artemisia annua*.

A diminuição do nível de moléculas energéticas como lipídios e glicose em larvas após o tratamento com 11Dx bem como outros fitoquímicos tóxicos a *Ae. aegypti* podem estar na

base de todo o processo de estresse fisiológico, culminando no aumento do metabolismo energético para neutralizar este estresse. A glicose é uma das fontes predominantes de reserva energética nos insetos, sendo a fonte de energia pós-alimentação para os estágios larval e pupal. Logo, a diminuição no nível desta reserva é prejudicial à fisiologia e ao metabolismo normais dos insetos tratados. A depleção das reservas de carboidrato pode estar ligada à diminuição no nível lipídico devido à mudança no metabolismo energético para o catabolismo lipídico (Sak *et al.*, 2006; Adeniyi *et al.*, 2010; Arrese & Soulages, 2010).

Senthilkumar *et al.* (2009) relatam que os lipídios totais foram reduzidos em *Anopheles stephensi* tratados com extratos de plantas. Lohar & Wright (1993) demonstraram que *Tenebrio molitor* (larva-da-farinha) sofreu depleção lipídica na hemolinfa, corpos gordurosos e oócitos quando exposto ao malation (pesticida organofosforado de uso comercial). O declínio no conteúdo lipídico devido a mudanças no metabolismo energético para o catabolismo lipídico devido ao estresse induzido por fitoquímicos é também relatado por outros autores (Sak *et al.*, 2006).

Gunathilaka *et al.* (2022) consideram, em seu estudo de toxicidade de extrato vegetal sobre larvas de *Ae. aegypti*, que dentre os fatores analisados que poderiam afetar a taxa de mortalidade, a diminuição nos níveis de colesterol foi o fator principal na mediação da morte larval, onde uma redução de 61% no conteúdo de colesterol em relação ao grupo controle correspondeu a 86% de morte larval (3º estágio). Em nosso estudo, observou-se uma redução de 30,9% de colesterol correspondente a 50% de mortalidade (larva no 4º estágio de desenvolvimento).

O colesterol é precursor dos hormônios promotores da muda comumente conhecidos como ecdisteroides, sendo, portanto, necessário para a continuação do ciclo de vida do mosquito, seu crescimento, desenvolvimento e produção de ovos. O comprometimento dos níveis adequados de colesterol essencial, conseqüentemente, impede a manutenção dos níveis hormonais necessários à ecdise, resultando em morte durante os estágios subsequentes de desenvolvimento. O manejo de insetos visando o metabolismo do colesterol, que é um regulador de crescimento essencial para o desenvolvimento de insetos vetores, pode ser eficiente (Kumar *et al.*, 2010; Perera & Wijerathna, 2019).

O acúmulo apropriado de nutrientes durante o desenvolvimento larval regula a síntese de hormônios e promove a maturação reprodutiva influenciando a fertilidade e a fecundidade dos insetos, relacionando-se, assim, à sobrevivência da espécie ao afetar

diretamente a aptidão para sobrevivência e reprodução (Handel, 1985; Caroci *et al.*, 2004). A quantidade de nutrientes armazenados durante o estágio larval dos insetos tem um impacto no seu tempo de desenvolvimento, fecundidade na vida adulta e características da prole (Zirbel *et al.*, 2018). O armazenamento lipídico e a condição nutricional na fase imatura de mosquitos adultos estão diretamente relacionados ao sucesso reprodutivo e à longevidade, sendo o corpo gorduroso um órgão crítico neste processo, uma vez que é o local onde diversos processos metabólicos dependentes da presença de lipídios ocorrem, como oogênese, voo, diapausa e metamorfose (Gondim *et al.*, 2018).

Pode-se ainda correlacionar à descoberta de Chotiwan *et al.* (2018) de que a infecção de *Aedes* pelo vírus da dengue causa perturbações nos perfis lipídicos do intestino médio do mosquito, variáveis nos diferentes estágios da infecção, sendo a abundância e a composição lipídica celular e tecidual crítica para a replicação bem-sucedida dos vírus da dengue (DENVs) nos hospedeiros intermediários. Koh *et al.* (2020) demonstraram que, dentre as 1199 moléculas lipídicas detectadas em *Aedes aegypti*, 47 lipídios (triglicerídeos em sua maioria) foram encontrados em níveis elevados em mosquitos infectados por DENV3 em relação aos mosquitos não infectados. A proteína do capsídeo dos DENVs se associa às membranas de gotículas lipídicas (organelas de armazenamento circundadas por monocamada fosfolipídica) nas células de mosquitos, sendo essas organelas participantes do processo de montagem de partículas virais; um mosquito com reservas lipídicas insuficientes pode apresentar menor competência vetorial (Samsa *et al.* 2009; Saka & Valdivia, 2012).

Samsa *et al.* (2009) relatam que a infecção pelo vírus da dengue está relacionada com a quantidade de gotículas lipídicas nas células, sugerindo ligação entre o metabolismo lipídico e a replicação viral, sendo assim o nível lipídico corporal um possível fator relacionado à replicação dos vírus da dengue.

Fontaine *et al.* (2015) revelaram que a inibição da via glicolítica reduz drasticamente a síntese de RNA de DENVs e a produção de vírions infecciosos, demonstrando a necessidade de glicólise durante a infecção por DENV, uma vez que o DENV induz a via glicolítica para dar suporte à replicação viral eficiente. Heaton & Randall (2010) demonstram que, no contexto da infecção, o vírus da Dengue induz a lipofagia para favorecer sua replicação, ao gerar ATP que presumivelmente sustentaria a replicação viral, levando à diminuição do volume de lipídios e dos níveis celulares de triacilgliceróis. Logo, a inibição da lipólise afetaria negativamente a replicação do vírus da dengue.

A detecção de fosfoetanolaminas glicadas, produto de um grupo hexose conjugado ao grupo amina de fosfoetanolamina em condições hiperglicêmicas (Lertsiri *et al.*, 1998) durante a infecção por DENV é considerada uma bioassinatura metabólica que sugere uma hiperglicemia intracelular associada à infecção nas células de mosquitos. A formação de fosfoetanolaminas glicadas também está ligada ao acúmulo de triglicerídeos (Ravandi *et al.*, 1999). Uma vez que ocorre o aumento da captação celular de glicose para glicólise observada após a infecção por DENVs nas células, um mosquito com menores índices de glicose no organismo, como aqueles tratados com 11Dx, podem apresentar menor competência viral.

Por fim, destaca-se o importante papel do colesterol na replicação do DENV3, conforme evidenciado pela redução da replicação e montagem do vírus em células com níveis reduzidos de colesterol (Rothwell *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2014).

A observação da diminuição dos índices de glicose, triglicerídeos, colesterol e proteínas indica um distúrbio metabólico em larvas tratadas com 11Dx, possivelmente induzido por estresse fisiológico, que pode estar relacionado com a toxicidade promovida pela presença de ROS no trato digestivo das larvas.

Análises de transcriptomas de larvas de *Ae. aegypti* expostas a xenobióticos demonstram que estas sofrem estresse metabólico associado às mudanças em seu ambiente químico devido à resposta de síndrome de adaptação geral: um aumento da mobilização de energia dos tecidos de armazenamento e produção de certas proteínas em excesso, como proteínas de choque térmico, metalotioneínas, glicoproteínas, chaperoninas ou enzimas envolvidas na produção de energia e no catabolismo celular, como NADH desidrogenase, ATP sintase, tripsina e lipases (Lee *et al.*, 2006; Vache *et al.*, 2006; Balamurugan *et al.*, 2009).

Como a infecção pelo DENV necessita do aumento da glicólise e da presença de certos lipídios, como triglicerídeos e colesterol, os níveis corporais de glicose e de lipídios no mosquito devem satisfazer estes requisitos para uma replicação viral eficiente. No presente trabalho as larvas tratadas com concentrações subletais de 11Dx apresentaram diminuição corporal destas biomoléculas e, conforme citado, a condição metabólica de mosquitos adultos oriundos de larvas tratadas e a geração filial subsequente é negativamente afetada nos termos nutricionais.

6 CONCLUSÃO

Dentre as seis frações extraídas dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana* duas (F2 e F6) não apresentaram efeitos tóxicos sobre larvas de *Ae. aegypti*, duas apresentaram baixa atividade (F4 e F5) e duas indicaram um alto potencial de controle para essa o inseto (F1 e F3).

Dentre os três grupos proteicos separados com base em suas massas moleculares obtidos de F1 (P1, P2 e P3), somente um apresentou atividade larvicida (P3).

Dentre os três grupos separados com base em suas massas moleculares obtidos de P3 (PA, PB e PC), somente um apresentou atividade larvicida (PC).

PC apresenta moléculas proteicas e metabólitos secundários, mas a investigação dos seus componentes nos levou ao isolamento de um rotenoide toxico para *Ae. aegypti*.

O metabólito foi identificado como 11-Desoxiclitoriactal, apresentou CL_{50} igual a 28,29 ppm contra larvas de quarto estágio, emitiu fluorescência intrínseca quando excitado em 365nm e, quando administrado às larvas, se distribuiu ao longo de todo seu corpo, desde a cabeça passando pelo trato digestivo até os túbulos de Malpighi.

O tratamento de larvas com o rotenoide ocasionou: geração de espécies reativas de oxigênio, reduzidos níveis de acidificação do trato digestivo; diminuição dos níveis corporais de proteínas, glicose, colesterol e triglicerídeos; formação de pseudotumores melanocíticos.

7 REFERENCIAL TEÓRICO

ACHEE, Nicole L. *et al.* A critical assessment of vector control for dengue prevention. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003655, 2015.

ACHEE, Nicole L. *et al.* Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006822, 2019.

ADENIYI, S. A. *et al.* Preliminary phytochemical analysis and insecticidal activity of ethanolic extracts of four tropical plants (*Vernonia amygdalina*, *Sida acuta*, *Ocimum gratissimum* and *Telfaria occidentalis*) against beans weevil (*Acanthscelides obtectus*). **Int. J. Phys. Sci**, v. 5, n. 6, p. 753-762, 2010.

AGATI, Giovanni *et al.* Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant science**, v. 196, p. 67-76, 2012.

AGRAWAL, ANURAG A.; KARBAN, RICHARD. Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. **The ecology and evolution of inducible defenses**, v. 10, 1999.

AHARONI, Asaph; JONGSMA, Maarten A.; BOUWMEESTER, Harro J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in plant science**, v. 10, n. 12, p. 594-602, 2005.

ALSHEHRI, Mohammed Ali *et al.* Phytochemical analysis of *Rhazya stricta* extract and its use in fabrication of silver nanoparticles effective against mosquito vectors and microbial pathogens. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134443, 2020.

AMEN, Yhiya M. *et al.* The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural product research**, v. 29, n. 15, p. 1388-1405, 2015.

ANOOPKUMAR, A. N.; ANEESH, Embalil Mathachan; SUDHIKUMAR, Ambalaparambil Vasu. Exploring the mode of action of isolated bioactive compounds by induced reactive oxygen species generation in *Aedes aegypti*: a microbes based double-edged weapon to fight against Arboviral diseases. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 40, n. 3, p. 573-585, 2020.

ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.

ATKINSON, Nicky J.; URWIN, Peter E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.

BALAMURUGAN, Kuppusamy *et al.* Mercury and cadmium trigger expression of the copper importer Ctr1B, which enables *Drosophila* to thrive on heavy metal-loaded food. **Biological chemistry**, v. 390, n. 2, p. 109-113, 2009.

BALLHORN, Daniel J. *et al.* Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5450, 2009.

BAUD, David *et al.* An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099-2109, 2017.

BAUER, G. Signaling and proapoptotic functions of transformed cell-derived reactive oxygen species. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 66, n. 1, p. 41-56, 2002.

BELMAIN, Steven R. *et al.* Highly variable insect control efficacy of *Tephrosia vogelii* chemotypes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 40, p. 10055-10063, 2012.

BELOFSKY, Gil *et al.* Antimicrobial and antiinsectan phenolic metabolites of *Dalea searlsiae*. **Journal of natural products**, v. 77, n. 5, p. 1140-1149, 2014.

BENELLI, Giovanni; JEFFRIES, Claire L.; WALKER, Thomas. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. **Insects**, v. 7, n. 4, p. 52, 2016.

BERENS, Matthias L. *et al.* Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 6, p. 2364-2373, 2019.

BERENS, Matthias L. *et al.* Evolution of hormone signaling networks in plant defense. **Annual review of phytopathology**, v. 55, p. 401-425, 2017.

BERTONCELI, Maria A. A. *et al.* A vicilin-like protein extracted from *Clitoria fairchildiana* cotyledons was toxic to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 184, p. 105129, 2022b.

BERTONCELI, Maria A. A. *et al.* Rotenoids from *Clitoria fairchildiana* R. Howard (Fabaceae) seeds affect the cellular metabolism of larvae of *Aedes aegypti* L.(Culicidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 186, p. 105167, 2022a.

BESERRA, Eduardo B. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) populations to organophosphates temephos in the Paraíba State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 303-307, 2007.

BEYENBACH, Klaus W. Energizing epithelial transport with the vacuolar H⁺-ATPase. **Physiology**, v. 16, n. 4, p. 145-151, 2001.

BEYENBACH, Klaus W.; PANNABECKER, Thomas L.; NAGEL, Wolfram. Central role of the apical membrane H⁺-ATPase in electrogenesis and epithelial transport in Malpighian tubules. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 9, p. 1459-1468, 2000.

BHATT, Samir *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BICOUT, D. J.; CHALVET-MONFRAY, K.; SABATIER, P. Infection persistence time of *Aedes* breeding habitats. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 305, n. 3-4, p. 597-603, 2002.

BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. An introduction to the study of insects. **Saunders college publishing**, 6 ed. 1989.

BOSIRE, Carren M. *et al.* Larvicidal activities of the stem bark extract and rotenoids of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis* on *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 531-535, 2014.

- BOYER, Sébastien *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to deltamethrin, permethrin, and temephos in Cambodia. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v. 30, n. 2, p. 158-166, 2018.
- BRAGA, Ima Aparecida *et al.* *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203, 2004.
- BROCK, N. L.; DICKSCHAT, J. S. Biosynthesis of terpenoids. **Nat. Prod**, v. 17, p. 2693-2732, 2013.
- BÜCHI, G. *et al.* 553. The absolute configuration of rotenone. **Journal of the Chemical Society**, p. 2843-2860, 1961.
- BUTSELAAR, Tijmen; ACKERVEKEN, Guido. Salicylic acid steers the growth–immunity tradeoff. **Trends in plant science**, v. 25, n. 6, p. 566-576, 2020.
- CARNEIRO, MAC *et al et al.* Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.
- CAROCI, Abraham S.; LI, Yiping; NORIEGA, Fernando G. Reduced juvenile hormone synthesis in mosquitoes with low teneral reserves reduces ovarian previtellogenic development in *Aedes aegypti*. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 15, p. 2685-2690, 2004.
- CARTON, Yves *et al.* Dexamethasone inhibition of the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against a parasitoid. **The Journal of parasitology**, p. 405-407, 2002.
- CARVALHO, Maria do Socorro Laurentino de *et al.* Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 623-629, 2004.
- CASTRO, Mariana S.; FONTES, Wagner. Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein and Peptide letters**, v. 12, n. 1, p. 11-16, 2005.
- CAVOSKI, Ivana *et al.* Natural pesticides and future perspectives. **Pesticides in the modern world-pesticides use and management**, p. 169-190, 2011.
- CERENIUS, Lage; LEE, Bok Luel; SÖDERHÄLL, Kenneth. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.
- CHAN, Jasper FW *et al.* Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507-524, 2016.
- CHEENPRACHA, Sarot *et al.* Cytotoxic rotenoloids from the stems of *Derris trifoliata*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 1019-1022, 2007.
- CHELLAPPANDIAN, Muthiah *et al.* Target and non-target botanical pesticides effect of *Trichodesma indicum* (Linn) R. Br. and their chemical derivatives against the dengue vector, *Aedes aegypti* L. **Environmental science and pollution research**, v. 26, p. 16303-16315, 2019.
- CHHABRA, M. *et al.* Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. **Indian journal of medical microbiology**, v. 26, n. 1, p. 5-12, 2008.

- CHOTIWAN, Nunya *et al.* Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 2, p. e1006853, 2018.
- CHRISTENSEN, Bruce M. *et al.* Melanization immune responses in mosquito vectors. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 4, p. 192-199, 2005.
- CIOTA, Alexander T.; KEYEL, Alexander C. The role of temperature in transmission of zoonotic arboviruses. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1013, 2019.
- CLEMENTS, Alan Neville *et al.* **The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction**. Chapman & Hall, 1993.
- CLETON, Natalie *et al.* Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.
- COFFEY, L. L. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176. 2013.
- CORBEL, V. *et al.* Tracking insecticide resistance in mosquito vectors of arboviruses: the Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005054. 2016.
- CORREIA JÚNIOR, C. A. B. *et al.* Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 60-66. 2007.
- COSTA, L. G.; SILVA, A. G; GOMES, D. R. Morfologia de frutos, sementes e plântulas, e anatomia das sementes de sombreiro (*Clitoria fairchildiana*). **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 4, p. 414-421. 2014.
- CROMBIE, L. Rotenoids and their biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 1, n. 1, p. 3-19, 1984.
- CROMBIE, Leslie; WHITING, Donald A. Review article number 135 biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1479-1507, 1998.
- CUI, Haitao; TSUDA, Kenichi; PARKER, Jane E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 487-511, 2015.
- CUNHA, Marcella Pereira *et al.* Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 441-444, 2005.
- DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 5, p. 1402-1419. 2011.
- DANG, Liuyi; VAN DAMME, Els JM. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, v. 117, p. 51-64, 2015.
- DANGL, Jeffery L.; HORVATH, Diana M.; STASKAWICZ, Brian J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 746-751, 2013.
- DANTZGER, M. Inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk isolado de sementes de *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae): caracterização e atividade biológica sobre *Anagasta kuehniella* e *Corcyra*

cephalonica. 143 p. Tese Doutorado - **Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia**, Campinas, SP. 2014.

DARRIET, Frédéric *et al.* Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2010.

DARRIET, Frederic; CHANDRE, Fabrice. Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Pest management science**, v. 69, n. 8, p. 905-910, 2013.

DAVID, Jean-Philippe *et al.* Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. **BMC genomics**, v. 11, p. 1-12, 2010.

DAVID, Jorge M. *et al.* Antifungal activities of rotenoids from seeds and roots of *Clitoria fairchildiana*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 83-89, 2018.

DAWSON, V. K. *et al.* Rotenone persistence in freshwater ponds: effects of temperature and sediment adsorption. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 11, n. 2, p. 226-231, 1991.

DEDERER, H.; WERR, M.; IIG, T. Differential sensitivity of *Ctenocephalides felis* and *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in recombinant hybrid receptors to nicotinoids and neonicotinoid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 51-61, 2011

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 81-106. 2007.

DEVI, Urbbi; BORA, Dipsikha. Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 787-791, 2017.

DEWICK, Paul M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **John Wiley & Sons**, ed. 3, 2009.

DEYOU, Tsegaye *et al.* Rotenoids, flavonoids, and chalcones from the root bark of *Millettia usaramensis*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 12, p. 2932-2939, 2015.

DICKENS, Borame Lee *et al.* Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **BMJ global health**, v. 3, n. 4, p. e000801, 2018.

DIMOPOULOS, George. Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2003.

DODDS, Peter N.; RATHJEN, John P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de saúde pública**, v. 51, 2017.

- DONG Y, MANFREDINI F, DIMOPOULOS G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000423. 2009.
- DUCKE, A. Notas sobre a flora neotrópica: as leguminosas da Amazônia Brasileira. [Boletim Técnico, 18] **Instituto Agrônomo do Norte**. 248p. 1949.
- DUCKE, A.; BLACK, G. A. Notas sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira. Boletim Técnico Instituto Agrônomo Norte, v.29, p.1-69, 1953.
- DUONG, Tran Thanh *et al.* Mapping insecticide resistance in dengue vectors in the northern Viet Nam, 2010–2013. **Vector Biol J**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2016.
- DUPUIS, Laurence *et al.* Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.
- DUSFOUR, Isabelle *et al.* Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007615, 2019.
- EDWARDS, Marten J.; JACOBS-LORENA, Marcelo. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 9, p. 1313-1320, 2000.
- ERB, Matthias; REYMOND, Philippe. Molecular interactions between plants and insect herbivores. **Annual review of plant biology**, v. 70, p. 527-557, 2019.
- ERLANGER, T. E.; KEISER, J.; UTZINGER, J. Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Medical and veterinary entomology*, v. 22, n. 3, p. 203-221. 2008.
- ESCOBAR, María del Carmen *et al.* Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. **Revista Médica Electrónica**, v. 40, n. 1, p. 120-128, 2018.
- FALKOWSKI, Michaël *et al.* Towards the optimization of botanical insecticides research: *Aedes aegypti* larvicidal natural products in French Guiana. **Acta Tropica**, v. 201, p. 105179, 2020.
- FANG, Nianbai; CASIDA, John E. Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3380-3384, 1998.
- FANG, Nianbai; CASIDA, John E. New bioactive flavonoids and stilbenes in cubé resin insecticide. **Journal of natural products**, v. 62, n. 2, p. 205-210, 1999.
- FARNESI, L. C. *et al.* Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 124-126. 2009.
- FATO, Romana *et al.* Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1787, n. 5, p. 384-392, 2009.

FENG, Yu; FORGAC, M. Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H⁺)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 5817-5822, 1992.

FERNANDES, C. de F. *et al.* Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa**, 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 48, p. 233-234. 2015.

FOLEY, Edan; O'FARRELL, Patrick H. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. **Genes & development**, v. 17, n. 1, p. 115-125, 2003.

FOLLMER, Cristian *et al.* Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5. 1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 217-224, 2001.

FONTAINE, Krystal A. *et al.* Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication. **Journal of virology**, v. 89, n. 4, p. 2358-2366, 2015.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. **EDUSP, São Paulo** vol. 2, p. 549. 2002.

FORGE, F. B.; HALLER, H. L.; SMITH, L. E. The Determination of the structure of rotenone. **Chem Rev**; 18: 181-213, 1933.

FOSEN, T. *et al.* Spectroscopic techniques applied to flavonoids. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**, p. 37-142, 2006.

FRANCO, Octávio L. *et al.* Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European journal of biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.

FRIERSON, J. G. The yellow fever vaccine: a history. **The Yale journal of biology and medicine**. v. 83, n. 2, p. 77. 2010.

FRITZ, Robert S.; SIMMS, Ellen L. Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics. **University of Chicago Press. 1992**

FRITZ, Wayne A. *et al.* Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 12, p. 2151-2158, 1998.

FUKAMI, HIROSHI; NAKAJIMA, MINORU. Rotenone and the rotenoids. **Naturally occurring insecticides**, p. 71-97, 1971.

GAIO, A. *et al.* Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). **Parasites & vectors**. v. 4, n. 1, p. 1-10. 2011.

GARCÍA, Adolfo Ávalos; CARRIL, Elena Pérez-Urria. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, 2011.

GARCIA, G.; DAVID, M.; MARTINS, A.; MACIEL, R. F.; LINSS, J.; ARAÚJO, S. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 12, n. 2, p. e0006227. 2018.

GARCIA, José *et al.* Synthesis of deguelin–biotin conjugates and investigation into deguelin's interactions. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 2, p. 672-680, 2012.

GEOFFREY, E., J. **Pharm. Chim.**, 26, 45, 1892.

GERHÄUSER, Clarissa *et al.* Rotenoids mediate potent cancer chemopreventive activity through transcriptional regulation of ornithine decarboxylase. **Nature medicine**, v. 1, n. 3, p. 260-266, 1995.

GHAZARIAN, Haike; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

GHOSH, Anupam; CHOWDHURY, Nandita; CHANDRA, Goutam. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **The Indian journal of medical research**, v. 135, n. 5, p. 581, 2012.

GONDIM, Katia C. *et al.* Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 101, p. 108-123, 2018.

GRATÃO, L. H. A. *et al* Phenolic compounds Em: NASCIMENTO , G. N.; PEREIRA, R. J Vegetables bioactive compounds. **Pharmacology and toxicology of natural products** 1 ed, 2016.

GRDIŠA, Martina; GRŠIĆ, Kristina. Botanical insecticides in plant protection. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 78, n. 2, p. 85-93, 2013.

GRÜBER, Gerhard *et al.* Structure–function relationships of A-, F-and V-ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 15, p. 2597-2605, 2001.

GUAJARÁ, M. *et al.* Aspectos da Biologia de *Euphalerus Clitoriae* Burckhardt & Guajará, 2000 (Hemiptera: Psyllidae) sob Condições de Campo. **Floresta e Ambiente**. v.10, p.69- 75, 2003

GUBLER, D. J. Prevention and control of *Aedes aegypti*-borne diseases: lesson learned from past successes and failures. **AsPac J Mol Biol Biotechnol**. v. 19, n. 3, p. 111-4. 2011.

GUNATHILAKA, Nayana *et al.* Larvicidal activity of the pericarp extract of *Garcinia mangostana* against dengue vector *Aedes aegypti* in Sri Lanka. 2022.

GUSMÃO, D. S. *et al.* First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, n. 8, p. 919-924. 2007.

GUTIÉRREZ, Marcelino *et al.* Rotenoides bioactivos de la raíz de *Lonchocarpus pentaphyllus*. **Tecnociencia**, v. 7, n. 1, p. 81-88, 2005.

GUTIERREZ, Marlen *et al.* Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87412, 2014.

GUTIERREZ, Marlén; CASTELLANOS, Jaime E.; GALLEGO-GÓMEZ, Juan C. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. **Intervirolgy**, v. 54, n. 4, p. 202-216, 2011.

HA, Eun-Mi *et al.* A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. **Science**, v. 310, n. 5749, p. 847-850, 2005.

HA, Eun-Mi *et al.* An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. **Developmental cell**, v. 8, n. 1, p. 125-132, 2005.

HADDI, K. *et al.* Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 1-9. 2017.

HAMMOND-KOSACK, Kim E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773, 1996.

HAN, Xiaowei; KAHMANN, Regine. Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 822, 2019.

HANDEL, Emile. Nutrient accumulation in three mosquitoes during larval development and its effect on young adults. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 4, n. 3, p. 374-376, 1988.

HARBORNE, Jeffrey B. Introduction to ecological biochemistry, 4 ed. **Academic press**, 2014.

HARSHBARGER, John C.; TAYLOR, Ronald L. Neoplasms of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 13, n. 1, p. 159-190, 1968.

HASAN, Hadura Abu *et al.* Pyrethroid and organophosphate susceptibility status of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Penang, Malaysia. **International Journal of Entomological Research**, v. 3, n. 3, p. 91-95, 2015.

HE, Congcong; KLIONSKY, Daniel J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual review of genetics**, v. 43, 2009.

HEATON, Nicholas S.; RANDALL, Glenn. Dengue virus and autophagy. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1332-1341, 2011.

HEGNAUER, Robert; GPAYER-BARKMEIJER, Renpe J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.

HELLINGER, Roland; GRUBER, Christian W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 9, p. 1877-1889, 2019.

HEMINGWAY, Janet *et al.* The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 7, p. 308-312, 2006.

HENRY, L. K. *et al.* Contribution of isopentenyl phosphate to plant terpenoid metabolism. **Nature Plants**. v. 4, p. 721–729, 2018.

HERBERT, Richard B. The biosynthesis of secondary metabolites. **Springer Science & Business Media**. 1989.

HOSSEINZADEH, Z.; RAMAZANI, A.; RAZZAGHI-ASL, N. Plants of the Genus *Heracleum* as a Source of Coumarin and Furanocoumarin. **Journal of Chemical Reviews**, v. 1, n. 2, p. 78-98, 2019.

HOUARD, J.-M. *et al.* Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. **Bulletin of entomological research**, v. 93, n. 6, p. 491-498, 2003.

HUANG, Ju; LAM, Grace Y.; BRUMELL, John H. Autophagy signaling through reactive oxygen species. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 11, p. 2215-2231, 2011.

HUONG, Vu Duc; THI BACH NGOC, Nguyen. Susceptibility of *Aedes aegypti* to Insecticides in South Vietnam. 1999.

INOCENTE, E.A. *et al.* Insecticidal and antifeedant activities of Malagasy medicinal plant (*Cinnamosma* sp.) extracts and drimane-type sesquiterpenes against *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insects**. 10(11), 373, 2019.

ISAH, T. Stress and Defense Responses in Plant Secondary Metabolites Production. **Biological Research**. v. 52, n. 39, p. 52-39, 2019.

ISHIMI, Yoshiko *et al.* Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1893-1900, 1999.

ISMAN, Murray B. Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. **Industrial crops and products**, v. 110, p. 10-14, 2017.

JAIN, Deepti; KHURANA, Jitendra Paul. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. **Molecular aspects of plant-pathogen interaction**, p. 265-281, 2018.

JIRAKANJANAKIT, Nuananong *et al.* Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 2, p. 545-550, 2014.

KALAYANAROOJ, Siripen. Clinical manifestations and management of dengue/DHF/DSS. **Tropical medicine and health**, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S83-S87, 2011.

KANNATHASAN, K.; SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V. Mosquito larvicidal activity of methyl-p-hydroxybenzoate isolated from the leaves of *Vitex trifolia* Linn. **Acta Tropica**. v. 120, n. 1-2, p. 115-118. 2011.

KARBAN, Richard; BALDWIN, Ian T. Induced responses to herbivory. **University of Chicago Press**, 2007.

KARTHI, S. *et al.* Biological effects of *Avicennia marina* (Forssk.) vierh. extracts on physiological, biochemical, and antimicrobial activities against three challenging mosquito vectors and microbial pathogens. **Environmental Science and Pollution Research**. 2020.

KHAN, Shamshad A. *et al.* In Vitro Manipulations for Value Addition in Potent Herbal Insecticidal Activities of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. **Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization**, p. 395-416, 2018.

KIM, C. H; LAMPMAN, R. L.; MUTURI, E. J. Bacterial communities and midgut microbiota associated with mosquito populations from waste tires in East-Central Illinois. **Journal of Medical Entomology**. v. 52, n. 1, p. 63-75. 2015.

KOH, Cassandra *et al.* Dengue virus dominates lipid metabolism modulations in Wolbachia-coinfected *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 518, 2020.

KORTBEEK, R. W. J.; VAN DER GRAGT, M.; BLEEKER, P. M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**. v. 154, n. 1, p. 67-90, 2019.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. **Biopesticides International**. v. 4, n. 1, p. 63-84, 2008.

KOVENDAN, K. *et al.* S. Larvicidal activity of Morinda citrifolia L.(Noni)(Family: Rubiaceae) leaf extract against Anopheles stephensi, Culex quinquefasciatus, and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**. v. 111, n. 4, p. 1481-1490. 2012.

KRAEMER, Moritz UG *et al.* The global compendium of *Aedes aegypti* and Ae. albopictus occurrence. **Scientific data**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2015.

KUMAR, R. Barani *et al.* A search for mosquito larvicidal compounds by blocking the sterol carrying protein, AeSCP-2, through computational screening and docking strategies. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 4, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**. v. 2013, p. 10-16, 2013.

KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of Mentha piperita essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 1, n. 2, p. 85-88. 2011.

KUMAR, Sanjeev *et al.* The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in Anopheles gambiae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14139-14144, 2003.

KUŚNIERCZYK, Anna *et al.* Transcriptional responses of Arabidopsis thaliana ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous Myzus persicae and oligophagous Brevicoryne brassicae. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 10, p. 2537-2552, 2007.

LABBÉ, P. *et al.* Evolution of resistance to insecticide in disease vectors. Em: EWALD, Paul W. Genetics and evolution of infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 739, 2011.

LACORTE, Silvia; EHRESMANN, Nadia; BARCELÓ, Damià. Persistence of temephos and its transformation products in rice crop field waters. **Environmental science & technology**, v. 30, n. 3, p. 917-923, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.

LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2011.

LATTANZIO, V. *et al.* Low Temperature Metabolism of Apple Phenolics and Quiescence of Phlyctaena vagabonda. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, n. 12, p. 5817-5821, 2001.

LAZO, C. R.; GUILLOT, T. S.; MILLER, G. W. cap. **ROTENONE**. Em: DAROFF, Robert B.; AMINOFF, Michael J. **Encyclopedia of the neurological sciences**. Academic press, 2014.

LEE, Soon-Mi *et al.* Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074-1081, 2006.

LEONG, C. S., Vythilingam, I., WONG, M. L., WAN Sulaiman, W.-Y., & LAU, Y. L. *Aedes aegypti*(Linnaeus) larvae from dengue outbreak areas in Selangor showing resistance to pyrethroids but susceptible to organophosphates. **Acta Tropica**, 185, 115–126. 2018.

LERTSIRI, Sittiwat; SHIRAIISHI, Mayumi; MIYAZAWA, Teruo. Identification of deoxy-D-fructosyl phosphatidylethanolamine as a non-enzymic glycation product of phosphatidylethanolamine and its occurrence in human blood plasma and red blood cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 893-901, 1998.

LEUNER, Olga *et al.* Cytotoxic constituents of *Pachyrhizus tuberosus* from Peruvian amazon. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 10, p. 1934578X1300801022, 2013.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. Factors responsible for the emergence of arbovirus; strategies, challenges and limitation for their control. **Emerging Microbes & Infections**. v. 4, n. 3, p. e18, 2015a.

LIANG, Yaping *et al.* Toxicity of amorphigenin from the seeds of *Amorpha fruticosa* against the larvae of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3238-3254, 2015.

Lima, E. P., de Oliveira Filho, A. M., de Oliveira Lima, J. W., Ramos Júnior, A. N., de Góes Cavalcanti, L. P., & Pontes, R. J. S. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(3), 259–263, 2006.

LIMA, Estelita Pereira *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2011.

LIMA, José Bento Pereira *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIN, D. *et al.* An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**. v. 21, n. 10, p.1-19, 2016.

LING, Nicholas. Rotenone--a review of its toxicity and use for fisheries management. **Science for conservation**, v. 211, p. 1-40, 2003.

LINSER, Paul J.; DINGLASAN, Rhoel R. Insect gut structure, function, development and target of biological toxins. **Advances in insect physiology**, v. 47, p. 1-37, 2014.

LINSER, Paul J. *et al.* Carbonic anhydrases and anion transport in mosquito midgut pH regulation. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 11, p. 1662-1671, 2009.

LIPPI, Catherine A. *et al.* Geographic shifts in *Aedes aegypti* habitat suitability in Ecuador using larval surveillance data and ecological niche modeling: Implications of climate change for public health vector control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007322, 2019.

LIU, Liang E. *et al.* Clinical update on dengue, chikungunya, and Zika: what we know at the time of article submission. **Disaster medicine and public health preparedness**, v. 11, n. 3, p. 290-299, 2017.

LIU, Qingzhen; CLEM, Rollie J. Defining the core apoptosis pathway in the mosquito disease vector *Aedes aegypti*: the roles of iap1, ark, dronc, and effector caspases. **Apoptosis**, v. 16, p. 105-113, 2011.

LOHAR, M. K.; WRIGHT, D. J. Changes in the lipid content in haemolymph, fat body and oocytes of malathion treated *Tenebrio molitor* L. Adult females. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 25, p. 57-57, 1993.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 5, n. 3, p. 10-10. 2014.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. **Nova Odessa**. v. 1, n. 1, p. 1. 1992.

LU, Hua; MCCLUNG, C. Robertson; ZHANG, Chong. Tick tock: circadian regulation of plant innate immunity. **Annual review of phytopathology**, v. 55, p. 287-311, 2017.

LUCKHART, Shirley *et al.* Sustained activation of Akt elicits mitochondrial dysfunction to block *Plasmodium falciparum* infection in the mosquito host. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003180, 2013.

LUNA, Jonny E. Duque *et al.* Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 842-843, 2004.

LUO, Yu-Wei *et al.* Effect of sprouting on amino acids, protein solubility and availability in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 4, p. 531-536, 2014.

LUYENGI, Lumonadio *et al.* Rotenoids and chalcones from *Mundulea sericea* that inhibit phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1523-1526, 1994.

LYU, Su Yun; CHOI, Sang Ho; PARK, Won Bong. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. **Archives of pharmacal research**, v. 25, p. 93-101, 2002.

M JONES, R.; W MERCANTE, J.; S NEISH, A. Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1519-1529, 2012.

MACIEL, M. V. *et al.* Plant extracts used in the control of dipteran vectors of zoonosis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 105-112, 2010.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-145, 1954.

MACORIS, Maria de Lourdes da Graça *et al.* Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 895-900, 2007.

MANDA, H. *et al.* Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. **Malaria journal**, v. 6, n. 1, p. 1-11. 2007.

MANJARRES, A S.; OLIVERO, J. V. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. **Revista costarricense de salud pública**, v. 22, n. 1, p. 68-75. 2013.

MARCOMBE, S. *et al.* Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 13, n. 12, p. e0007852. 2019.

MATHIAS, Leda *et al.* Isolation and structural elucidation of a novel rotenoid from the seeds of *Clitoria fairchildiana*. **Natural Product Research**, v. 19, n. 4, p. 325-329, 2005.

MATHIAS, Leda; MORS, Walter B.; PARENTE, JoséP. Rotenoids from seeds of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1449-1451, 1998.

MATSUDA, Hisashi *et al.* Rotenoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 3, p. 1539-1546, 2007.

MATTHEWS, B. J. *et al.* O genoma de referência aprimorado do *Aedes aegypti* informa o controle vetorial da arbovirose. **Natureza**. 563(7732), 501-507. 2018.

MBING, Joséphine Ngo *et al.* Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. **Phytochemistry**, v. 63, n. 4, p. 427-431, 2003.

MICHAUD, D. *et al.* Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. **Physiologia Plantarum**, v. 90, n. 3, p. 497-503. 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.

MINARD, G. *et al.* Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 1, p. 63-73. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica (SE) 38 e febre de chikungunya até a SE 39 de 2014**, v. 45, n. 23, p. 1-6, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE.: Monitoramento dos casos de dengue Vol.52 - Nº 43. **Boletim Epidemiológico GOV**. 2022

MIRANDA, Demócrito de Barros *et al.* Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. **American journal of public health**, v. 106, n. 4, p. 598-600, 2016.

MITHÖFER, Axel *et al.* General mechanisms of plant defense and plant toxins. In: **Plant toxins**. Springer, 2016. p. 1-22.

MITHÖFER, Axel; BOLAND, Wilhelm. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 431-450, 2012.

MONDET, B. *et al.* isolation of yellow fever virus from nulliparous haemagogus (haemagogus) janthinomys in eastern amazonia. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 1, p. 47-50. 2002.

MONTELLA, Isabela Reis *et al.* Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MORIN, Cory W.; COMRIE, Andrew C.; ERNST, Kacey. Climate and dengue transmission: evidence and implications. **Environmental health perspectives**, v. 121, n. 11-12, p. 1264-1272, 2013.

MOTA, M. T. D. *et al.* Mosquito-transmitted viruses-the great Brazilian challenge. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 38-50. 2016.

MOUCHET, L. Résistance aux insecticides des *Aedes* dans les régions d'Asie du Sud-Est et du Pacifique. **Cah.ORSTOM, sér Ent méd, et Parasitol.** 1972.

MOURA, J. C. M. S. *et al.* Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **Journal of integrative plant biology**, v. 52, n. 4, p. 360-376, 2010.

MOURÃO, M. P. G. *et al.* Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 20-26. 2015.

MOYES, C. L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005625. 2017.

MUTURI, E. J. *et al.* Host blood-meal source has a strong impact on gut microbiota of *Aedes aegypti*. **FEMS microbiology ecology**, v. 95, n. 1, p. fiy213. 2019.

MUTURI, E. J. *et al.* Midgut fungal and bacterial microbiota of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* shift in response to La Crosse virus infection. **Molecular ecology**, v. 25, n. 16, p. 4075-4090. 2016.

NAJDA, A. *et al.* Identification and Profile of Furanocoumarins from the Ribbed Celery (*Apium Graveolens* L Var. Dulce Mill./Pers.). **Food Science and Technology Research**, v. 21, n. 1, p. 67-75, 2015.

NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 5, p. 443-459, 2005.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Cytotoxic reactions associated with insect immunity. **Phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system**, p. 329-348, 2001.

NAPPI, A.; POIRIE, Marylene; CARTON, Yves. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. **Advances in parasitology**, v. 70, p. 99-121, 2009.

NAPPI, A.; POIRIE, Marylene; CARTON, Yves. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. **Advances in parasitology**, v. 70, p. 99-121, 2009.

NAPPI, Anthony J. *et al.* Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. **Nitric oxide**, v. 4, n. 4, p. 423-430, 2000.

NAPPI, Anthony J. *et al.* Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. **European journal of cell biology**, v. 68, n. 4, p. 450-456, 1995.

NELSON, Nathan. Evolution of organellar proton-ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1100, n. 2, p. 109-124, 1992.

NGUYEN, Huu-Hung *et al.* Two new phenolic compounds from *Boerhavia erecta* collected in Vietnam. **Natural Product Research**, p. 1-8, 2022.

NOBORI, Tatsuya; TSUDA, Kenichi. The plant immune system in heterogeneous environments. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 50, p. 58-66, 2019.

NUNES, R. D. *et al.* Polyphenol-rich diets exacerbate AMPK-mediated autophagy, decreasing proliferation of mosquito midgut microbiota, and extending vector lifespan. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005034. 2016.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-biological interactions**, v. 80, n. 1, p. 1-41, 1991.

OLIVEIRA, José Henrique M. *et al.* Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005525, 2017.

OLIVEIRA, L. *et al.* Trypsin inhibitor from *Clitoria fairchildiana* cotyledons is active against digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Protein and Peptide letters**, v. 22, n. 10, p. 893-902. 2015.

ONKEN, Horst; MOFFETT, David F. Revisiting the cellular mechanisms of strong luminal alkalization in the anterior midgut of larval mosquitoes. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 3, p. 373-377, 2009.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Documento Técnico Para La Implementación De Intervenciones Basado En Escenarios Operativos Genéricos Para El Control Del *Aedes aegypti*. **OPS, Washington**. 2019.

OZEKER, E. Phenolic compounds and their importance. **Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute**, v. 9, p. 114-124, 1999.

PAGARE, S. *et al.* Secondary Metabolites of Plants and Their Role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 293-304, 2015.

PAL, M. *et al.* Isoflavonoid C-glycoside from *Stephania glabra*. **Fitoterapia (Milano)**, v. 66, n. 5, 1995.

PANGKAM, Nattapong; CHIMSOOK, Thitiphan. The structure activity relationship and cytotoxicity between stemonal and 6-deoxyclitoriacetal. In: **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications Ltd, 2013. p. 698-702.

PANNABECKER, THOMAS L.; ANESHANSLEY, DANIEL J.; BEYENBACH, KLAUS W. Unique electrophysiological effects of dinitrophenol in Malpighian tubules. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 263, n. 3, p. R609-R614, 1992.

PARK, Hye-Mi *et al.* Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 2, p. 405-410, 2011.

PAULA, J.E.; ALVES, J.L.H.. Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso. Brasília, DF: **Fundação Mokiti Okada – MOA**. 543 p. 1997.

PAVELA, Roman *et al.* Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta tropica**, v. 193, p. 236-271, 2019.

PAVELA, Roman *et al.* Selective effects of the extract from *Angelica archangelica* L. against *Harmonia axyridis* (Pallas)—an important predator of aphids. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 87-92, 2013.

PAVELA, Roman. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial crops and products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

PAVELA, Roman. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects—a review. **Plant Protection Science**, v. 52, n. 4, p. 229-241, 2016.

PAVELA, Roman. Insecticidal properties of Pimpinella anisum essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 287-293, 2014.

PENNINCKX, Iris AMA *et al.* Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, n. 12, p. 2103-2113, 1998.

PEREIRA, A. V. *et al.* Tannins obtained from medicinal plants extracts against pathogens: antimicrobial potential. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, **Formatex Research Center**, p. 228-235, 2015.

PERERA, Hirunika; WIJERATHNA, Tharaka. Sterol carrier protein inhibition-based control of mosquito vectors: Current knowledge and future perspectives. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2019, 2019.

PHRUTIVORAPONGKUL, Ampai *et al.* Studies on the constituents of seeds of *Pachyrrhizus erosus* and their anti herpes simplex virus (HSV) activities. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 50, n. 4, p. 534-537, 2002.

PILAQUINGA, F. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L.(Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Plos one**, v. 14, n. 10, p. e0224109. 2019.

PORTELA, R.C.Q.; SILVA, I.L.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Crescimento inicial de mudas de *Clitoria fairchildiana* Howard e *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. em diferentes condições de sombreamento. **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2,p. 163-170, 2001.

POWELL, Jeffrey R.; GLORIA-SORIA, Andrea; KOTSAKIOZI, Panayiota. Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. **Bioscience**, v. 68, n. 11, p. 854-860, 2018.

PRATHEEBA, T. *et al.* Antidengue potential of leaf extracts of *Pavetta tomentosa* and *Tarenna asiatica* (Rubiaceae) against dengue virus and its vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, 5(11):1-10, (2019).

PUTHOFF, David P. *et al.* Hfr-2, a wheat cytolytic toxin-like gene, is up-regulated by virulent Hessian fly larval feeding. **Molecular plant pathology**, v. 6, n. 4, p. 411-423, 2005.

QUINLAN, Casey L. *et al.* Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 304-312, 2013.

RAD, Hesamaddin Hejazy *et al.* Tyrosinase-related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells. **Experimental cell research**, v. 298, n. 2, p. 317-328, 2004.

RAHUMAN, A. A. *et al.* Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenes derived from *Ficus racemosa* Linn. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 333-339. 2008.

RAI, M.; CARPINELLA, M.C. Pesticides based on plant essential oils p. 178. Em: Naturally Occurring Bioactive Compounds: from traditional practice to commercialization **Elsevier Science Ltd**; Amsterdam, The Netherlands, v. 3, 2006.

RANSON, H. *et al.* Insecticide resistance in dengue vectors. **TropIKA. net**, v. 1, n. 1. 2010.

RASKIN, Ilya *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RASLI, Rosilawati *et al.* Susceptibility status and resistance mechanisms in permethrin-selected, laboratory susceptible and field-collected *Aedes aegypti* from Malaysia. **Insects**, v. 9, n. 2, p. 43, 2018.

RATTAN, Rameshwar Singh. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop protection**, v. 29, n. 9, p. 913-920, 2010.

RAVANDI, Amir; KUKSIS, Arnis; SHAIKH, Nisar A. Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesteryl esters and triacylglycerols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16494-16500, 1999.

REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 261-273. 2007.

REYNAUD, Joël *et al.* Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 4, p. 504-515, 2005.

ROBERTS, Margaret F.; STRACK, Dieter; WINK, Michael. Biosynthesis of alkaloids and betalains. **Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**, p. 20-91, 2010.

ROCHE, Hélène; BUET, Astrid; RAMADE, François. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the camargue biosphere reserve. **Ecotoxicology**, v. 11, p. 155-164, 2002.

RODRIGUES, J. *et al.* Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1353-1355. 2010.

RODRIGUEZ, Alfonso J.; VILLAMIL-GÓMEZ, Wilmer E.; FRANCO-PAREDES, Carlos. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. **Travel medicine and infectious disease**, v. 14, n. 3, p. 177-179, 2016.

ROENGSUMRAN, Sophon *et al.* Crystal structure of 6-deoxyclitoriacetal, C₁₉H₁₈O₈. **Zeitschrift für Kristallographie-New Crystal Structures**, v. 218, n. JG, p. 105-106, 2003.

ROGHELIA, V.; PATEL, V. H. Effect of pesticides on human health. Research & Reviews: A **Journal of Health Professions**, v. 7, n. 2, p. 30-40. 2017.

ROSA, L. A. *et al.* Phenolic Compounds. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, 1 ed. **Elsevier**, 2019. 510 p.

ROSENTHAL, Gerald A. The biochemical basis for the deleterious effects of L-canavanine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1055-1058, 1991.

ROTHWELL, Christopher *et al.* Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. **Virology**, v. 389, n. 1-2, p. 8-19, 2009.

RUCHUSATSAWAT, Kriangsak *et al.* Long-term circulation of Zika virus in Thailand: an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 439-446, 2019.

RÜFER, Corinna E.; KULLING, Sabine E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2926-2931, 2006.

RUIZ-LARREA, M. Begona *et al.* Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. **Free radical research**, v. 26, n. 1, p. 63-70, 1997.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. In: Seminars in pediatric neurology. **WB Saunders**, p. 130-151. 2012.

SAHU, Ranjit *et al.* Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. **Developmental cell**, v. 20, n. 1, p. 131-139, 2011.

SAK, Olga; UÇKAN, Fevzi; ERGIN, Ekrem. Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L) (Hymenoptera: Ichneumonidae). 2006.

SAKA, Hector Alex; VALDIVIA, Raphael. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 28, p. 411-437, 2012.

SAKURAI, Yojiro *et al.* Rautandiols A and B, Pterocarpan and Cytotoxic Constituents from *Neorautanenia mitis*, 1. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 397-399, 2006.

SAMARA, C.; SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 105-112, 2008.

SAMARASEKERA, R.; WEERASINGHE, I. S.; HEMALAL, K. P. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 3, p. 290-295. 2008.

SAMSA, Marcelo M. *et al.* Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000632, 2009.

SANABRIA, Natasha M.; HUANG, Ju-Chi; DUBERY, Ian A. Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense. **Self/nonsel**, v. 1, n. 1, p. 40-54, 2010.

SANDERMANN JR, Heinrich. Differential lipid affinity of xenobiotics and natural compounds. **FEBS letters**, v. 554, n. 1-2, p. 165-168, 2003.

SANGTHONG, Supranee *et al.* Synthesis of rotenoid derivatives with cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 16, p. 4813-4818, 2011.

SANTOS, Andréa FS *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. 2014.

SANTOS, M. A. V. *et al.* Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta tropica**, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

SANTOS, R. A. F. Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos flavonoides isolados de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. Tese Doutorado **Universidade Federal da Bahia/UFBA**, Salvador. 2014.

SANTOS, S. R. *et al.* Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150-153. 2011.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379. 1987.

SENE, Ndeye Marie *et al.* Insecticide resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* populations from Senegal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009393, 2021.

SENTHILKUMAR, A. *et al.* Larvicidal potential of different solvent extracts and oleanolic acid derivative from *Coccinia indica* against vector mosquitoes. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 7, p. 1342-1349. 2012.

SENTHILKUMAR, N.; VARMA, Pushkala; GURUSUBRAMANIAN, G. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Liston). **Parasitology research**, v. 104, p. 237-244, 2009.

SEO, Seon-Mi; PARK, Hye-Mi; PARK, Il-Kwon. Larvicidal activity of ajowan (*Trachyspermum ammi*) and Peru balsam (*Myroxylon pereira*) oils and blends of their constituents against mosquito, *Aedes aegypti*, acute toxicity on water flea, *Daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5909-5914, 2012.

SETCHELL, Kenneth DR; CASSIDY, Aedin. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **The journal of nutrition**, v. 129, n. 3, p. 758S-767S, 1999.

SHANBHAG, S.; TRIPATHI, S. Electrogenic H⁺ transport and pH gradients generated by a V-H⁺-ATPase in the isolated perfused larval *Drosophila* midgut. **The Journal of membrane biology**, v. 206, n. 1, p. 61-72, 2005.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 02-55, 2017.

SHARMA, Lokendra K.; LU, Jianxin; BAI, Yidong. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 1266-1277, 2009.

SHARMA, Preeti *et al.* Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, n. 4, p. 301-304, 2011.

SHARMA, Preeti; MOHAN, Lalit; SRIVASTAVA, C. N. Phytoextract-induced developmental deformities in malaria vector. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 14, p. 1599-1604, 2006.

SHARMA, Preeti; MOHAN, Lalit; SRIVASTAVA, Chand N. Anti-juvenile activity of *Azadirachta indica* extract on the development and morphometry of filaria vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Say. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1193-1203, 2009.

SHARMA, V.; RAMAWAT, K. G. **Isoflavonoids**. Ed: RAMAWAT, Kishan Gopal; MÉRILLON, Jean-Michel. **Natural products**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.

SHERER, Todd B. *et al.* Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Brain research**, v. 891, n. 1-2, p. 94-105, 2001.

SHERER, Todd B. *et al.* Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 100, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

SHEWRY, Peter R.; LUCAS, John A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in botanical research**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SHIENGTHONG, D. *et al.* Constituents of thai medicinal plants-III new rotenoid compounds-stemonacetal, stemonal and stemonone. **Tetrahedron Letters**, v. 15, n. 23, p. 2015-2018, 1974.

SHYAMKUMAR, I. B.; ISHWAR, B. Anti-inflammatory, analgesic, and phytochemical studies of *Clitoria ternatea* Linn flower extract. **Int Res J Pharm**, v. 3, n. 3, p. 208-210. 2012.

SIEGWART, M. *et al.* Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 381. 2015.

SILVA, B. M. S.; MÔRO, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* RA Howard.-Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 195-201. 2008.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Antiinflammatory activity of rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry Research**, v. 16, p. S87-S88. 2002.

SILVA, Bernadete P.; BERNARDO, Robson R.; PARENTE, José P. Rotenoids from roots of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1787-1789, 1998.

SILVA, Bernadete; PAZ PARENTE, José. Antiinflammatory activity of rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. S1, p. 87-88, 2002.

Silva, L. A., & Dermody, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, 127(3), 737-749. 2017.

SILVÉRIO, M. R. S. *et al.* Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484. 2020.

SINGH, P.; PANDEY, A. K. Prospective of essential oils of the genus *Mentha* as biopesticides: A review. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1-14, 2018.

SIRISOPA, P. *et al.* Resistance to synthetic pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Agriculture and Natural Resources**, v. 48, n. 4, p. 577-586. 2014.

SMITH, P E. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85. 1985.

SOARES, S. *et al.* Contribution of human oral cells to astringency by binding salivary protein/tannin complexes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7823-7828, 2016.

SOLLA, A. *et al.* Genetic determination of tannins and herbivore resistance in *Quercus ilex*. **Tree genetics & genomes**, v. 12, n. 6, 117, 2016.

SOMBOON, Pradya; PRAPANTHADARA, La-aied; SUWONKERD, Wannapa. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus* sl, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 34, n. 1, p. 87-93, 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**. 2005.

STEFANO, George B.; OTTAVIANI, Enzo. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. **Brain research**, v. 924, n. 1, p. 82-89, 2002.

STRAND, Michael R. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. **Current opinion in insect science**, v. 28, p. 59-65, 2018.

TAIZ, L. *et al.* Fisiologia e desenvolvimento vegetal. **Artmed Editora**, ed 6, 2017

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. Fisiologia vegetal. **Universitat Jaume I**, 2006.

TAKASHIMA, Junko *et al.* Derrisin, a New Rotenoid from *Derris m alaccensis* Plain and Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Its Related Constituents. **Journal of natural products**, v. 65, n. 4, p. 611-613, 2002.

TAN, Pan-pan *et al.* Mitochondria-mediated pathway regulates C2C12 cell apoptosis induced by fluoride. **Biological trace element research**, v. 185, p. 440-447, 2018.

TELANG, A.; FRAME, L.; BROWN, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 5, p. 854-864. 2007.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, n. 6, p. 487-494. 1979.

THI, K. P.; VIET, H. H.; NGUYEN, H. M. Major resistant mechanism to insecticides of *Aedes aegypti* mosquito: a vector of dengue and Zika virus in Vietnam. **SM Trop. Med. J**, v. 1, p. 1010, 2016.

THIBERVILLE, Simon-Djamel *et al.* Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral research**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.

THIYAGARAJAN, P. *et al.* Effect of medicinal plant and microbial insecticides for the sustainable mosquito vector control. **Acta Biol Indica**, v. 3, p. 527-535. 2014.

THONGWAT, Damrongpan; BUNCHU, Nophawan. Susceptibility to temephos, permethrin and deltamethrin of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Muang district, Phitsanulok Province, Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 14-18, 2015.

TOLLRIAN, Ralph; HARVELL, C. Drew. The ecology and evolution of inducible defenses. **Princeton university press**, v. 3, n. 9, 1999.

TOYOMURA, Takao *et al.* From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar type H⁺-ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 22023-22030, 2003.

TROJAK, M.; SKOWRON, E. Role of anthocyanins in high-light stress response. **World Scientific News**, v. 81, n. 2, p. 150-168, 2017.

UMEHARA, Kaoru *et al.* Estrogenic constituents of the heartwood of *Dalbergia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 546-552, 2008.

VACHÉ, Christel *et al.* *Drosophila melanogaster* P-glycoprotein: A membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 25, n. 2, p. 572-580, 2006.

VACHÉ, Christel *et al.* *Drosophila melanogaster* P-glycoprotein: A membrane detoxification system toward polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 25, n. 2, p. 572-580, 2006.

VAN PUYVELDE, Luc *et al.* Isolation and structural elucidation of potentially insecticidal and acaricidal isoflavone-type compounds from *Neorautanenia mitis*. **Journal of natural products**, v. 50, n. 3, p. 349-356, 1987.

VASCONCELOS, Ilka M.; OLIVEIRA, José Tadeu A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 385-403, 2004.

VASCONCELOS, Jackson Nunes *et al.* Rotenoids from *Tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *Aedes aegypti*, the main vector of dengue fever. **Quimica Nova**, v. 35, p. 1097-1100, 2012.

VASEVA, Angelina V. *et al.* p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1536-1548, 2012.

VAVASSORI, Stefano; MAYER, Andreas. A new life for an old pump: V-ATPase and neurotransmitter release. **Journal of Cell Biology**, v. 205, n. 1, p. 7-9, 2014.

VELANDIA, Javier R.; DE CARVALHO, Mario G.; BRAZ-FILHO, Raimundo. Novel Trichloro-and Tetrachloroisoflavone Isolated from *Ouratea Semiserrata*. **Natural Product Letters**, v. 12, n. 3, p. 191-198, 1998.

VELASQUES, Jannaina *et al.* The rescue of botanical insecticides: A bioinspiration for new niches and needs. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 14-25, 2017.

VERMETTEN, Eric; BREMNER, J. Douglas. Circuits and systems in stress. I. Preclinical studies. **Depression and anxiety**, v. 15, n. 3, p. 126-147, 2002.

VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. **Plantas inseticidas**. p. 739-754. Em: SIMÕES, C. M. O, SCHENKEL, E. P, GOSMANN, G. MELLO, J. C. P, MENTZ, L. A, PETROVICK, P. R. (ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 821, 1999.

VOS, Irene A. *et al.* Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 639, 2015.

WADA, Ge-Hong *et al.* The $\alpha 3$ isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic β -cells. **Journal of cell science**, v. 119, n. 21, p. 4531-4540, 2006.

WADA, K. A. *et al.* Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 51, p. 15678-15683. 2015.

WAHAB, Atia Tul *et al.* Study of *Anacyclus pyrethrum* Lag. Root Extract against *Aedes aegypti* Linn. Larvae: Potential Vector Control for Dengue Viral Fever. **Records of Natural Products**, v. 15, n. 6, p. 486, 2021.

WAHID, B. *et al.* Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, 58, 69-76. 2017.

WANG, Hua; CLEM, Rollie J. The role of IAP antagonist proteins in the core apoptosis pathway of the mosquito disease vector *Aedes aegypti*. **Apoptosis**, v. 16, p. 235-248, 2011.

WANG, Yan-Hong *et al.* A critical role for CLSP2 in the modulation of antifungal immune response in mosquitoes. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004931, 2015.

WAR, Abdul Rasheed *et al.* Plant defence against herbivory and insect adaptations. **AoB plants**, v. 10, n. 4, p. ply037, 2018.

WASTERACK, Claus; SONG, Susheng. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 6, p. 1303-1321, 2017.

WEAVER, S. C. *et al.* Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. **Annual review of medicine**, v. 69, p. 395-408. 2018.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328-345. 2010.

WENG, Xing-He *et al.* The V-type H⁺-ATPase in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*: localization and activity. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 13, p. 2211-2219, 2003.

WIECZOREK, H. *et al.* A vacuolar-type proton pump in a vesicle fraction enriched with potassium transporting plasma membranes from tobacco hornworm midgut. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 19, p. 11143-11148, 1989.

WILLIAMS, Dudley H. *et al.* Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. **Journal of natural products**, v. 52, n. 6, p. 1189-1208, 1989.

WINK, Michael; SCHÄFER, Holger. Progress in the production of medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants-Progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p. 1684, 2009.

WIRTH, Christophe *et al.* Structure and function of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1857, n. 7, p. 902-914, 2016.

World Health Organization (WHO). Dengue and severe dengue. **WHO Factsheets**. 2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors**. World Health Organization, 2012.

World Health Organization, Special Programme for Research, Training in Tropical Diseases. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. **Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Epidemic & Pandemic Alert.**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. **World Health Organization**, (No. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13). 2005.

WU, Daniel S.; BEYENBACH, Klaus W. The dependence of electrical transport pathways in Malpighian tubules on ATP. **Journal of experimental biology**, v. 206, n. 2, p. 233-243, 2003.

WU, Jiecheng *et al.* Synthesis and photoactivated toxicity of 2-thiophenylfuranocoumarin induce midgut damage and apoptosis in *Aedes aegypti* larvae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 69, n. 3, p. 1091-1106, 2021.

WU, X. *et al.* 12a-Hydroxymunduserone induces apoptosis of human hepatocarcinoma cells through Wnt/ β -catenin pathway. **Genom. Appl. Biol**, v. 35, p. 1881-1886, 2016.

WUILLDA, Aline Camargo Jesus; CAMPOS MARTINS, Roberto Carlos; COSTA, Fernanda das Neves. Larvicidal activity of secondary plant metabolites in *Aedes aegypti* control: An overview of the previous 6 years. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 7, 2019.

XU, Yanqing *et al.* Epidermal growth factor-induced vacuolar (H⁺)-atpase assembly: a role in signaling via mTORC1 activation. **Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 31, p. 26409-26422, 2012.

YAN, Yan; DENEFF, Natalie; SCHRÖPBACH, Trudi. The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*. **Developmental cell**, v. 17, n. 3, p. 387-402, 2009.

YANG, Fan *et al.* Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in California by biochemical assays. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 4, p. 1176-1183, 2020.

YANG, Shu-Wei *et al.* Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 3, p. 313-317, 2001.

YE, Haoyu *et al.* Cytotoxic and apoptotic effects of constituents from *Millettia pachycarpa* Benth. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1402-1408, 2012.

YENESEW, Abiy *et al.* Anti-plasmodial activities and X-ray crystal structures of rotenoids from *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 773-779, 2003a.

YENESEW, Abiy *et al.* Effect of rotenoids from the seeds of *Millettia dura* on larvae of *Aedes aegypti*. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 59, n. 10, p. 1159-1161, 2003b.

YUN, J. H. *et al.* Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5254-5264. 2014.

ZHANG, Anping *et al.* Stereoselective toxicity of malathion and its metabolites, malaoxon and isomalathion. **Environmental chemistry letters**, v. 9, n. 3, p. 369-373, 2011.

ZHANG, Jie *et al.* Cell death induced by α -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *Aedes aegypti* larvae. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 137, p. 87-98, 2019.

ZHANG, Peiwen *et al.* Plants in the genus *Tephrosia*: valuable resources for botanical insecticides. **Insects**, v. 11, n. 10, p. 721, 2020.

ZHANG, Peiwen *et al.* Variation in Rotenone and Deguelin Contents among Strains across Four *Tephrosia* Species and Their Activities against Aphids and Whiteflies. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 339, 2022.

ZHANG, Yuelin; LI, Xin. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 50, p. 29-36, 2019.

ZIRBEL, Kylie; EASTMOND, Bradley; ALTO, Barry W. Parental and offspring larval diets interact to influence life-history traits and infection with dengue virus in *Aedes aegypti*. **Royal Society open science**, v. 5, n. 7, p. 180539, 2018.

ZONCU, Roberto *et al.* mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 678-683, 2011.

ZOU, Zhen *et al.* Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 41-53, 2010.