



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE, DARCY RIBEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA

EFEITO LARVICIDA DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Crambe abyssinica* E DO
ÁCIDO ERÚCICO EM *Aedes aegypti* E FORMULAÇÃO DE CÁPSULAS DO
ÓLEO

Campos dos Goytacazes/ RJ
2024

EFEITO LARVICIDA DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Crambe abyssinica* E DO
ÁCIDO ERÚCICO EM *Aedes aegypti* E FORMULAÇÃO DE CÁPSULAS DO
ÓLEO

CAROLINE RIBEIRO PESSANHA PORTO

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, Darcy Ribeiro como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutora em Biociências e
Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Olga Lima Tavares Machado

Co-orientador: Dr. Ricardo de Oliveira Barbosa Bitencourt

Campos dos Goytacazes/RJ
2024

EFEITO LARVICIDA DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Crambe abyssinica* E DO
ÁCIDO ERÚCICO EM *Aedes aegypti* E FORMULAÇÃO DE CÁPSULAS DO
ÓLEO

CAROLINE RIBEIRO PESSANHA PORTO

Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, Darcy Ribeiro como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutora em Biociências e
Biotecnologia.

Olga Lima Tavares Machado (Orientadora)
Doutorado em Química/ UFRJ
Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, UENF.

Ricardo de Oliveira Barbosa Bitencourt (co-orientador)
Doutorado em Ciências Veterinárias/ UFRRJ
Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, UENF.

Antônia Elenir Amâncio Oliveira
Doutorado em Biociências e Biotecnologia/ UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro/ UENF.

Isabele da Costa Angelo
Doutorado em Ciências Veterinárias/ UFRRJ
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ.

Maria Aparecida Aride Bertonceli
Doutorado em Biociências e Biotecnologia/ UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro/ UENF.

Dedico este trabalho ao meu
filho Lucas, meu maior
tesouro. *“Filho, foi por você
que eu persisti”*

AGRADECIMENTOS

Louvo e agradeço à Deus por me dar a vida e ser meu sustento durante este doutorado.

Agradeço aos meus pais Otávio e Márcia Valéria por todo amor e esforço que sempre fizeram para que um dia eu realizasse esse sonho.

Á minha querida irmã Vitória que mesmo longe apoiou-me com suas orações.

Ao meu amado esposo Fabrício por ser o principal incentivador e companheiro incansável em todos os momentos desta trajetória.

Á minha querida orientadora Dra. Olga Lima Tavares Machado, pelo acolhimento, carinho e ensinamentos valiosos.

Ao meu co-orientador Dr. Ricardo de Oliveira Barbosa Bitencourt, por toda atenção, conhecimento compartilhado e valiosas contribuições.

Aos colaboradores Albério Passos, Carlos Roberto Matos, Claudete Santa Catarina, Francisco José Lemos, Maura Cunha e Richard Ian Samuels, que permitiram a evolução dessa pesquisa.

Aos membros da banca Dr^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira, Dr^a Isabele Costa Angelo e Dr^a Maria Aparecida Aride Bertonceli, Marílvia Dansa de Alencar e Desiely Gusmão pelo tempo e esforço dedicados.

Aos amigos do laboratório Francianne Galossi, Raquel Braga, Jucélia Araújo, Isabela Dantas, Eduarda Contilho, Ana Flávia Mandieta, José Francisco e Karla Orozimbo por todo apoio, momentos de alegria e ajuda concedidos.

Á minha prima e amiga Frantesca Machado, por toda ajuda e tempo disponibilizados.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro;

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia (PGBB) e ao corpo docente por todo suporte e ensinamentos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor dos vírus do dengue, chikungunya e Zika e portanto, faz-se necessário realizar pesquisas para identificar novas alternativas de controle desse vetor. Desta forma, busca-se explorar produtos de origem vegetal com propriedades inseticidas e esta pesquisa utilizou de óleo de sementes de *Crambe abyssinica* como objeto de estudo. Esta tese tem por objetivos: 1) Analisar a composição do óleo de crambe por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de Massas - CG-MS; 2) Avaliar o efeito larvicida do óleo de crambe em diferentes concentrações em larvas de *Aedes aegypti*; 3) Avaliar o efeito larvicida do ácido erúcico; 4) Realizar uma análise *in sílico* do ácido erúcico. 5) Observar possíveis alterações morfológicas na cutícula das larvas de *Aedes aegypti* tratadas com ácido erúcico; 6) Observar alterações no intestino médio de larvas tratadas com óleo de crambe e com ácido erúcico. 7) Observar os impactos do ácido erúcico na acetilcolinesterase (AChE) de larvas de *Aedes aegypti* tratadas. 8) observar o efeito larvicida das cápsulas do óleo. O perfil de ácidos graxos do óleo de crambe apontou 58% de ácido erúcico, 21% de ácido oleico e 7% de linoleico. Para a realização do bioensaio, 10 larvas (L₂-L₃, N=30) do mosquito foram transferidas em recipiente contendo 20 mL de água e diferentes concentrações do óleo de crambe e ao ácido erúcico. A sobrevivência larval foi monitorada por 72 horas. O óleo de crambe (5%) reduziu a sobrevivência larval em 47% em 72h e em comparação aos óleos de canola e soja esse percentual foi de 93% e a S₅₀ em 24h. O ácido erúcico apresentou atividade larvicida dose dependente, S₅₀ em 24h na concentração de 2,5mg/mL. Para as microscopias de varredura (MEV) e a histopatologia (HP), os experimentos foram conduzidos conforme o bioensaio anterior, por 24h de exposição ao óleo e/ou ao ácido. Além disso, a análise *in sílico* do ácido erúcico foi realizada utilizando o software PASS online[®] que identificou 150 possíveis alvos moleculares do ácido erúcico relacionadas à processos biológicos mitocondriais, de imunidade, no sistema nervoso, na cutícula, na digestão, na oviposição e inseticida. Mudanças morfológicas foram observadas no exoesqueleto, sendo mais evidentes na cutícula um aparente descolamento no tórax e no abdômen das larvas. Foram observadas alterações no intestino médio de larvas tratadas tanto com o óleo de crambe quanto com o ácido erúcico com a presença da intensa vacuolização, ruptura de núcleo, corpúsculos lipídicos, necrose e espessamento da membrana peritrófica. O próximo teste verificou com auxílio de kit específico, a atividade da acetilcolinesterase em larvas tratadas com ácido erúcico foi verificada. Nossos resultados mostram a menor atividade da ACHE, em larvas tratadas. O encapsulamento do óleo foi realizado por técnica de gelificação iônica em matriz de alginato de sódio. No bioensaio, as cápsulas reduziram a sobrevivência larval em 60% em 96h. Como conclusão, foi constatado o efeito larvicida do óleo de crambe, por ação do ácido erúcico, com efeito à morfologia, histologia intestinal e por inibição da AChE, em larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O encapsulamento do óleo se mostrou efetivo como alternativa para diminuição da população deste vetor e promissor como alternativa aos inseticidas químicos.

Palavras chaves: Dengue; histologia; encapsulamento.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses and therefore, it is necessary to conduct research to identify new alternatives for controlling this vector. Thus, we seek to explore products of plant origin with insecticidal properties and this research uses *Crambe abyssinica* seed oil as the object of study. This thesis aims to: 1) Analyze the composition of crambe oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry - GC-MS; 2) Evaluate the larvicidal effect of crambe oil at different concentrations on *Aedes aegypti* larvae; 3) Evaluate the larvicidal effect of erucic acid; 4) Perform an *in silico* analysis of erucic acid. 5) Observe possible morphological changes in the cuticle of *Aedes aegypti* larvae treated with erucic acid; 6) Observe changes in the midgut of larvae treated with crambe oil and erucic acid. 7) Observe the impacts of erucic acid on acetylcholinesterase (AChE) of treated *Aedes aegypti* larvae. 8) Observe the larvicidal effect of oil capsules. The fatty acid profile of crambe oil contains 58% erucic acid, 21% oleic acid and 7% linoleic acid. To perform the bioassay, 10 mosquito larvae (L2-L3, N=30) were distributed in containers containing 20 mL of water and different concentrations of crambe oil and erucic acid. Larval survival was monitored for 72 hours. Crambe oil (5%) impaired larval survival by 47% in 72h and compared to canola and soybean oils this percentage was 93% and S50 in 24h. Erucic acid showed dose-dependent larvicidal activity, S50 in 24h at a concentration of 2.5mg/mL. For scanning electron microscopy (SEM) and histopathology (HP), the experiments were timed as in the previous bioassay, for 24h of exposure to oil and/or acid. In addition, an analysis of erucic acid *in silico* was performed using the PASS online® software, which identifies 150 possible molecular targets of erucic acid related to mitochondrial biological processes, immunity, nervous system, cuticle, digestion, oviposition and insecticide. Morphological changes were observed in the exoskeleton, with an apparent detachment in the thorax and abdomen of the larvae being more evident in the cuticle. Changes were observed in the midgut of larvae treated with both crambe oil and erucic acid, with the presence of intense vacuolization, nuclear rupture, lipid bodies, necrosis and thickening of the peritrophic membrane. The next test, acquired with the aid of a specific kit, was the activity of acetylcholinesterase in larvae treated with erucic acid. Our results show the lowest activity of AChE in treated larvae. The oil was encapsulated using the ionic gelation technique in a sodium alginate matrix. In the bioassay, the capsules reduced larval survival by 60% in 96h. In conclusion, the larvicidal effect of crambe oil was confirmed, through the action of erucic acid, with an effect on morphology, intestinal histology and by inhibition of AChE in larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. The encapsulation of the oil was shown to be an alternative for reducing the population of this vector and as an alternative to chemical insecticides.

Keywords: Dengue; histology; encapsulation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 <i>Aedes aegypti</i> : taxonomia, morfologia e ciclo de vida.....	15
1.1.1 Ovo.....	15
1.1.2 Larva	16
1.1.3 Pupa.....	17
1.2 Arboviroses transmitidas por <i>Aedes aegypti</i> : histórico e cenário atual	18
1.2.1 Dengue	18
1.2.2 Zika.....	19
1.2.3 Chikungunya.....	20
1.3 Controle do vetor	21
1.3.1 Controle mecânico	22
1.3.2 Controle biológico.....	22
1.3.3 Controle químico	23
1.3.4 Inibidores de acetilcolinesterase - AChE.....	23
1.4 Larvicidas de origem vegetal	26
1.5 <i>Crambe abyssinica</i>	28
2. OBJETIVOS	32
2.1.1 Objetivo Geral	32
2.1.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Local dos experimentos.....	33
3.3 Óleo de crambe e ácido erúcico.....	33
3.4 Preparação do óleo de crambe e de soluções do ácido erúcico	34
3.5 Análise da composição do óleo de crambe por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de Massas - CG-MS.....	34
3.6 Atividade larvica do óleo de crambe.....	35

3.7	Atividade larvícida do ácido erúcico.....	35
3.8	Investigação <i>in silico</i> dos alvos moleculares do ácido erúcico sobre insetos.....	35
3.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de larvas expostas ao ácido erúcico.....	36
3.10	Análise Histopatológica.....	36
3.11	Teste inibitório da acetilcolinesterase – AChE.....	37
3.12	Encapsulamento do óleo de crambe e ácido erúcico por Gelificação Iônica.....	37
3.13	Bioensaio com cápsulas	38
3.14	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS.....	40
4.1	Análise do óleo de <i>Crambe abyssinica</i>	40
4.2	Atividade larvícida do óleo de crambe	42
4.3	Atividade larvícida do ácido erúcico.....	45
4.4	Análise <i>in silico</i> do ácido erúcico.....	48
4.5	Avaliação de efeitos morfológicos do ácido erúcico sobre as larvas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	48
4.6	Análise Histopatológica.....	49
4.7	Teste inibitório da acetilcolinesterase – AChE.....	54
4.8	Encapsulamento do óleo de <i>Crambe abyssinica</i>	54
4.9	Bioensaio com cápsulas	55
5	DISCUSSÃO	57
	CONCLUSÃO	66
6	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICES	83
	Apêndice A:	84
	Apêndice B:	85

LISTA DE FIGURAS

Figura1:	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	15
Figura2:	Divisão do corpo da larva.....	16
Figura3:	O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura4:	Imagens de plantas de <i>Crambe abyssinica</i>	30
Figura5:	Estrutura molecular em cadeia do ácido erúcico.....	31
Figura6:	Encapsulamento do óleo.....	38
Figura7:	Óleo de <i>Crambe abyssinica</i> Hochst analisado em espectrômetro.....	40
Figura8:	Espectro de massas de ácidos graxos do óleo de <i>Crambe abyssinica</i>	41
Figura9:	Ensaio de sobrevivência com larvas (L2-L3) de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao óleo <i>Crambe abyssinica</i>	43
Figura10:	Ensaio de sobrevivência com larvas (L2-L3) de <i>Aedes aegypti</i> expostas aos óleos crambe, canola, e soja.....	44
Figura11:	Ensaio de sobrevivência com larvas (L2-L3) de <i>Aedes aegypti</i> na presença do ácido erúcico.....	46
Figura12:	Microscopia eletrônica de varredura de larvas <i>Aedes aegypti</i>	49
Figura13:	Histologia do intestino médio das larvas de <i>Aedes aegypti</i> controle.....	50
Figura14:	Histologia do intestino médio das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao óleo de crambe.....	51
Figura15:	Histologia do intestino médio das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao ácido erúcico.....	53
Figura16:	Inibição da acetilcolinesterase.....	54
Figura17:	Cápsulas do óleo de <i>Crambe abyssinica</i> observadas ao estereomicroscópio.....	55
Figura18:	Bioensaio com o óleo de <i>Crambe abyssinica</i> encapsulado em matriz de alginato.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela1:	Composição dos componentes de ácidos graxos encontrados na amostra de óleo de <i>Crambe abyssinica</i> e analisados por GC-MS.....	42
Tabela2:	Comparações log-rank pareadas de taxas de sobrevivência e tempo médio de sobrevivência (S50) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao óleo de crambe.....	44
Tabela3:	Comparações log-rank pareadas de taxas de sobrevivência e tempo médio de sobrevivência (S50) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao ácido erúrico.....	47
Tabela4:	Alguns alvos de ácido erúrico selecionados a partir da análise no software PASS online®.....	48

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A:	Alvos de ácido erúcico selecionados a partir da análise no softwarePASSonline®.....	84
Apêndice B:	Larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com ácido erúcico na concentração de 2,0 mg/mL.....	85

INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um sério problema de saúde pública (MENDONÇA, 2009) é o vetor dos vírus do dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana.

Nos anos de 2023 e 2024, ocorreram anomalias nos padrões de temperatura e precipitação devido aos efeitos do fenômeno climático *El Niño*. Como resultado, muitos países, especialmente nas Américas, observaram um aumento nos casos suspeitos de dengue. Até abril de 2024, a Organização Mundial da Saúde - OMS registrou mais de 7,6 milhões de casos suspeitos de dengue globalmente, com mais de 3 mil mortes. Um relatório específico de 2024 sobre saúde e mudanças climáticas, aponta para o impacto nos vetores de doenças importantes como os mosquitos, influenciados pelas condições climáticas, afetando sua distribuição geográfica, taxas de reprodução e potencial de transmissão de doenças como a malária, dengue e zika. Pois à medida que as temperaturas globais aumentam, os habitats dos mosquitos podem se expandir para novas áreas, aumentando o risco de surtos de doenças em regiões anteriormente não afetadas (ROMANELLO *et al.*, 2024).

Como medida de controle a OMS autoriza o uso de inseticidas químicos, como piretróides, carbamatos, organoclorados e organofosforados, além de métodos de controle mecânico e biológico (OMS, 2021). Esses produtos químicos podem ser tóxicos para humanos, o meio ambiente e animais. (DA SILVA, 2020). Além disso, o uso excessivo destes inseticidas tem levado a um aumento significativo na resistência a inseticidas piretróides pelos mosquitos *Aedes aegypti* (FAN, *et al.*, 2020). Outro estudo aponta para resistência extremamente alta a inseticidas convencionais, devido a mutações concomitantes de resistência ao knockdown, dificultando o controle populacional em partes da Ásia (KASAI *et al.*, 2022). Essa resistência também é vista em mosquitos *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens* (BESERRA, 2007; BRAGA, 2007). Dessa forma, faz-se necessário realizar pesquisas para identificar novas alternativas de controle de vetores. Portanto, busca-se explorar produtos de origem vegetal com propriedades inseticidas, por serem obtidos de fontes

renováveis, possuírem composições químicas complexas, diferentes modos de ação e toxicidade seletiva para organismos-alvo (DA SILVA *et al.*, 2020).

A planta *Crambe abyssinica*, conhecida como “crambe” destaca-se como uma oleaginosa de grande potencial em aplicações industriais. O óleo da crambe se enquadra na categoria dos chamados “*high erucic*” por sua composição rica de ácido erúcico, o que a torna inapropriada para consumo como alimento, porém enquadra-se em diversos usos, como na produção de biocombustíveis, de bio-lubrificantes, de polímeros e de emoliente da indústria de cosméticos, por exemplo (CICILIANO, 2023).

É de grande valia e interesse o desenvolvimento de produtos para controle de pragas e vetores usando extratos de plantas como alternativa aos produtos sintéticos. Neste contexto, este estudo utilizou a planta *Crambe abyssinica* como fonte de substâncias naturais com efeitos letais em larvas de *Aedes aegypti* e a técnica de encapsulamento para formulação de um produto com o óleo com a finalidade de combater o vetor de epidemias graves que afetam o Brasil e o mundo.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Aedes aegypti*: taxonomia, morfologia e ciclo de vida

O mosquito *Ae. aegypti*, popularmente conhecido como “mosquito da dengue” (FERREIRA, 1986) pertence à família Culicidae, subordem Nematocera da ordem Diptera (GWARDS & COLLINS, 1996). Ele mede menos de 1 cm, com listras brancas presente no corpo. O ciclo de desenvolvimento de *Ae. aegypti* é caracterizado por ser holometábolo, dividido entre as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adultos (figura 1) e em condições ideais este ciclo se completa entre 8 a 10 dias (FORATTINI *et al.*, 2002; KAUFMAN *et al.*, 2009).

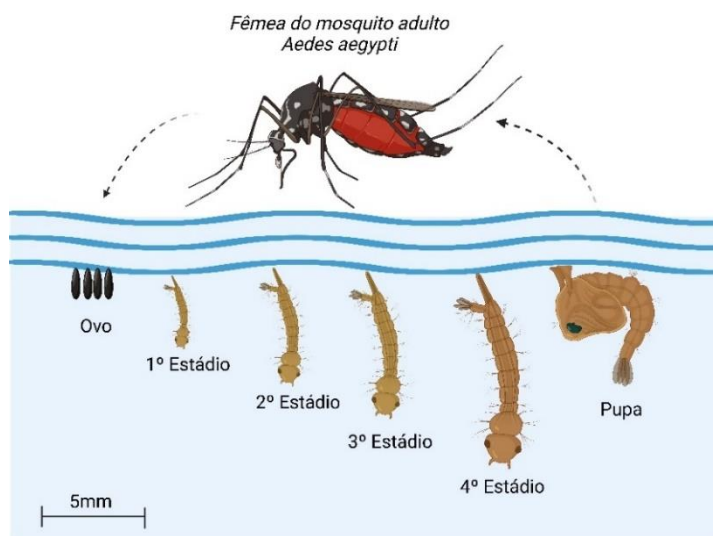


Figura 1: Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Ovo, 4 estádios de larvas, pupa e mosquito adulto (fêmea). Fonte: Adaptado pela autora, 2024. Biorender.

1.1.1 Ovo

Os ovos são extremamente resistentes à dessecação e podem permanecer viáveis por aproximadamente 1 ano no seco devido formação de uma camada de cutícula serosa, característica única comparado aos ovos de mosquitos vetores de outros gêneros (FORATTINI *et al.*, 2002; REZENDE *et al.*, 2008). Quando em contato com a água sofrem o estímulo para a eclosão das larvas, que em algumas horas deixa o ovo para então se alimentar de matéria orgânica (BESERRA, *et al.*, 2009).

1.1.2 Larva

As larvas exibem morfologia vermiforme, caracterizada pela segmentação corporal em três regiões distintas: cefálica, torácica e abdominal (Figura 2). A região cefálica apresenta um par de antenas e ocelos laterais, manifestando-se como áreas pigmentadas que persistem durante o estágio pupal, correspondendo aos futuros olhos compostos do adulto. Na porção anterior da cabeça, observam-se as escovas bucais, cuja função é gerar um fluxo hidrodinâmico direcionado à cavidade oral, facilitando a ingestão de partículas alimentares (CONSOLI & LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Caudalmente à cabeça, localiza-se o tórax, seguido pelo abdômen. A taxonomia larval é baseada na quantidade de cerdas presentes em cada segmento, com o oitavo segmento abdominal contendo as estruturas respiratórias e originando o segmento X, também denominado lóbulo anal (CHRISTOPHERS, 1960). A obtenção de oxigênio atmosférico ocorre por meio de um sifão respiratório, que possui um espiráculo revestido por estruturas hidrofóbicas. Este espiráculo estabelece contato com a interface ar-água, permitindo a entrada de gases. Durante a submersão, o espiráculo se oclui, e a presença de pelos impede a entrada de água no sistema traqueal (KLOWDEN, 2013).

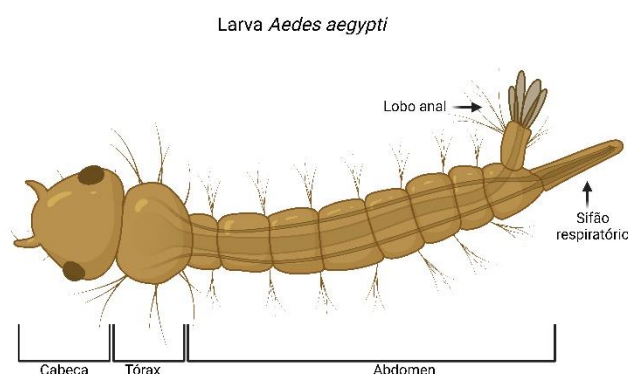


Figura 2: Divisão do corpo da larva de *Aedes aegypti*. Fonte: Christophers, 1960, adaptado pela autora, 2024. Biorender.

1.1.3 Pupa

É neste período que ocorre a última metamorfose onde o estágio imaturo aquático originará as formas maduras e aladas, machos e fêmeas. (CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). As pupas possuem resposta rápida (submersão) a distúrbios externos. Elas entram em contato com o ar por meio de trombetas respiratórias emparelhados, é composta por um cefalotórax e um abdômen articulado e estreito e o corpo coberto por uma cutícula translúcida. A região anterior do cefalotórax é ocupada por peças bucais e uma cabeça achatada. As manchas ocelares bilaterais, que originarão os olhos compostos dos adultos. Antes dos olhos compostos, as antenas emergem na parte superior e são dobradas em sentido inverso ao longo das laterais do tórax. O primeiro segmento abdominal tem dois feixes palmados retos, essenciais para manter o corpo da pupa acima da superfície da água. Comparado com os outros oito segmentos abdominais, o nono é relativamente pequeno; ele possui dois apêndices móveis chamados pás, que são órgãos fundamentais no movimento da pupa, e uma nervura mediana os sustenta (YAMANY *et al.*, 2024).

1.1.4 Inseto adulto

Após emergirem, os machos e fêmeas adultos podem se alimentar de néctar para obtenção de carboidratos, porém, o repasto sanguíneo é realizado pela fêmea que necessita dos nutrientes como arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano, entre outros, presentes no sangue para o desenvolvimento dos ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). A fêmea armazena o esperma do macho na bolsa espermática que vai ser responsável por liberar os espermatozoides para fecundar os óvulos. Momento antes da oviposição, a fêmea procura ambiente com água potável e nas paredes do local, faz a deposição individual dos ovos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998). Ela tem preferência para alimentar-se de sangue humano e seu horário de atividade é diurno em locais domiciliares (NGOAGOUNI *et al.*, 2016).



Reino: Animalia
Filo: Arthropoda
Classe: Insecta
Ordem: Diptera
Subordem: Nematocera
Família: Culicidae
Subfamília: Culicinae
Gênero: Aedes
Subgênero: Stegomyia
Espécie: *Aedes aegypti*

Figura 3: O mosquito *Aedes aegypti*. Fonte:
<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>

1.2 Arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti*: histórico e cenário atual

1.2.1 Dengue

O agente etiológico da dengue é um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes), do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*. São conhecidos quatro tipos imunológicos do vírus sendo designados: Dengue Vírus Sorotipo - DENV: Den-1, Den-2, Den-3, Den-4 e Den-5, neste ano dez estados decretaram Emergência e situação de Epidemia. (WHO, 2024). O vírus só se propaga por meio de vetor, não há transmissão do vírus por contato direto de um doente ou de suas secreções com pessoas saudáveis, nem por intermédio de água ou alimento contaminado (GUBLER, 2011).

O crescimento desordenado das cidades, sem infraestrutura adequada e com serviços de saneamento básico precários, junto à má gestão de resíduos sólidos, leva ao aumento de locais suscetíveis ao acúmulo de água, formando criadouros que aumentam a população de mosquitos (BHATT, *et al.*, 2013).

Embora com relatos desde meados do século XIX e início do século XX (PEDRO, 1923), a circulação dos vírus da dengue no Brasil só foi comprovada em 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista, capital do antigo território federal de Roraima (OSANAI *et al.* 1983). A circulação do vírus torna-se endêmica e epidêmica no Brasil, com destaque para as regiões Sudeste e Nordeste nos anos 90. Em 2002, houve cerca de 697.000 casos. Em 2010, eram 2,2 milhões de casos, aumentando para 3,2 milhões em 2015. Em

2016, a dengue é endêmica em mais de 100 países, com as Américas, Sudeste Asiático, e Pacífico Ocidental sendo as mais afetadas desde então, o Brasil tem registrado epidemias quase anualmente, com variações nas cidades de acordo com Ministério da Saúde (BRASIL, 2024).

A transmissão dos sorotipos do vírus da dengue depende de uma combinação de fatores que são: A alta temperatura e umidade do ar, densidade populacional elevada, deficiências na coleta de resíduos sólidos e no abastecimento de água potável, proporção de pessoas suscetíveis aos sorotipos circulantes, a abundância e tipos de criadouros do mosquito transmissor, altos índices de infestação predial e a densidade de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (PAHO 1994).

Além desses fatores, as mudanças climáticas, têm contribuído para o cenário. Nos anos de 2023 e 2024, ocorreram anomalias nos padrões de temperatura e chuva devido aos efeitos do fenômeno climático *El Niño*. Como resultado, muitos países, especialmente nas Américas, observaram um aumento nos casos suspeitos de dengue. No Brasil, além das mudanças climáticas, fatores como a vasta extensão territorial, a grande população e deficiências na gestão de resíduos e no fornecimento de água, principalmente nas periferias urbanas, agravam a situação (BRASIL, 2024). Entre as Semanas Epidemiológicas 1 e 34 de 2024, foram relatados cerca de 6.500.000 casos prováveis de dengue, com uma incidência de aproximadamente 3.200 casos por 100 mil habitantes. Os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Goiás e o Distrito Federal concentraram 87,70% dos casos prováveis. As maiores taxas de incidência foram registradas no Distrito Federal (9.770 casos por 100 mil habitantes), Minas Gerais (8.260 casos por 100 mil habitantes) e Paraná (5.643 casos por 100 mil habitantes). No mesmo período, foram confirmados 5.244 óbitos por dengue (BRASIL, 2024).

1.2.2 Zika

O Zika vírus é um *Flavivírus*, inicialmente identificado em macacos em Uganda em 1947 e em humanos em 1952. Os surtos ocorreram na África, Américas, Ásia e Pacífico. Entre 1960 e 1980, infecções humanas esporádicas, geralmente leves, foram registradas na África e Ásia (TAJIK, 2024). Os primeiros

casos suspeitos no Brasil foram confirmados em abril de 2015 sendo 148.905 notificados. De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), neste mesmo ano, a disseminação do vírus levou a um aumento notável no número de crianças nascidas com microcefalia, é uma malformação congênita onde o tamanho da cabeça do recém-nascido é inferior ao esperado, considerando a média para idade e sexo. Além disso, houve um aumento repentino nos casos da síndrome de Guillain-Barré, um distúrbio neurológico que pode resultar em paralisia podendo ser fatal no nordeste do Brasil, sendo chamado de Síndrome congênita associada a infecção pelo Vírus da Zika (SCZ) (FREITAS, 2020).

Entre as Semanas Epidemiológicas 01 e 34, de 2024 foram notificados 7.766 casos prováveis de Zika no País. Destaca-se que as sorologias realizadas para Zika podem resultar em falsos positivos em razão da possibilidade de reação cruzada com dengue (BRASIL, 2024).

1.2.3 Chikungunya

A chikungunya é um vírus transmitido também por mosquitos, causada pelo vírus (CHKV) descrita pela primeira vez durante um surto no sul da Tanzânia em 1952. É um vírus de RNA que pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. O nome “chikungunya” deriva de uma palavra na língua Kimakonde, que significa “ficar contorcido”, e descreve a aparência encurvada de pacientes com dor articular (artralgia). O vírus é transmitido pelas picadas de mosquitos fêmeas infectadas tanto de *Ae. aegypti* quanto *Aedes albopictus*. (MASCARENHAS, 2018).

Foram notificados aproximadamente 254.000 casos prováveis de chikungunya no País (taxa de incidência de 125 casos por 100 mil habitantes) até a Semana Epidemiológica 34 de 2024, esse número representa um aumento de 100% quando comparado com o do mesmo período de 2023, quando foram notificados 126.462 casos prováveis (59,3 casos por 100 mil habitantes) (BRASIL, 2024).

Os estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Espírito Santo foram responsáveis por aproximadamente 82% de todos os casos prováveis da doença, neste ano de 2024. A detecção de chikungunya e de outras arboviroses

durante a epidemia de dengue pode ser dificultada pela semelhança clínica entre estas e outras doenças infecciosas que circulam no Brasil, assim como pelos desafios do diagnóstico laboratorial específico em períodos epidêmicos. Até a Semana Epidemiológica 34, foram confirmados 162 óbitos por chikungunya no Brasil, sendo que outros 152 óbitos estão sob investigação (BRASIL, 2024).

1.3 Controle do vetor

O Ministério da Saúde desenvolveu o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), com os fundamentos de 1) ação de programas permanentes; 2) a promoção de campanhas de informação e mobilização, incentivando maior responsabilidade das famílias para manter seus lares livres de possíveis criadouros do vetor; 3) o fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para aumentar a capacidade de prever e detectar precocemente surtos da doença; 4) a melhoria da qualidade do trabalho de campo no combate ao vetor; 5) a integração das ações de controle da dengue na atenção básica, envolvendo o Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e o Estratégia Saúde da Família (eSF); 6) a utilização de instrumentos legais para facilitar o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas, entre outros; 7) a atuação multissetorial promovendo a destinação adequada de resíduos sólidos e o uso de recipientes seguros para armazenamento de água; e 8) o desenvolvimento de instrumentos mais eficazes para monitorar e supervisionar as ações realizadas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios. Assim como o programa de Agentes de Combate às Endemias (ACE) são profissionais exclusivos do Sistema Único de Saúde (SUS), desempenhando um papel essencial no combate às endemias e na promoção da saúde pública no Brasil. A atuação dos ACE, integrada às equipes de Saúde da Família (eSF), é fundamental para a eficácia das estratégias de prevenção e controle de doenças endêmicas, bem como para a promoção de ambientes saudáveis (BRASIL, 2009).

1.3.1 Controle mecânico

O manejo ambiental tem como objetivo principal reduzir ou eliminar locais onde pode haver acúmulo de água, como pneus e garrafas, para impedir que as fêmeas de mosquitos depositem seus ovos. Este tipo de manejo é considerado a forma mais eficaz de controle de mosquitos, mas deve ser uma prática regular tanto para as famílias quanto para o governo. Conforme descrito por Zara et al. (2016), o poder público tem a responsabilidade de disponibilizar agentes de saúde para visitar residências, onde eles informam a população e aplicam larvicidas, tanto químicos quanto biológicos, em locais estratégicos para controlar o *Aedes aegypti*, e outras espécies. Além disso, iniciativas como os programas “Dez minutos contra a dengue” e “Dez minutos salvam vidas”, promovidos pela Fundação Oswaldo Cruz e pelo governo do estado do Rio de Janeiro, conseguiram reduzir o número de surtos nas regiões onde foram implementados (FIOCRUZ, 2024; RIO DE JANEIRO, 2024).

1.3.2 Controle biológico

Como controle biológicos, tem-se diversos estudos propostos, como a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) compostos que atuam de modo sinérgico com outros pesticidas (BECKER, 2000; POLANCZYK et al., 2003). Tem-se também estudos com a bactéria *Wolbachia* sendo capaz de bloquear a transmissão do vírus da dengue e recentemente foi comprovado o bloqueio do vírus zika e chikungunya no *Ae. aegypti* (ROSLAN, 2024). Outras pesquisas recentes propõem fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, como alternativa ao controle de larvas (BITTENCOURT et al., 2022). Muito utilizado atualmente, o espinosade, uma alternativa orgânica aos inseticidas sintéticos, reduz a resposta colinérgica, estresse mitocondrial e níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sistema nervoso central, leva a defeitos mitocondriais, neurodegeneração grave e cegueira (MARTELLI et al., 2022).

1.3.3 Controle químico

O controle químico ainda é uma das principais estratégias para combater vetores. Dada a importância do mosquito *Ae. aegypti* existem diversos produtos larvicidas e adulticidas disponíveis no mercado. Porém o uso indiscriminado destes produtos vem causando uma pressão seletiva de mosquitos mais resistentes aos componentes químicos em que apenas os indivíduos resistentes sobrevivem, enquanto os suscetíveis são eliminados (DINIZ, 2014). Além disso, a capacidade de ajusta-se a diferentes ambientes e circunstância do mosquito faz com que surjam novos estudos e abordagens para controle do vetor (RAULT *et al.*, 2019). Inseticidas que têm como alvo o sistema nervoso têm sido os mais amplamente usado como controle, devido a sua rápida ação (HOLLAND & CROSSTHWAITE, 2024).

Da classe dos organofosforados, os carbamatos atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase, interrompendo a transmissão normal dos impulsos nervosos (GLATFELTER, *et al.*, 2020) e também podem envolver outros mecanismos, como o inibidor da hidrolase do acilpeptídeo e a modulação da homeostase do cálcio intracelular (CHEREMISINOFF & KING, 2020). Já os piretróides atuam principalmente prolongando a abertura dos canais de sódio, causando atividade nervosa repetitiva e bloqueio de excitação, mas também podem afetar canais de cálcio e bloqueio, contribuindo para sua neurotoxicidade (SODERLUND, 2011).

1.3.4 Inibidores de acetilcolinesterase - AChE

A acetilcolinesterase está presente na maioria dos seres vivos e tem como função hidrolisar o neurotransmissor chamado de acetilcolina em colina e ácido acético. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, permanecendo irreversivelmente inativada. O sítio-alvo de organofosforados e carbamatos são os da acetilcolinesterase (AChE), nestes casos, quando há resistência, ela está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal ou quase do estímulo nervoso (BRAGA *et al.*, 2007).

A acetilcolina presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, provocando a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Normalmente, após a interrupção do estímulo, a acetilcolina é

removida por receptação ou por degradação enzimática. Nos casos de inibição da AChE, a acetilcolina acumula-se nas junções nervosas, o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico, na fenda sináptica e o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto (CHAVASSE, 1997).

1.3.5 Resistência de insetos à inseticidas

Conhecer os mecanismos envolvidos na Resistência aos inseticidas em populações de mosquitos é um pré-requisito para a implementação eficiente de estratégias de controle vetorial. Sendo assim, segundo Khan e colaboradores (2020) os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro categorias: redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto, mudanças comportamentais, alteração do sítio-alvo e resistência metabólica.

Redução da penetração pela cutícula do inseto, este mecanismo envolve a espessura ou a composição alterada da cutícula do inseto, a camada externa que atua como uma barreira protetora. Quando os insetos desenvolvem uma cutícula mais espessa ou menos permeável, a absorção de inseticidas é diminuída, tornando-os menos eficazes. Mudanças comportamentais, insetos podem evoluir comportamentos que os evitam de serem expostos aos inseticidas. Por exemplo, eles podem modificar seu padrão de atividade (alimentação, repouso) para evitar áreas ou momentos em que a aplicação do inseticida é mais provável. Isso reduz a probabilidade de contato direto com o produto químico. Alteração do sítio-alvo, os inseticidas geralmente afetam proteínas-chave (alvos moleculares) nos insetos. Alterações genéticas podem modificar estas proteínas de tal forma que o inseticida não consegue mais se ligar eficientemente, tornando-o ineficaz. Esta resistência é comum em inseticidas que visam o sistema nervoso do inseto, como os organofosforados e carbamatos. Resistência metabólica, neste mecanismo, os insetos aumentam a atividade ou a quantidade de enzimas que metabolizam e desintoxicam o inseticida antes que ele possa atingir seu alvo. As principais famílias de enzimas envolvidas incluem as esterases, monooxigenases P450 e transferases de glutathione. A capacidade aumentada de degradar o inseticida permite que os

insetos sobrevivam a doses que seriam letais para indivíduos suscetíveis. Esses mecanismos podem ocorrer isoladamente ou em combinação, dependendo das pressões seletivas exercidas pelo uso de inseticidas e das características biológicas dos insetos. A resistência aos inseticidas é um desafio importante no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças, exigindo estratégias de manejo integradas e sustentáveis para minimizar seu impacto (KHAN, *et al.*, 2020).

A Organização Mundial da Saúde define resistência como a habilidade de uma população de insetos admitir uma dose de inseticida que normalmente, causaria sua morte (BRAGA e VALLE, 2007). Uma população de insetos é considerada resistente quando sua resposta a um inseticida em condições de campo ou em bioensaios diminui significativamente abaixo da sua resposta normal (GEORGHIOU e MELLON, 1983). Neste sentido, durante décadas, o controle dos insetos envolveu a eliminação mecânica de locais de reprodução e aplicações larvicidas e adulticidas em operações de pulverização espacial. No entanto, a eficácia destes tratamentos inseticidas foi reduzida devido à resistência (DUSFOUR *et al.*, 2015). Este problema afeta o controle de vetores a nível mundial, e as estimativas indicam que mais de 500 espécies de artrópodes desenvolveram resistência a um ou mais pesticidas (GEORGHIOU e LAGUNES-TEJEDA, 1991).

Quando inseticidas do mesmo grupo químico e com o mesmo modo de ação são aplicados repetidamente ao longo do tempo, geralmente ocorre o desenvolvimento de resistência em espécies de mosquitos sob pressão seletiva. Os genes de resistência que se tornam mais frequentes podem ser transferidos para outras populações por meio do fluxo gênico. Embora o próprio inseticida não cause alterações genéticas, seu uso contínuo seleciona indivíduos resistentes, constituindo um dos principais desafios no controle de pragas artrópodes (HEMINGWAY *et al.*, 2004). Há resistência cruzada em população de insetos que forem tratados com dois produtos quimicamente próximos, quando um deles causa seleção para um mecanismo de desintoxicação comum a ambos. Há relatos de resistência cruzada aos organofosforados malathion, fenitrothion e ao carbamato propoxur em população de *Culex quinquefasciatus* (BRACCO *et al.*, 1997). Dessa forma, o controle de vetores é afetado, pois há maior contaminação do meio ambiente com doses além do aceitável, extermínio

de organismos benéficos, e elevação nos custos para obter os níveis aceitáveis de controle, além da utilização de compostos cada vez mais tóxicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

No Brasil, os primeiros casos de resistência de populações de *A. aegypti* ao temefós foram relatados em 1999 (FUNASA, 1999; BESERRA *et al.*, 2007; MONTELLA *et al.*, 2007). Neste contexto, algumas metodologias alternativas têm sido desenvolvidas, entretanto, os inseticidas químicos ainda são primordiais nos programas de controle (SPARKS *et al.*, 2020).

Como por exemplo, os piretróides e organoclorados, a resistência está relacionada a ligação dos inseticidas que mantém os canais de sódio na conformação aberta e, portanto, há propagação contínua do impulso nervoso, podendo levar o inseto à morte. A resistência é resultante de sensibilidade reduzida do canal de sódio a esses compostos (WARE, 2000; HEMINGWAY, 2000; *apud* BRAGA, 2007). Mais conhecido como mecanismo knockdown (ou kdr), foi registrado para várias espécies (VAIS, 2000 *apud* BRAGA, 2007).

1.4 Larvicidas de origem vegetal

Sabendo que as plantas são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que essas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico, denominadas fitoalexinas (SIMAS *et al.*, 2004) e considerando a necessidade de se obter novos componentes, como alternativa aos inseticidas sintéticos para o combate de insetos, principalmente de mosquitos transmissores de doenças, é que se tem investido em estudos com extratos vegetais e os efeitos de compostos vegetais nos mosquitos, incluindo seus impactos comportamentais, fisiológicos e bioquímicos, podem atuar como mosquitocidas.

Nesse sentido, este trabalho e os demais encontrados na literatura, demonstram o potencial de vegetais, como por exemplo, Lelis e colaboradores (2012) mostraram os efeitos dos extratos obtidos de *Ottonia frutescens* e *Trigynaea oblongifolia* que inibiram a ovoposição de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*. Em outro estudo Silva e colaboradores (2015) relataram o uso da torta de *Ricinus communis* como inibidor de protease (RcTI) agindo no controle tanto da germinação do fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* quanto no

desenvolvimento larval de *A. aegypti*. Outros estudos de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) obtidos da transesterificação de óleos vegetais apresentam potencial larvícida contra larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus*, com valores de CL50 variando de 42,32 a 196,27 mg/L (RIBEIRO-NETO, et al., 2017).

Pesquisas realizadas com 20 óleos essenciais de plantas e componentes dos óleos de ajowan (*Trachyspermum ammi*) e bálsamo do Peru (*Myroxylon pereira*) contra o mosquito *Aedes aegypti*. Desses os óleos de ajowan e bálsamo do Peru a 0,1 mg/mL exibiram 100 e 97,5% de mortalidade larval, respectivamente. Nesta mesma concentração, os constituintes individuais, canfeno, ácido benzoico, timol, carvacrol, benzonato de benzila e trans-cinamato de benzila, causaram 100% de mortalidade (SEO et al., 2012). O mesmo grupo, realizou ensaios com mais 12 óleos essenciais de plantas *Apiaceae* e seus componentes contra o mosquito tigre asiático, *Aedes albopictus*, e a inibição da acetilcolinesterase, ajowan (*Trachyspermum ammi*), semente de alcaravia (*Carum carvi*), semente de cenoura (*Daucus carota*), aipo (*Apium graveolens*), cominho (*Cuminum cyminum*), endro (*Anethum graveolens*) e salsa (*Petroselinum sativum*) resultaram em mortalidade larval >90% quando usados a 0,1 mg/mL (SEO et al., 2015). Óleos essenciais de *Eucalyptus teriticornis* (Eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (Tea tree), *Mentha piperita* L. (Hortelã-pimenta), *Lavandula angustifolia* (Lavanda), *Citrus sinensis* (Laranja) e *Cymbopogon flexuosus* (Capim-limão) contra larvas de mosquitos *Aedes aegypti* (JAMAL & MONDAL, 2024).

Trabalhos relacionados a esta pesquisa são também encontrados como o encapsulamento do óleo essencial de *Siparuna guianensis* em nanopartículas de quitosana com potencial promissor como alternativa de controle larvícida e deve ser considerado dentro das estratégias de combate ao *Ae. aegypti* (FERREIRA et al., 2019). Nanoemulsão baseada em óleo essencial de alho com alta concentração de EO (15%) e baixo teor de surfactante e eficácia contra larvas de *S. littoralis*. Bioensaios de laboratório demonstraram atividade larvícida promissora e alimentação larval reduzida, embora alguns sintomas de fitotoxicidade tenham sido observados. Este estudo ressalta o potencial dos inseticidas botânicos como alternativas sustentáveis aos produtos químicos sintéticos, enfatizando a importância de equilibrar a eficácia com considerações

ambientais e ecológicas em estratégias de manejo de pragas (GIULIANO *et al.*, 2024).

Bases em Propriedade Intelectual de depósito de patentes, referente a complexos de inclusão do óleo essencial de *Citrus sinensis osbeck* em b-ciclodextrina com atividade larvicida para as larvas do *Aedes aegypti*. A formulação/composição do produto larvicida proposto compreendem complexos de inclusão (óleo essencial/13- ciclodextrina), que favorece a solubilidade do óleo em meio aquoso, como bioinseticida contra as larvas do *Aedes aegypti* (BR 10 2014 024639 8 A2). A formulação/composição do produto larvicida contendo óleo essencial de *Syzygium aromaticum* compreendem nanocompósitos que favorece a solubilidade do óleo em meio aquoso. Os nanocompósitos resultam da obtenção através da intercalação por solução argila/polímero que favorece a liberação do óleo (e seus constituintes) como alternativa ao controle das larvas do *Aedes aegypti* (BR 10 2014 030551 3 A2).

1.5 *Crambe abyssinica*

Esta espécie é nativa da região do Mediterrâneo, sendo a sua origem a zona do Mediterrâneo e as terras altas do leste da África, porém também se adapta muito bem ao clima frio das amplas extensões da Europa (FALASCA *et al.*, 2010). Pertence à família Brassicaceae, que inclui outras plantas com fins oleaginosos semelhantes, como a colza (*Brassica napus* L. var. *oleífera*), a canola (*B. napus*) e diversas espécies de mostarda (*B. juncea*, *B. campestris*, *B. alba*, *B. nigra*) (Lazzeri *et al.*, 1994). O gênero *Crambe* possui 39 espécies conhecidas, e *Crambe abyssinica* Hochst enquadra-se na seção *Leptocrombe* DC. Subespécie *abyssinica* Hochst (PRINA, 2000).

Além dessas, muitas espécies da família são cultivadas como plantas hortícolas e foram introduzidas no Brasil, a exemplo do repolho (*B. Oleracea* var. *capitata*), couve (*B. oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócolis (*B. oleracea* var. *itálica*), Couvechinesa (*B. pekinensis*), Couve-rábano (*B. Oleracea* var. *gongylodes*), couve-de-bruxelas (*B. Oleracea* var. *gemmifera*), couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *tronchuda*), Rúcula (*Eruca sativa*), Agrião aquático (*Rorippa nasturtium-aquaticum*) e rabanete (*Raphanus sativus*) (MOREIRA; BRAGANÇA, 2010).

A crambe foi introduzida no Brasil, na década de noventa, pela Fundação Mato Grosso do Sul, município de Maracaju, com o objetivo de avaliar o seu comportamento como cultivo para cobertura de solo em sistemas de plantio direto (MULLER, 2008; DAHLKE & SIMONETTI, 2010). Inicialmente não despertou interesse dos agricultores por ser inferior ao nabo forrageiro na cobertura de solo e por não haver mercado para produção de grãos. Este cenário mudou quando houve estímulo à produção do biodiesel e o crambe voltou a ser avaliado por possuir boas possibilidades. Assim, foram retomados os trabalhos de pesquisa que culminaram com a recomendação dessa espécie como uma das principais culturas para a produção de biodiesel (SOUZA *et al.*, 2009; PITOL, 2008).

As características como baixo custo, facilidade de produção, ciclo rápido (floresce em 35 dias e pode ser colhida em 90 dias) e sua maturação uniforme, propiciam colheita mecanizada como cultura de rotação (PANNO & PRIOR, 2009). A extração do óleo pode ser feita de forma mecânica, com extrusora e prensa, sendo este mais resistente à degradação e apresenta alta estabilidade à oxidação. Isso confere vantagens relacionadas ao tempo de armazenamento, sendo este um ponto extremamente importante, uma vez que a maioria do biodiesel gerado por diversos óleos vegetais não apresenta essa estabilidade (BISPO *et al.*, 2010).

O óleo de crambe segundo Oplinger *et al.* (2000), pode ser usado como lubrificante industrial, inibidor de corrosão, e como ingrediente na fabricação de borracha sintética, além de servir para a fabricação de filmes plásticos, plastificantes, nylon, adesivos, antiestático, e isolamento elétrico, não é usual na alimentação, exceto em algumas partes da Índia e China.

Para caracterizar a planta do crambe podemos considerar as seguintes particularidades, como raízes pivotantes e profunda, suas hastes ramificam-se próximas ao solo para formar trinta ou mais galhos, que novamente se ramificam, formando galhos terciários (Figura 4, A, B, C e D), (COLODETTI *et al.*, 2012).

As folhas são grandes, largas, ovais e assimétricas (Figura 4), a lâmina foliar possui aproximadamente 10 cm de comprimento e 7,6 cm de largura, com superfície lisa. O pecíolo possui aproximadamente 20 cm de comprimento e é piloso (OPLINGER *et al.*, 2000). O tipo de inflorescência (Figura 4) é rácemo,

com flores da cor branca ou amarela e os frutos do tipo cápsula (FALASCA *et al.*, 2010).

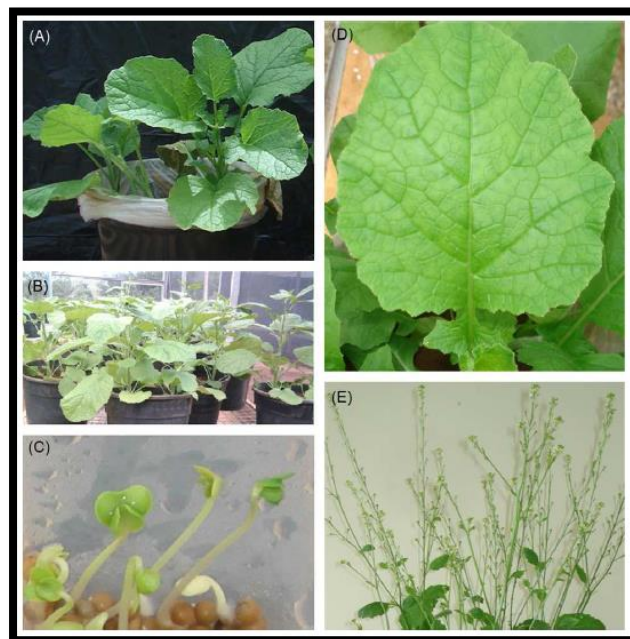


Figura 4: Imagens de plantas de *Crambe abyssinica*: plantas em desenvolvimento (A e B), sementes em germinação (C), detalhe das folhas (D) e florescimento (E) (COLODETTI *et al.*, 2012).

O grão é redondo, com 2 mm de diâmetro e cor marrom claro (COLODETTI *et al.*, 2012). Em base seca, a semente contém 33,9% de óleo, 25,2% de proteína e 12,3% de fibra bruta. O teor de óleo é quase o dobro do encontrado na soja e 8-9% superior ao da colza (DUBYNE, 2015).

Suas sementes apresentam elevado teor de óleo, em média 38%. O óleo de crambe, principal produto da oleaginosa, é rico em ácido erúico ($C_{22}H_{42}O_2$) (50-60%), um ácido graxo monoinsaturado de cadeia longa ($C_{22:1}$) de fórmula molecular e estrutural como demonstrado na Figura 5, de peso molecular 1053,75, e de grande aplicação na industrial (FALASCA *et al.*, 2010).

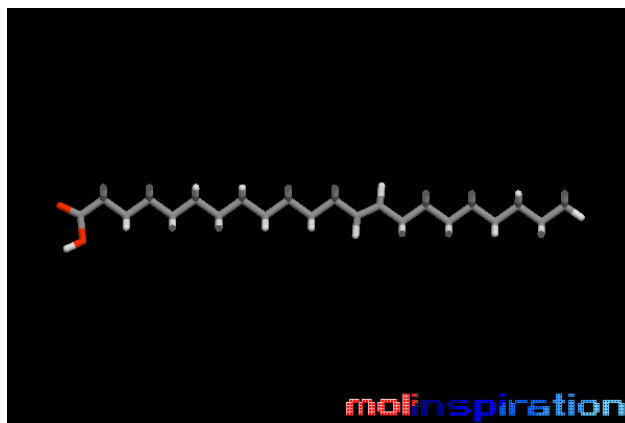


Figura 5: Estrutura molecular em cadeia do ácido erúcico. Fonte: <https://www.molinspiration.com/cgi/properties>.

O subproduto do crambe, oriundo da extração do óleo, a torta e/ou farelo, podem ser utilizados como suplementos proteicos em alimentação de ruminantes. O farelo apresenta excelente qualidade nutricional (CARLSON et al., 1996).

É uma cultura muito tolerante à seca (solos quentes), principalmente a partir de seu desenvolvimento vegetativo, também é muito tolerante ao frio, exceto após a germinação, sendo capaz de tolerar temperaturas de até -3° C (PITOL, 2008). Além disso é resistente a pragas e doenças (OPLINGER, *et al.* 1991; FALASCA, *et al.* 2010; ATABANI, *et al.* ,2013).

2. OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito larvicida do óleo de *Crambe abyssinica* e do seu composto majoritário o ácido erúcico em *Aedes aegypti* e formular cápsulas de alginato com óleo de crambe.

2.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Quantificar e caracterizar o óleo de *Crambe abyssinica*;
- ✓ Avaliar o efeito larvicida do óleo de crambe e do ácido erúcico observando as alterações morfológicas e histopatológicas no intestino médio das larvas;
- ✓ Realizar uma predição *in silico* dos alvos moleculares do ácido erúcico;
- ✓ Analisar o efeito do ácido erúcico sobre a enzima acetilcolinesterase;
- ✓ Elaborar cápsulas em matriz de alginato com óleo de crambe e ácido erúcico;
- ✓ Avaliar a eficácia das cápsulas de óleo de crambe e do ácido erúcico contra larvas de *Ae. aegypti*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química em Função de Peptídeos e Proteínas – LQFPP, Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia – LBT, Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciência e Tecnologia, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT, do Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia - LEF, no Centro de Ciências e tecnologias agropecuárias- CCTA, na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, Brasil – UENF.

3.2 *Aedes aegypti*

A criação dos mosquitos ocorreu no insetario, em colaboração com o Prof. Francisco José Alves Lemos, ovos de *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller) ovipositados em papel filtro foram colocados em recipiente de vidro contendo água mineral, com uma 10 mg de ração de peixe (Tetramin® alevinos, Alcon). O recipiente foi mantido em ambiente com temperatura controlado ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) e tampada por 24 horas para estimular a eclosão larval por meio da presença do CO_2 . As larvas após eclodidas foram acompanhadas e alimentadas até o estágio (L2-L3) e os experimentos foram conduzidos no tempo de 24h, 48h e 72h, grupos contendo 10 larvas selecionadas e separadas em copo plástico de 50mL contendo 20mL de água destilada, cada ensaio foi realizado em triplicata e nos tratamentos e no controle (água).

3.3 Óleo de crambe e ácido erúcico

As sementes de *Crambe abyssinica* foram obtidas no ano de 2021 no Núcleo Rural Rio Preto, Planaltina, Distrito Federal, Brasil, (Longitude -47.4925695 – Latitude -15.7636047) com autorização (número 16806) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. As sementes foram fornecidas pela empresa baiana, de

Albério Passos. O ácido erúico foi obtido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich® (COD. 112-86-7).

3.4 Preparação do óleo de crambe e de soluções do ácido erúico

O óleo foi extraído por prensa contínua tipo expeller e doado pela empresa baiana para inclusão na pesquisa, foi utilizado na concentração de 0,5, 1, 1,75, 2, 2,5 e 5(%). O ácido erúico, foi obtido comercialmente na Sigma-Aldrich® (COD. 112-86-7) e diluído em óleo de canola nas concentrações 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 4,0 (mg/mL) e agitado em vórtex.

3.5 Análise da composição do óleo de crambe por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de Massas - CG-MS

A cromatografia ocorreu em colaboração com prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos, para determinação da composição em ácidos graxos do óleo de *Crambe* foi realizada uma reação de transesterificação com metanol na presença de KOH. Dessa forma os ácidos graxos foram identificados como ésteres metílicos. Em um tubo de ensaio contendo uma solução de 60 mg de óleo em 5 mL de éter de petróleo foi adicionado 0,5 mL de uma solução metanólica de KOH (2 mol L⁻¹). A mistura foi submetida a agitação vigorosa durante 5 min. A fase superior foi coletada e os éster metílicos de ácido graxo foram analisados em um cromatógrafo a gás. A análise por CG-EM foi realizada em equipamento da marca Agilent, espectrômetro de massas modelo 5975C acoplado ao cromatógrafo a gás 7890A. A inserção da amostra foi realizada através de uma seringa de 10 µL em um injetor automático modelo 7693A. Condições utilizadas no CG: Coluna HP-5ms (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de filme de (5% fenil)-metilpoli siloxano; volume injetado: 1µL em modo de divisão (split) 1: 20; temperatura do injetor 280 °C; programação de temperatura: 60 °C e então 2 °C/min até 280°C e mantendo a temperatura por 50 min; gás de arraste: Hélio, com fluxo constante de 1 mL/min. Detector de massa: temperatura da interface, da fonte de ionização e do analisador quadrupolo foram de 280, 230 e 150 °C respectivamente; modo de ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV.

3.6 Atividade larvícida do óleo de crambe

Grupo de 10 larvas de *Ae. aegypti* (L2-L3) foram dispostas em copos de plástico de 50mL contendo, 20 mL de água, em triplicata. Primeiramente as larvas foram expostas a diferentes concentrações do óleo de crambe 0,5, 1, 1,75, 2, 2,5 e 5 (%). Em segundo momento, realizou-se um ensaio comparativo entre os óleos de crambe, óleo de soja e o óleo de canola, todos nas concentrações de 5% e como controle 0,03% de tween. O monitoramento do tempo de sobrevivência foi realizado diariamente, a cada 24, 48 e 72h.

As larvas mortas foram retiradas dos copos com auxílio de uma pipeta Pasteur e o número de larvas vivas foi registrado. Diariamente as larvas foram mantidas e alimentadas conforme o item 3.2. Os ensaios foram conduzidos por duas vezes em tempos distintos utilizando diferentes populações de larvas. Foram utilizado um total de 180 larvas durante todo o experimento considerando as repetições.

3.7 Atividade larvícida do ácido erúcico

Grupo de 30 larvas de *Ae. aegypti* foram transferidas para copos plásticos de 50 mL contendo 20 mL de água destilada (N=10 por copos; L2- L3) e expostas ao ácido erúcico dissolvido em óleo de canola, óleo de canola puro (controle) e água (controle). O protocolo de ensaio biológico, alimentação das larvas, o tempo de experimento bem como a forma de análise foram conduzidos conforme o item 3.2. O ensaio foi conduzido três vezes em tempos distintos utilizando diferentes lotes de larvas. Foram utilizadas um total de 1080 larvas durante todo o experimento considerando todas as repetições.

3.8 Investigação *in silico* dos alvos moleculares do ácido erúcico sobre insetos

Uma análise *in silico* para verificar possíveis alvos moleculares do ácido erúcico que correspondessem à mudanças biológicas sobre insetos foi realizada. As notações SMILES do ácido erúcico foram elaboradas utilizando Molinspiration ChemInformatics® e posteriormente submetidas ao software PASS online®⁴⁴. A

partir dos resultados obtidos pelo software PASS foram selecionados alvos moleculares relacionados ao metabolismo lipídico, resposta imune, sistema nervoso, cutícula, intestino e atividade inseticida. As previsões foram apresentadas com probabilidade superior a 0,3.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de larvas expostas ao ácido erúcico

Em colaboração com a prof. Dra. Maura da Cunha. As larvas foram expostas ao ácido erúcico a 2mg/mL por 24 horas. As larvas foram fixadas em Glutaraldeído a 2,5 % (pH 7.4), 4 % de Paraformaldeído e Tampão Fosfato de 0,1 M. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três lavagens com Tampão de Fosfato 0,1 M por 30 min e pós-fixadas em Tetróxido de ósmio a 1 % e Tampão de fosfato 0,1 M por 1 h, lavadas novamente no mesmo tampão. As larvas foram desidratadas em uma série crescente de acetona (20 %, 50 %, 70 %, 90 % e 3 vezes 100 % super-seco) por 1 h, em cada etapa, seguida de secagem em ponto crítico de CO₂ (CPD 030, Baltec). As larvas foram então fixadas em suportes metálicos com fita de carbono e cobertas com camada de ouro de aproximadamente 20 nm (SCD 050, Baltec, Suíça). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO 40 (Alemanha) com voltagem de 15 kV.

3.10 Análise Histopatológica

Em colaboração com a Prof. Dra. Claudete Santa Catarina. As larvas foram expostas ao óleo de crambe 5% e ao ácido erúcico a 2mg/mL. Após 24 horas, as larvas (N=3 por grupo) foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich®) e mantidas sob refrigeração (-4°C). Após 24 horas, as amostras foram desidratadas em séries ascendentes de etanol (15 min cada a 70, 80, 90, 96, e 100%). O processo de desidratação com etanol a 100% foi repetido três vezes de 15 min cada (Bitencourt et al. 2021).

A incubação foi conduzida por 12h em historesina (Leica®) diluída em etanol 100% (Merck®) (1:1 v/v). Em seguida, as amostras foram incubadas em historesina 100% por 24h, seguida de endurecedor em historesina 100%. Um

micrótomo rotativo (RM2135 Leica®) foi usado para obter cortes histológicos de 3 µm de espessura. As amostras foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina 1%. Para tanto, a exposição à hematoxilina foi de 15 minutos, seguida de uma rápida lavagem com água destilada para remoção do excesso de corante. Imediatamente após, as lâminas foram transferidas para eosina por 5 minutos, seguidas de duas rápidas lavagens com água destilada. As lâminas foram colocadas em uma placa aquecida a 40°C até a completa secagem. As observações foram realizadas e microscópio óptico.

3.11 Teste inibitório da acetilcolinesterase – AChE

Foi utilizado um método colorimétrico desenvolvido por Ellman *et al.* (1961). Para extração das enzimas as larvas tratadas, já em estado moribundo, foram trituradas em N₂ líquido. Para cada ensaio foram utilizadas de 30 a 50 larvas em 300µL de água para os ensaios controle, ou na presença dos compostos a serem testados. As larvas foram tratadas por 2h com ácido erúico dissolvido em óleo de canola na concentração de 2,5mg/mL. A seguir foram trituradas na presença de nitrogênio líquido e centrifugadas por 3 minutos. O sobrenadante larval foi coletado e reservado para a dosagem da atividade da AChE. O meio reacional foi preparado em placas de 96 poços pela mistura de 100 µL do R1(Tampão pirofosfato 90 mmol/L e ferricianato de potássio > 2 mmol/L) e 25 µL do R2 (butirilcolina >15mmol/L), o qual foi homogeneizado e incubado em banho maria a 37°C por 2 min. A reação foi disparada pela adição de 20 µL do sobrenadante larval. Os experimentos foram feitos em triplicatas e a reação foi acompanhada pela leitura da absorbância inicial em 405nm (tempo zero) e leitura após 5 minutos de reação utilizando um leitor de placas de ELISA. Para a determinação das atividades enzimática utilizando as condições padronizadas pela Labtest Diagnóstica S.A, e empregada a fórmula ($\Delta \text{ Abs}/5 \times 74400$) para o cálculo da atividade em U/L.

3.12 Encapsulamento do óleo de crambe e ácido erúico por Gelificação Iônica

O encapsulamento foi feito em colaboração com o Dr. Richard Ian Samuels. O óleo de crambe a 5% foi encapsulado utilizando a técnica de gelificação iônica

de acordo com Santos et al., (2015). Uma solução de alginato de sódio (Próquímios®) a 2 % (p/v) foram preparadas em água destilada. Em seguida, 0,1mL de óleo de *Crambe* foi adicionado (v/v) ao alginato. A solução foi homogeneizada em vortex por 1 minuto. Para formação das cápsulas, a solução foi gotejada em cloreto de cálcio (CaCl₂) (Sigma-Aldrich®) a 0,1 M com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex®, Cole Parmer®) a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ (Figura 6). As cápsulas de alginato puro e capsulas contendo óleo de canola foram utilizadas como grupos controles. Em seguida, as cápsulas foram lavadas com água corrente e secas em estufa a 27 °C durante 24 horas e posteriormente utilizadas nos ensaios de teste larvicida contra *Ae. aegypti*.



Figura 6: Encapsulamento do óleo. Bomba peristáltica Masterflex®, Cole Parmer®, agitador magnético, mangueira e suportes. Fonte: Da autora.

3.13 Bioensaio com cápsulas

Grupo de 30 larvas de *Ae. aegypti* de terceiro estágio, N=10 por copo, foram dispostas em copos plásticos contendo 20 mL de água destilada. Em seguida as larvas foram expostas em 1.279 g de cápsulas por copo. As larvas foram expostas a cápsulas de óleo de crambe 5% e de ácido erúico a 2 mg/mL. As larvas do grupo controle foram expostas a cápsulas contendo óleo de canola e cápsulas apenas com alginato. O monitoramento do tempo de sobrevivência foi realizado diariamente, a cada 12, 24 e 48 e 72h. As larvas mortas eram retiradas dos copos com auxílio de uma pipeta Pasteur e o número de vivas era registrado.

O ensaio foi conduzido três vezes em tempos distintos utilizando diferentes lotes de cápsulas e larvas. Foram utilizado um total de 360 larvas durante todo o experimento considerando todas as repetições.

3.14 Análise estatística

Com relação aos ensaios biológicos, ao final do monitoramento, as curvas de redução de sobrevivência foram plotadas utilizando o teste não paramétrico Kaplan-Meier. O teste de Log-rank forneceu os valores de qui-quadrado (χ^2) e realizou as comparações estatísticas entre as curvas, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). Além disso, o Log-rank apresentou os valores do tempo médio de sobrevivência das larvas (S_{50}). Os demais dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para comparação das médias foi utilizado o teste de one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

Com relação ao teste enzimático da AChE, utilizou-se o método de regressão linear para analisar a relação entre as variáveis absorbância e tempo. Além disso, aplicou-se a análise de variância two-way ANOVA seguido do teste de Tukey com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism v8.00, Inc (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Análise do óleo de *Crambe abyssinica*

A análise do óleo de crambe comprovou a presença de quinze componentes detectados por GC-MS (Figura 7 e Tabela 1). Os principais componentes são o éster metílico do ácido erúcico, 58,6% (RT 58,9 min), o éster metílico do ácido oleico, 21,6% (47,5 min) e o éster metílico do ácido linoleico, 7,2% (RT 47,14 min). Suas fórmulas estruturais e fragmentos, podem ser observados na Figura 8.

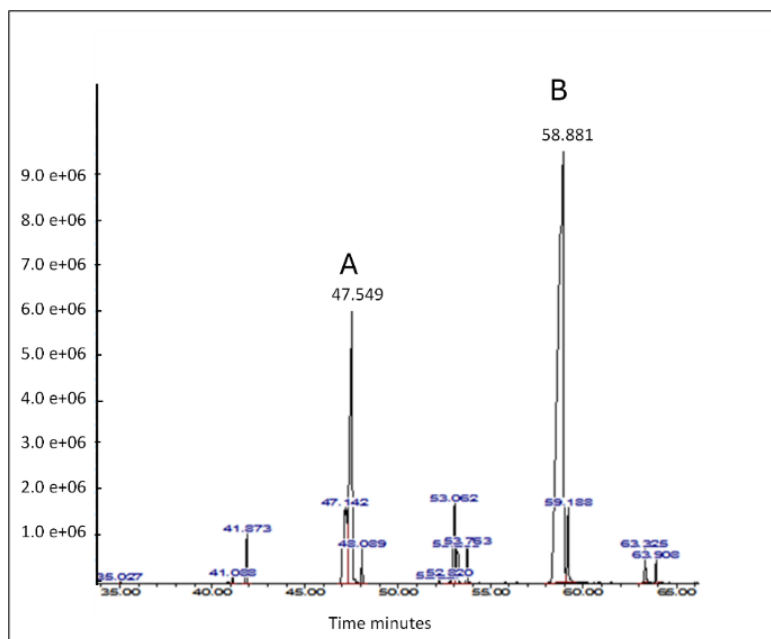


Figura 7: Óleo de *Crambe abyssinica* analisado em espectrômetro de massa GC-MS Agilent acoplado à cromatografia gasosa. Quinze componentes foram detectados.

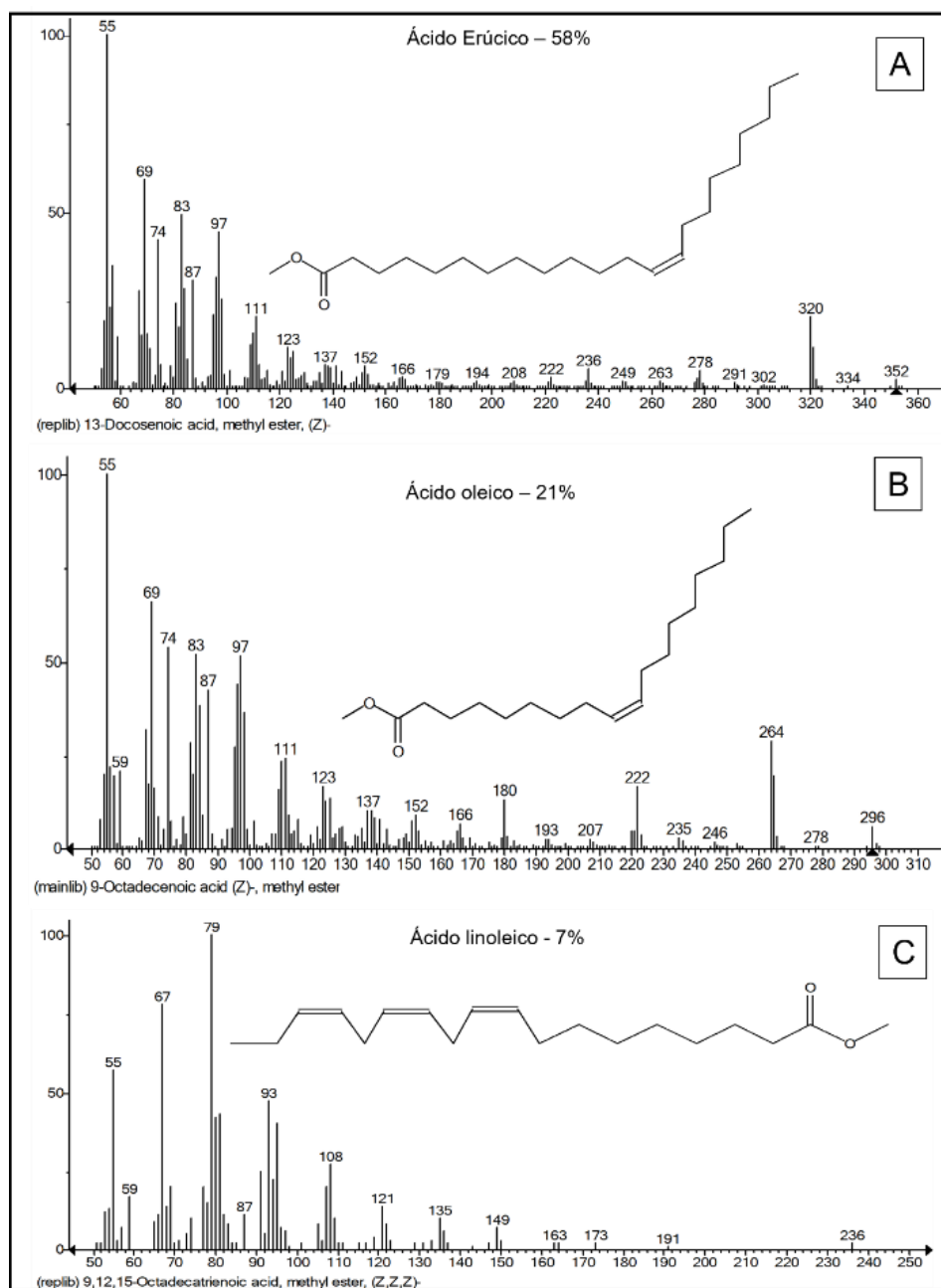


Figura 8: Espectro de massas de ácidos graxos do óleo de *Crambe abyssinica* analisado via impacto de elétrons EI A) Espectro éster metílico do ácido erúico, o componente majoritário do óleo vegetal de *Crambe* B. Espectro éster metílico do ácido oleico, o segundo componente mais abundante C. Espectro éster metílico do ácido linoleico.

Tabela1: Composição dos componentes de ácidos graxos encontrados na amostra de óleo de *Crambe abyssinica Hochst* e analisados por GC-MS.

Composto	Min.	Área	%
Ester metílico de ácido Mirístico	35.02	1150692	0.04
Ester metílico de ácido Palmitoleico	41.08	3278125	0.10
Ester metílico de ácido Palmitico	41.87	47994153	1.50
Ester metílico de ácido Linoleico	47.14	231080196	7.22
Ester metílico de ácido Oleico	47.54	692134561	21.63
Ester metílico de ácido Stearico	48.08	30026295	0.94
Ester metílico de ácido Linolenico	52.22	2129083	0.07
Ester metílico de ácido cis-11.14-eicosadienoico	52.82	3480067	0.11
Ester metílico de ácido cis-11-Eicosenoico	53.06	98122395	3.07
Ester metílico de ácido cis-13-Eicosenoico	53.2	29173533	0.91
Ester metílico de ácido Arachidico	53.76	33738423	1.05
Ester metílico de ácido Erucico	58.88	1875000000	58.59
Ester metílico de ácido Behenico	59.18	91092608	2.85
Ester metílico de ácido Nervonico	63.32	36976502	1.16
Ester metílico de ácido Lignocericico	63.9	21406999	0.67

4.2 Atividade larvicida do óleo de crambe

As concentrações testadas do óleo de crambe mostraram atividade larvicida contra *Ae. aegypti* dose dependente (Figura 9 A e B). A concentração de 0,5% a 1,75 % do óleo reduziu estatisticamente entre 14% e 20 % a sobrevivência das larvas ($P \leq 0,0001$; $\chi^2=45,36$; gl=6) em comparação ao grupo controle. Entretanto a concentração entre 2,5% e 5% (Fig. 9B) reduziram a sobrevivência larval entre 22,5% e 47% ($P \leq 0,0005$; $\chi^2=15,23$; gl=2). O tempo médio de sobrevivência (S_{50}) não pode ser determinado, devido ao número de larvas sobrevenientes ao final do monitoramento. O detalhamento das estatísticas contendo os valores de qui-quadrado e valores e grau de liberdade e tempo médio de sobrevivência (S_{50}) podem ser observadas na tabela 2.

O óleo de crambe (*Crambe abyssinica*) comparado aos óleos de canola (*Brassica napus*) e soja (*Glycine max*) na concentração de 5% com tempo de exposição de 72 horas, reduziu a sobrevivência larval ($P \leq 0,0001$; $\chi^2=249,6$; gl=2) em 93% (Figura 10) Comparado aos controles água e Tween 0,03%. O tempo médio de sobrevivência (S_{50}) foi em 48 horas.

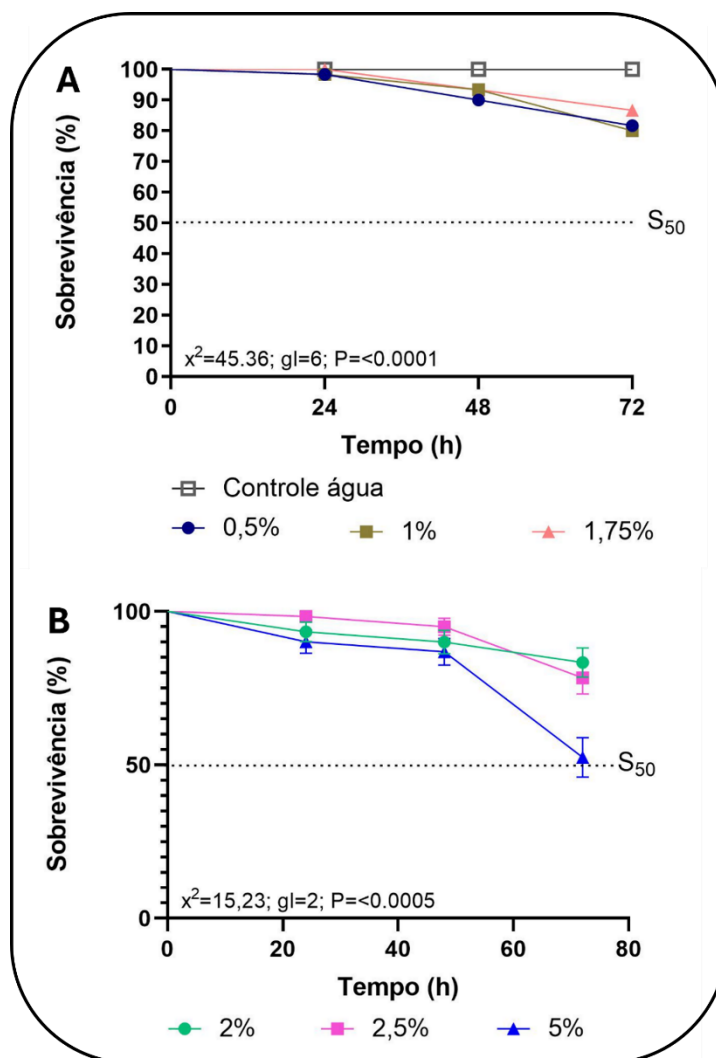


Figura 9:Ensaio de sobrevivência com larvas (L2-L3) de *Aedes aegypti* expostas ao óleo *Crambe abyssinica* em concentrações de 0,5%, 1%, 1,75%, 2%, 2,5%, 5% e controle água em intervalos de 0h, 24h, 48h e 72h. A linha pontilhada representa a S_{50} . O teste de log-rank forneceu a comparação estatística (valores de $P \leq 0.0001$) e valores de qui-quadrado (χ^2). Nota: graus de liberdade (gl); Ctr = controle; ns = não significativa.

Tabela 2: Comparações log-rank pareadas de taxas de sobrevivência e tempo médio de sobrevivência (S50) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao óleo de *Crambe abyssinica* 0,5%, 1%, 1,75%, 2%, 2,5%, 5%.

Óleo de <i>C. abyssinica</i>	Dose (%)							S ₅₀
	CTR	0,5%	1%	1,75%	2%	2,5%	5%	
CTR	-	$\chi^2=11,74$ $P=0,006$	$\chi^2=12,87$ $P=0,003$	$\chi^2=8,290$ $P=0,0040$	$\chi^2=10,64$ $P=0,0011$	$\chi^2=14,05$ $P=0,0002$	$\chi^2=36,10$ $P\leq 0,0001$	ND
0,5%	-	-	$\chi^2=0,02768$ $P=0,8679$	$\chi^2=0,5950$ $P=0,4405$	$\chi^2=0,03377$ $P\leq 0,8542$	$\chi^2=0,1171$ $P\leq 0,7322$	$\chi^2=10,25$ $P\leq 0,0014$	ND
1%	-	-	-	$\chi^2=0,8963$ $P=0,3438$	$\chi^2=0,1334$ $P=0,7149$	$\chi^2=0,0320$ $P=0,8580$	$\chi^2=9,747$ $P=0,0018$	ND
1,75%	-	-	-	-	$\chi^2=0,3325$ $P=0,5642$	$\chi^2=1,274$ $P=0,2591$	$\chi^2=15,59$ $P\leq 0,001$	ND
2%	-	-	-	-	-	$\chi^2=0,0301$ $P=0,5833$	$\chi^2=11,34$ $P=0,0008$	ND
2,5%	-	-	-	-	-	-	$\chi^2=8,981$ $P=0,0027$	ND
5%	-	-	-	-	-	-	-	ND

Significância estatística (valor P) entre *Aedes aegypti* expostos ao ácido erúico. ND (Não determinado) e χ^2 (valor qui-quadrado).

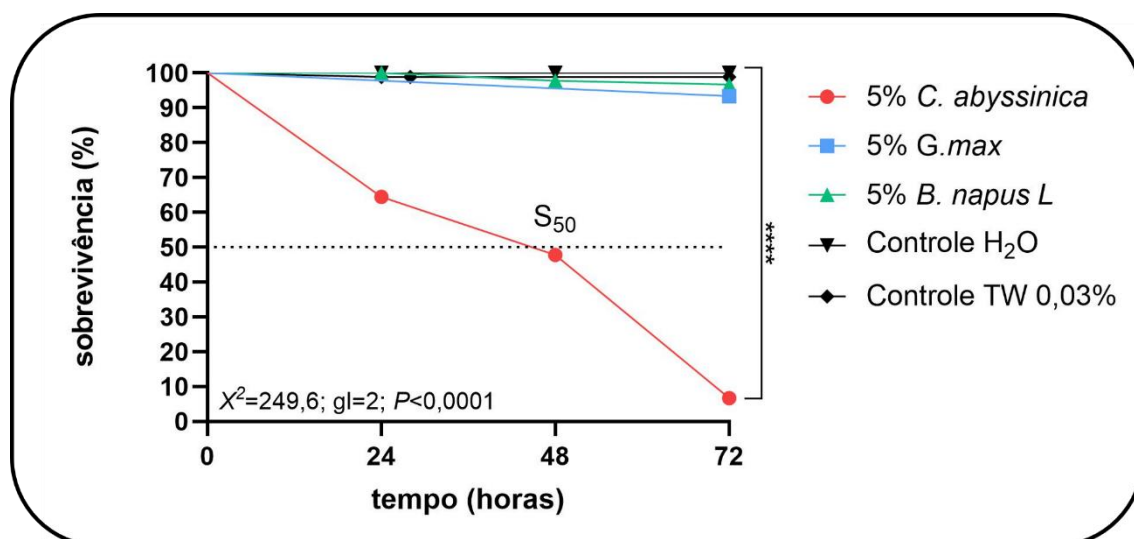


Figura 10: Ensaio de sobrevivência com larvas (L2-L3) de *Aedes aegypti* expostas aos óleos *Crambe abyssinica*, *Brassica napus*, *Glycine max*, em concentrações de 5%, controle 0,03% de tween, e H₂O em intervalos de 0h, 24h, 48h e 72h. O teste de log-rank forneceu a comparação estatística (valores de $P \leq 0,0001$) e valores de qui-quadrado (χ^2). Nota: graus de liberdade (gl).

4.3 Atividade larvícida do ácido erúcico

O ácido erúcico, componente majoritário do óleo de crambe, ausente nos óleos de soja e canola, apresentou atividade larvícida dose dependente contra *Ae. aegypti* (Figura 11 A e B). O efeito do ácido erúcico para as concentrações 2,5 e 4,0 mg/mL é apresentado na (Figura 11A) e para as concentrações $\leq 2,0$ mg/mL (Fig.11B). Em 72 horas, nenhuma larva sobreviveu à presença do ácido na maior concentração testada, 4 mg/mL e, na presença do ácido a 2,5 mg/mL, a mortalidade foi de 85%.

O efeito larvícida do óleo foi menor nas doses de 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL, promovendo uma redução da sobrevivência de 5% e 3% respectivamente. O detalhamento das estatísticas contendo os valores de qui-quadrado e valores do grau de liberdade e tempo médio de sobrevivência (S_{50}) podem ser observadas na tabela 3.

O percentual de sobrevivência foi de 50% em menos de 24 horas (S_{50}). Já ao final de 72 horas, houve uma redução de 80% na sobrevivência larval, sendo estatisticamente significativo ($P < 0,0001$) em comparação a ambos os controles (Figura 11). Foi possível também, observar que larvas expostas ao ácido erúcico em concentrações $\geq 2,0$ mg/mL, após 48 horas, foi expelido uma substância, como pode ser observado (Figura 11 C e D).

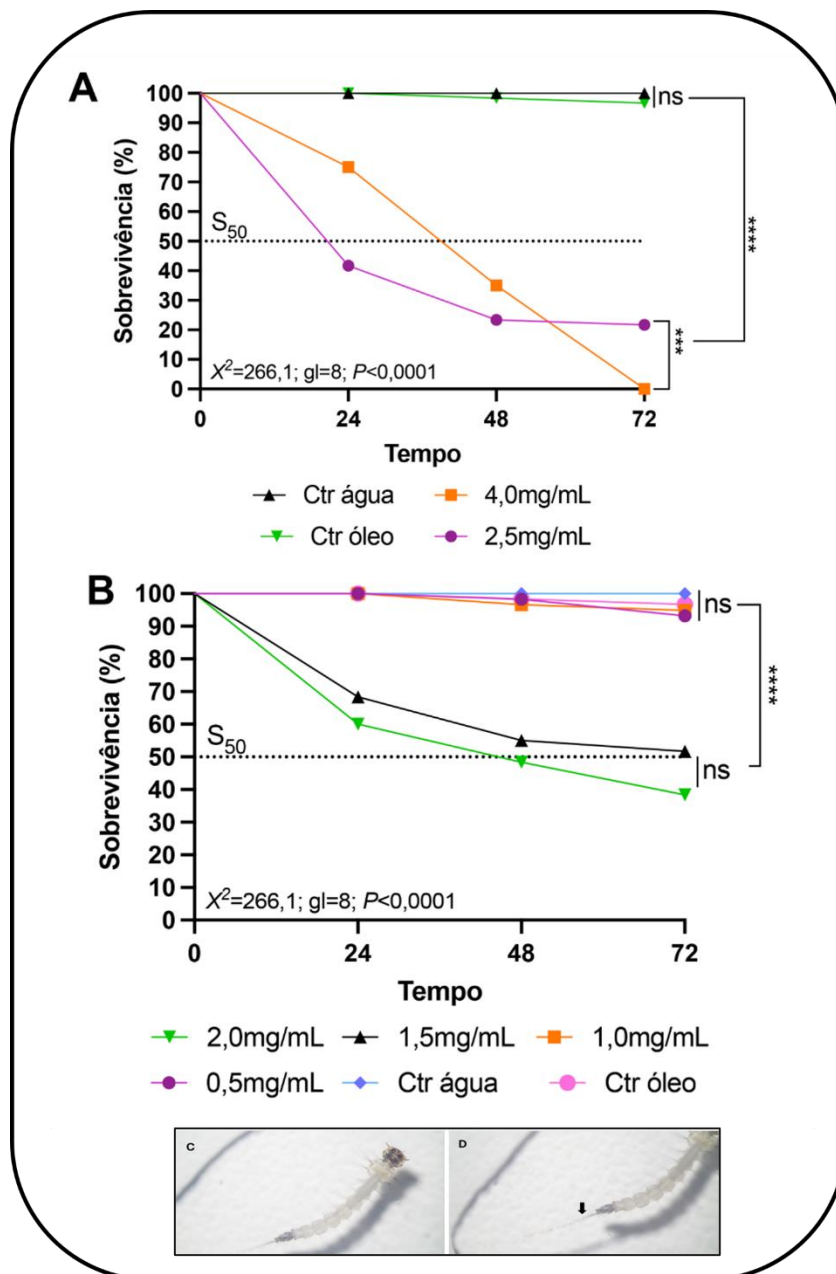


Figura 11: Ensaio de sobrevivência com larvas (L2-L3) de *Aedes aegypti* na presença do ácido erúrico, o componente majoritário do óleo de *Crambe abyssica* por 12, 24, 48 e 72 horas. (A) concentrações 2,5 e 4,0 mg/mL. (B) concentrações de 0,5, 1,0; 1,5; 2,0; mg/mL. (C e D) extrusão da membrana peritrófica de larvas tratadas. O teste de log-rank forneceu a comparação estatística (valores de $P \leq 0,05$) e valores de qui-quadrado (χ^2). Nota: graus de liberdade (gl); Ctr = controle; ns = não significativa.

Tabela 3: Comparações log-rank pareadas de taxas de sobrevivência e tempo médio de sobrevivência (S50) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao ácido erúico a 0,5/ 1,0/ 1,5/ 2,0/ 2,5 e 4,0 mg/mL.

Ácido Erúico	Dose (mg/ml)								S ₅₀
	H ₂ O	óleo	0,5 mg/ml	1,0mg/ml	1,5 mg/ml	2,0 mg/ml	2,5 mg/ml	4,0 mg/ml	
H ₂ O	-	$\chi^2=1,866$ P=0,1720	$\chi^2= 3,845$ P= 0,0499	$\chi^2=2,880$ P=0,0897	$\chi^2=36,41$ P≤0,0001	$\chi^2= 51,74$ P≤0,0001	$\chi^2=77,16$ P≤0,0001	$\chi^2= 117,2$ P≤0,0001	ND
óleo	-	-	$\chi^2=0,7155$ P= 0,3976	$\chi^2= 0,2277$ P=0,6332	$\chi^2= 32,87$ P≤0,0001	$\chi^2= 48,81$ P≤0,0001	$\chi^2=75,75$ P≤0,0001	$\chi^2=116,7$ P≤0,0001	ND
0,5mg/ml	-	-	-	$\chi^2=0,1361$ P=0,7121	$\chi^2= 27,45$ P≤0,0001	$\chi^2=42,85$ P≤0,0001	$\chi^2=70,08$ P≤0,0001	$\chi^2=110,1$ P≤0,0001	ND
1,0 mg/ml	-	-	-	-	$\chi^2=29,59$ P≤0,0001	$\chi^2=44,92$ P≤0,0001	$\chi^2=71,67$ P≤0,0001	$\chi^2= 110,5$ P≤0,0001	ND
1,5mg/ml	-	-	-	-	-	$\chi^2= 1,914$ P=0,1665	$\chi^2= 12,53$ P=0,0004	$\chi^2=20,79$ P≤0,0001	ND
2,0mg/ml	-	-	-	-	-	-	$\chi^2=5,128$ P=0,0235	$\chi^2=9,823$ P=0,0017	48
2,5mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	$\chi^2=0,03644$ P=0,8486	24
4,0mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	48

Significância estatística (valor P) entre *Aedes aegypti* expostos ao ácido erúico. ND (Não determinado) e χ^2 (valor qui-quadrado).

4.4 Análise *in silico* do ácido erúcico

A análise *in silico* identificou 150 possíveis alvos moleculares que podem ser afetados pelo ácido erúcico. Entre esses alvos, 44% (66/150) estão relacionados ao citocromo P450 (CYP), 10% (15/150) correspondem a uma resposta imune, 6% (9/150) estão relacionados ao sistema nervoso, 7,3% (11/150) estão relacionados à formação da cutícula, 14,6% (22/150) estão associados à ação digestiva e 16,6% (25/150) estão relacionados ao metabolismo lipídico. Algumas moléculas estão listadas na Tabela 4 e os demais alvos moleculares relacionados ao ácido erúcico podem ser acessados no apêndice A.

Tabela 4 Alguns alvos de ácido erúcico selecionados a partir da análise no software PASS online®. O potencial de ativação e o potencial de inibição da molécula são determinados.

Ácido erúcico			
Composição	Atividade	Potencial de ativação (p.a)	Potencial de inibição (p.i)
Citocromo	CYP2J substrate	0.974	0.001
Indução da resposta imune	Macrophage colony-stimulating factor agonist	0.92	0.002
Sistema nervoso	Neurotransmitter antagonista	0.547	0.004
Síntese de quitinase e quitina	Acetyltransferase inhibitor	0.861	0.001
Ação de enzimas digestivas	Glucan,endo-1,3-beta-D-glucosidase inhibitor	0.443	0.010
Indução de lipídeos	Lipoprotein lipase inhibitor	0.928	0.002
Atividades inseticida	Insecticide	0.318	0.014
Ovoposição	Ovulation inhibitor	0.572	0.025

4.5 Avaliação de efeitos morfológicos do ácido erúcico sobre as larvas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Larvas mantidas na presença de ácido erúcico 2,0 mg/mL por 24 horas foram observadas por MEV (Figura 12). Mudanças morfológicas foram observadas no exoesqueleto, sendo mais evidentes na cutícula com um aparente descolamento no tórax e no abdômen das larvas (Figura 12 B, seta branca).

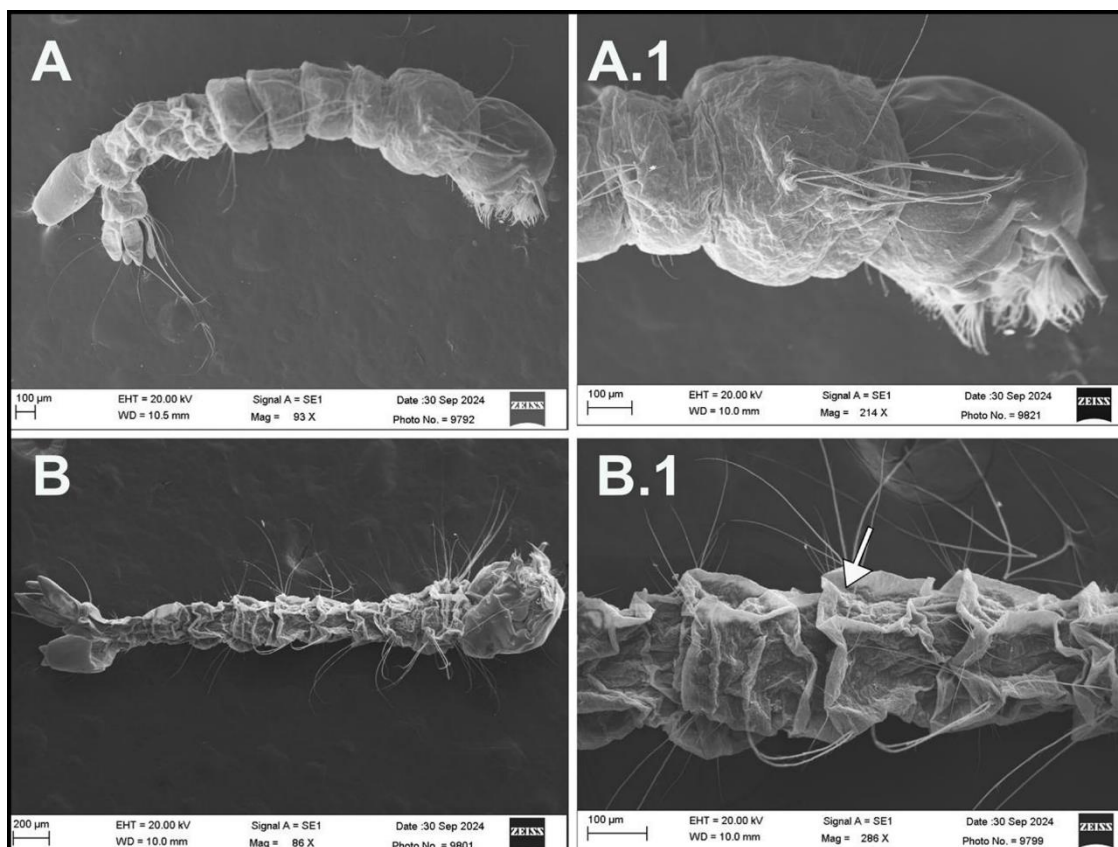


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura de larvas *Aedes aegypti*. (L3) não tratadas (A e A1). A na magnitude de 93x e A.1 na magnitude de 214x. Larvas tratadas com 2mg/mL de ácido erúico (B) magnitude de 96 e (B1) magnitude de 296x. A amostra apresenta descolamento de cuticular (seta branca).

4.6 Análise Histopatológica

Os intestinos médios das larvas do grupo controle apresentaram células epiteliais (enterócitos) cubóides com aspecto saudável (Figura 13). Foram observados enterócitos com citoplasma (c) preservado, núcleo (n) com baixa atividade (ausência de retrações nuclear), e domínio apical ciliar (bb-borda em escova) preservados ao longo de todo o intestino. Predominância de eucromatina (Fig. 13 b.1- cabeça de seta amarela) indicando regiões fibrilares e claras do núcleo. A luz do intestino apresentou material extracelular (mec produzido pelos enterócitos). Além disso foram visualizados a presença de uma fina membrana peritrófica (Fig. 13 a,b-seta branca).

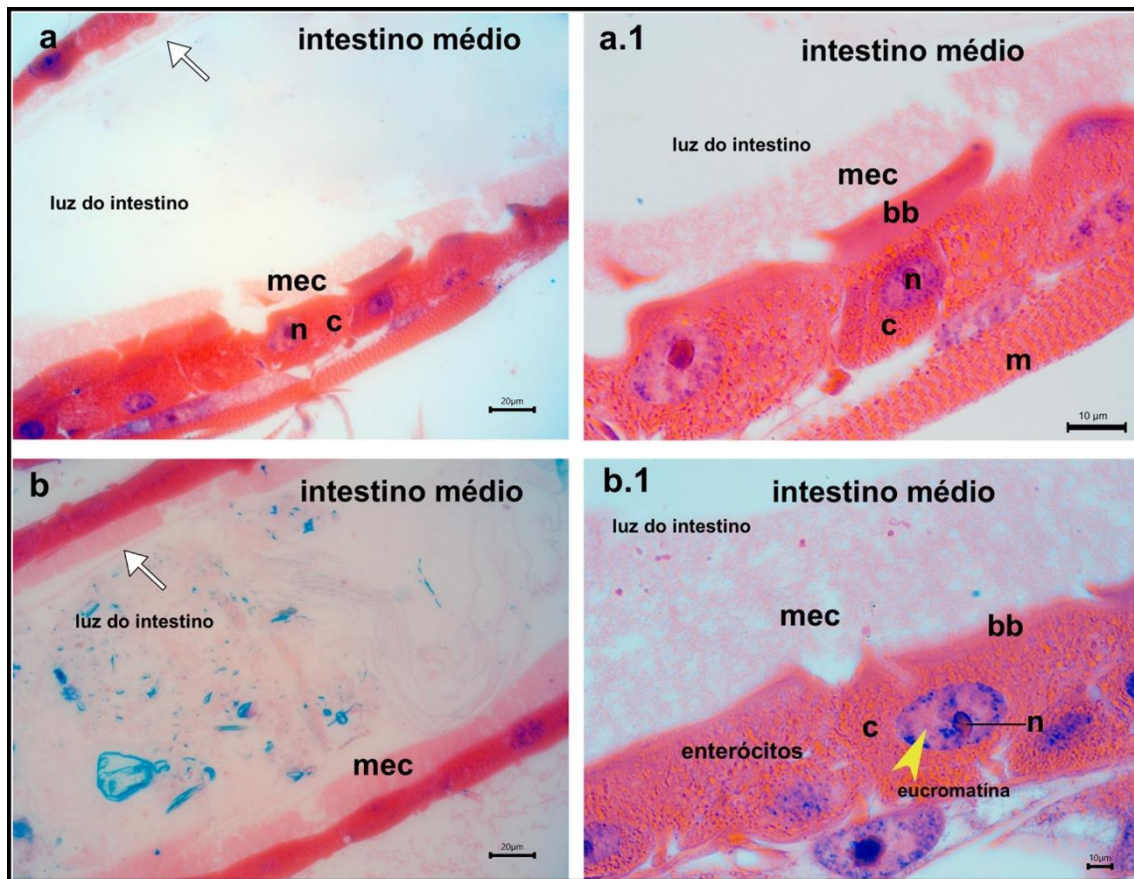


Figura 13: Histologia do intestino médio das larvas de *Aedes aegypti* expostas somente a água (grupo controle). (a; b) Aspecto geral do intestino médio na objetiva de $\times 400$; (a.1; b.1) observação mais detalhada ($\times 10000$) do intestino médio apresentando enterócitos ciliados cuboide com citoplasma integro (c), borda em escova (bb) não degenerada e presença de material extracelular na luz dos enterócitos e fina membrana peritrófica (seta branca). N= núcleo; cabeça de seta amarela= eucromatina nuclear.

As larvas tratadas com o óleo de crambe apresentaram as células do intestino anterior (Fig. 14 a, c) e do intestino médio (Fig. 14 b) danificados. Na região do intestino anterior (Fig. 14 a, c) as células epiteliais cilíndricas apresentaram vacuolização citoplasma intensa (Fig 14 a.1, b.1 e c- seta preta). Alguns enterócitos apresentaram vacuolização nuclear (Fig. 14 c quadrado preto) e ruptura de núcleo (Fig. 14 c círculo preto). Não foram observados degeneração das bordas em escova (bb). Na luz o intestino foi observado vacúolos semelhantes a corpúsculos de lipídio (Fig. 14- seta azul) e membrana peritrófica mais espessa (Fig. 14 seta verde).

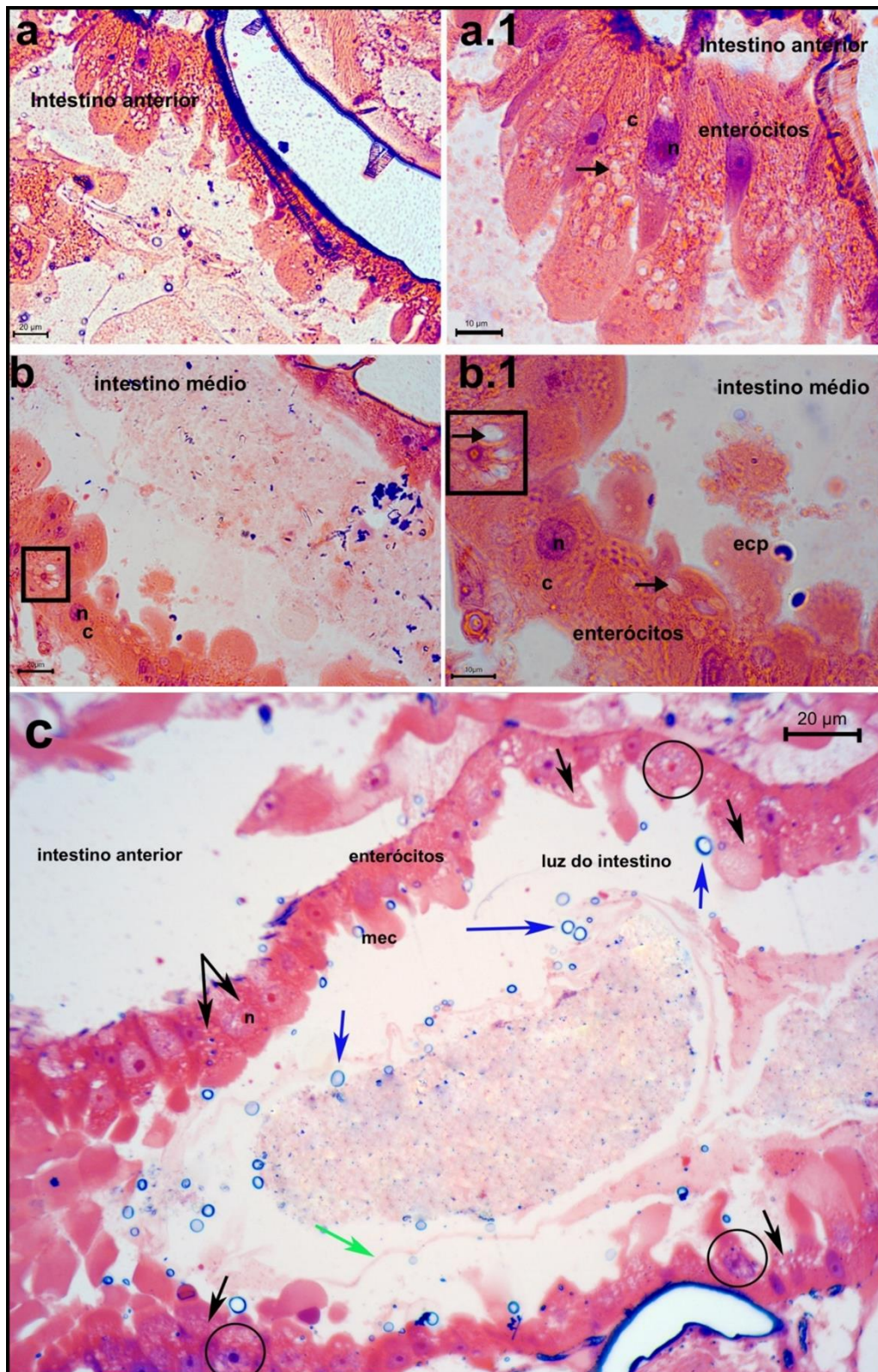


Figura 14: Histologia do intestino médio das larvas de *Aedes aegypti* expostas ao óleo de crambe (a; b; c). Aspecto geral do intestino médio na objetiva de $\times 400$; (a.1; b.1) observação mais detalhada ($\times 10000$) do intestino médio apresentando enterócitos ciliados cuboide com citoplasma degenerado (c), núcleo vacuolizado (quadrado preto). As bordas em escova (bb) dos enterócitos se mostraram integras. Foi observado a presença de material extracelular na luz dos enterócitos e uma fina membrana peritrófica (seta verde). Seta azul indica vacúolos semelhante a corpúsculos de lipídio. Círculo preto indica ruptura de núcleo celular.

As larvas tratadas com ácido erúico (Fig. 15) apresentaram resultados similares ao tratamento com óleo de crambe. Foram observados vacuolização citoplasmática (seta preta) em diversos pontos do epitélio intestinal. Algumas células apresentaram características morfológicas de necrose como aumento do núcleo celular (Fig. 15 e, pentágono preto) e ruptura nuclear (Fig 15a- círculo preto). As larvas tratadas com ácido também apresentarem borda em escova íntegra (bb) e a luz do intestino com material extracelular no espaço ectoperitrófico, porém uma amostra apresentou espessamento da membrana peritrófica (Figura 15 d- seta branca).

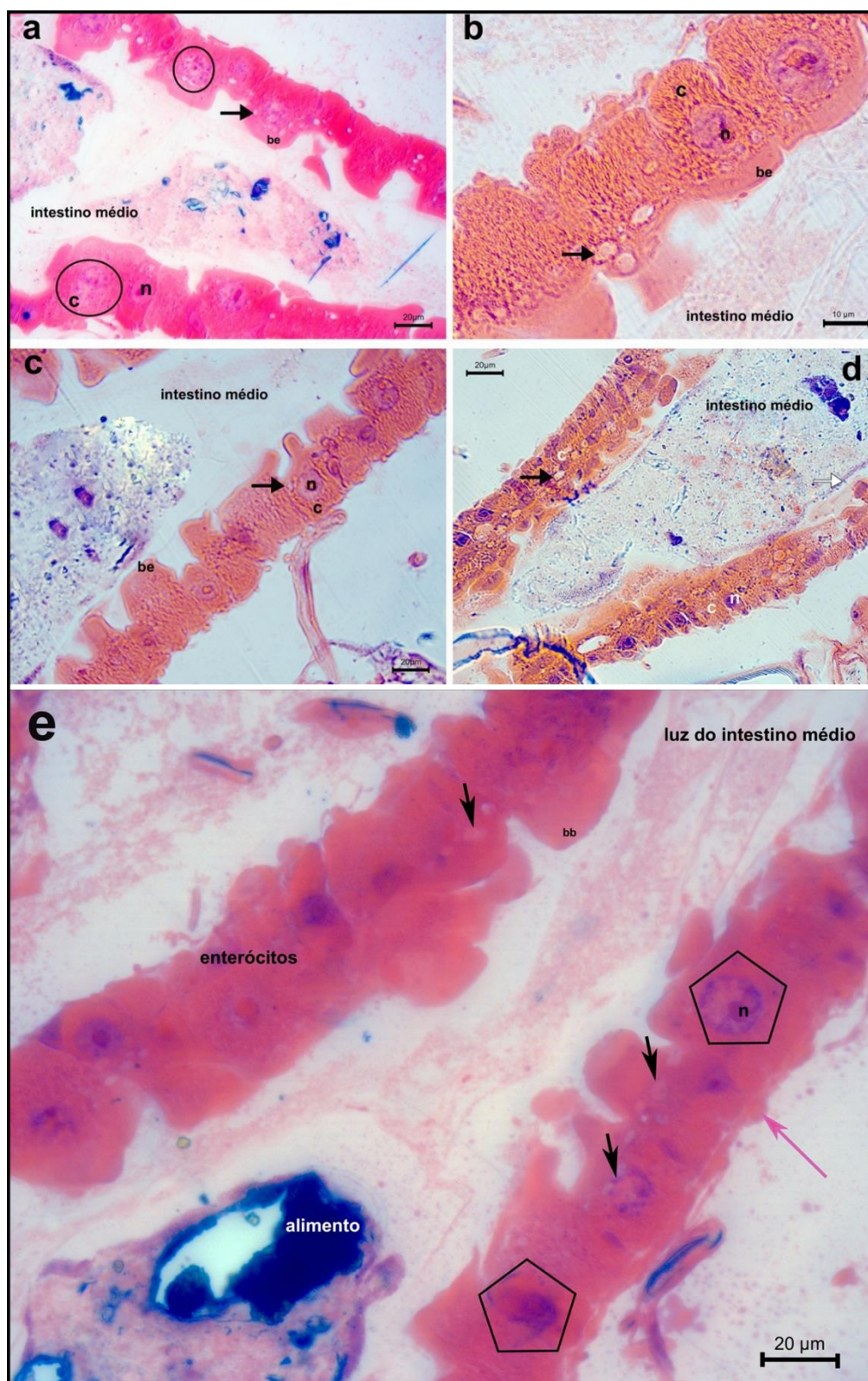


Figura 15: Histologia do intestino médio das larvas de *Aedes aegypti* expostas ao ácido erúrico (a; b; d). Aspecto geral do intestino médio na objetiva de $\times 400$; (c;e) observação mais detalhada ($\times 10000$) do intestino médio apresentando enterócitos ciliados cuboide com citoplasma vacuolizado (seta preta). Alguns enterócitos com evidente ruptura de núcleo (círculo preto). As bordas em escova (bb) dos enterócitos se mostraram integras. Foi observado a presença de material extracelular na luz dos enterócitos. Amostra com espessamento da membrana peritrófica (seta branca).

4.7 Teste inibitório da acetilcolinesterase – AChE

Ocorreu uma diminuição significativa ($P < 0,0001$), na atividade da acetilcolinesterase das larvas tratadas com ácido erúcico no tempo de 2h. A média das absorbâncias aponta uma redução de 46 % comparado ao controle (figura 16). A diferença significativa dos grupos está representada por letras minúsculas diferentes (a e b).

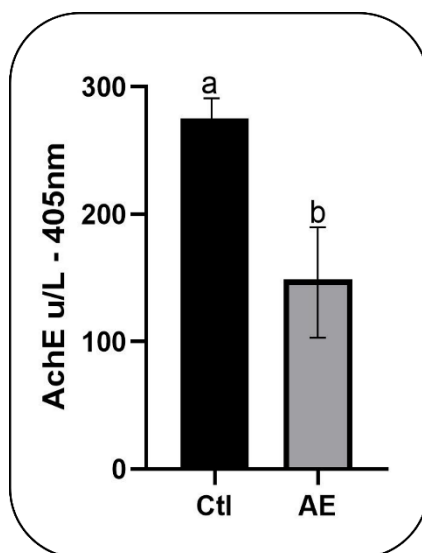


Figura 16: Inibição da acetilcolinesterase. As larvas foram tratadas com 2,5 mg/ml de ácido erúcico (AE) e a enzima foi extraída com tampão de atividade da acetilcolinesterase em N_2 . Leitura de absorbância a 405 nm, com percepção colorimétrica em leitor de placas. Os testes foram realizados com três repetições do ensaio. As letras minúsculas diferentes indicam a diferença entre os grupos no mesmo tempo (a e b).

4.8 Encapsulamento do óleo de *Crambe abyssinica*

As partículas, após serem secas em estufa apresentaram formato esférico irregular, medindo em torno de 1mm (figura 17). As cápsulas de alginato de cálcio, apresentaram aspecto transparente (fig. 17 A e D); as cápsulas contendo ácido erúcico apresentaram uma coloração branca (fig. 17 B e E) enquanto as cápsulas com óleo de crambe possuem uma coloração amarelada (fig. 17 C e F).

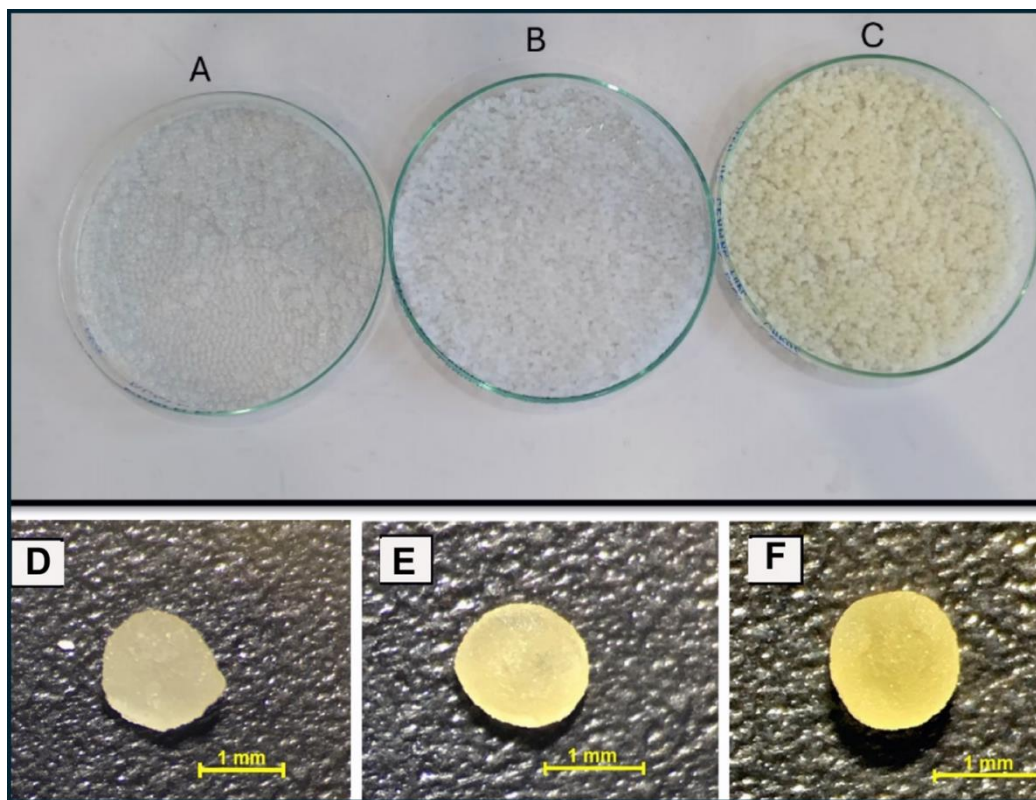


Figura 17: Cápsulas em matriz de alginato antes e depois da secagem observadas ao estereomicroscópio A e D- alginato de cálcio (controle); B e E- alginato de cálcio com ácido erúcico. (C e F); óleo de *Crambe abyssinica*. Medindo em torno de 1mm, com bordas irregulares.

4.9 Bioensaio com cápsulas

O grupo exposto somente ao alginato não apresentou nenhuma alteração no percentual de sobrevivência larval; no entanto, partículas contendo óleo de canola, apresentaram 6% na redução da sobrevivência larval. Este resultado é estatisticamente significativo com comparação ao controle ($\chi^2 = 7,153$; gl=1; $P=0,0075$). A figura 18, mostra que tanto o óleo de crambe quanto o ácido erúcico apresentaram atividade larvicida em 96h, 60% das larvas de *Ae. aegypti* após serem expostas as cápsulas do óleo de crambe, reduzindo a sobrevivência ($\chi^2=81,31$, gl=1; $P<0,0001$) em comparação ao controle alginato puro enquanto o ácido erúcico, encapsulado reduziu 30% na sobrevivência das larvas ($\chi^2= 24,66$; gl=1; $P<0,0001$) em comparação ao controle alginato puro. O óleo de crambe encapsulado apresentou, portanto, o melhor efeito na redução da sobrevivência das larvas ($\chi^2=29,65$; $P<0,0001$) em comparação ao ácido erúcico e ao tratamento com canola ($\chi^2=60,48$; $P<0,0001$).

O tratamento com cápsulas de ácido erúcico mostrou-se estatisticamente mais eficaz do que o óleo de canola ($\chi^2 = 9,166$; $P = 0,0025$). Somente as larvas tratadas com cápsulas contendo óleo de crambe alcançaram uma S_{50} de 72 horas. Nos demais tratamentos, não foi possível determinar a S_{50} .

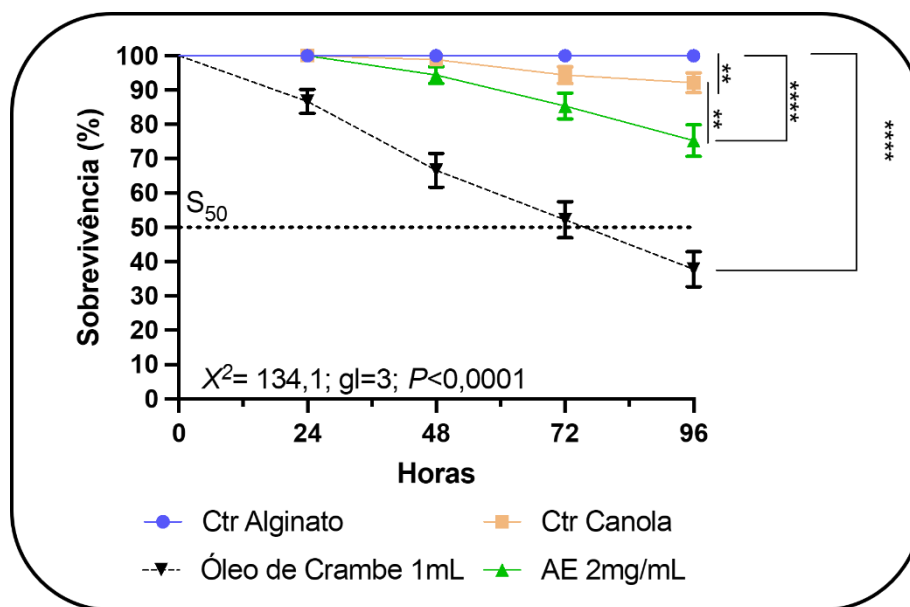


Figura 18: Bioensaio com o óleo de *Crambe abyssinica* encapsulado em matriz de alginato de sódio. As esferas foram testadas com 10 larvas L3 de *Aedes aegypti* em poços contendo 20mL de água. Primeiro com as esferas controle, alginato de cálcio, após, alginato de cálcio com ácido erúcico (2mg/mL), alginato de cálcio com óleo de canola(1mL) e alginato de cálcio e óleo de crambe (1mL). O teste de log-rank forneceu a comparação estatística (valores de $P \leq 0,05$) e valores de qui-quadrado (χ^2). Nota: graus de liberdade (gl); Ctr = controle; ns = não significativo. Ensaio realizado em triplicata com 3 repetições.

5 DISCUSSÃO

Pela primeira vez, o óleo e o componente majoritário do óleo de crambe, o ácido erúcico, foram testados contra *Ae. aegypti*. Aqui, tanto a emulsão do óleo quanto as cápsulas foram efetivos contra as larvas de *Ae. aegypti*. Além disso, seu efeito na atividade inibitória da AChE e no aspecto morfológico e histopatológico das larvas de *Ae. aegypti*, foram demonstrados.

Ao analisar o óleo de crambe por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, identificou-se o éster metílico do ácido erúcico como o principal componente do óleo de crambe, representando 58,6% da composição, dentre outros, como os ésteres metílicos de ácidos oleico 21% e linoleico 7%. Essa caracterização é compatível com a literatura em que o percentual do ácido erúcico é em torno de 50%, oleico 19% e linoleico 8% (MACHADO *et al.* 2007). O ácido erúcico (C22:1, $\Delta^{13}Z$) é um ácido graxo monoinsaturado de cadeia muito longa, pode ser extraído da Colza, crambe e mostarda. Sua estrutura, utilização industrial, formulações e potencial tóxico, já foram descritos (ZORN, 2019, VETTER *et al.*, 2020, NCBI, 2024).

Ao comparamos o efeito larvicida do óleo de crambe, com os óleos comestíveis, canola e soja, verificamos que os dois não reduziram a sobrevivência das larvas. Mas, observamos que o óleo de crambe demonstrou toxicidade, com redução da sobrevivência em 93% em 72 horas de tratamento.

Considerando a menor densidade do óleo em comparação à água, e a formação de um filme, ou seja, uma barreira física na superfície da emulsão, podemos sugerir que este filme não impediu o desenvolvimento larval, já que, conforme foi descrito por Lee e colaboradores (2018) as larvas de mosquitos necessitam subir à superfície da água para respirar através de seus sifões e a formação de uma camada de óleo sobre a água poderia obstruir esses sifões, levando à asfixia delas, o que não ocorreu com os demais óleos, que apresentam densidade compatíveis com a do óleo de crambe, sugerindo um efeito larvicida oriundo da composição do óleo. Dessa forma, ao avaliarmos o ácido erúcico como composto tóxico no óleo de crambe constatou-se a redução da sobrevivência larval em dose dependente em 60% a 85% em que a S50 em 24h na concentração de 2,5mg/mL. Nesse contexto, os estudos de Silva e colaboradores (2017) reportaram que o óleo volátil extraído das sementes de

Syagrus coronata (licuri) mostrou uma atividade larvícida e os ácidos graxos presentes, como o ácido octanoico, decanoico e dodecanoico, também demonstraram esse mesmo efeito.

O efeito larvícida de óleos extraídos de plantas estão constantemente sendo estudados, como por Ali e colaboradores (2018) relatam o óleo de Nim, mata efetivamente 90% das larvas do mosquito *Culiseta longiareolata* na concentração de 1% em 48 horas. Óleo das sementes de *Euterpe oleracea* (açaí), que apresentou atividade significativa em larvas e pupas de *Ae. aegypti*, com um índice de mortalidade diretamente proporcional ao tempo de exposição nas concentrações de 1,7, 3,5 e 6,8 mg/mL (DE OLIVEIRA *et al.*, 2024). Também, os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Syzygium Aromaticum* (cravo-da-índia) (SOONWERA *et al.*, 2016), óleo de *Carapa guianensis* (SARQUIS *et al.*, 2020), óleos essenciais de várias famílias de plantas, como *Lamiaceae*, *Myrtaceae* e *Piperaceae* (DE SOUZA *et al.*, 2020), óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* (SIERRA *et al.*, 2021) e óleo essencial de *Tagetes erecta* (MARQUES *et al.*, 2011).

Apesar de todos esses estudos, na literatura não há relatos do efeito larvícida do óleo vegetal da crambe. Porém outros alvos e efeitos já foram investigados, como a albumina 2S do crambe exibe atividade contra as formas amastigota e epimastigota do *Trypanosoma cruzi* e pode ser fonte de novos compostos clinicamente ativos contra o parasita (ARAÚJO *et al.*, 2023). Já foi investigado sua atividade acaricida em carrapato bovino (*Rhipicephalus microplus*) por Mattos e colaboradores (2021) com uma mortalidade significativa das larvas em 24 horas, (LC90) de 14,4%, para as fêmeas e uma alta inibição da oviposição. Estas ações foram atribuídas à presença de hidrocarbonetos, fenóis e aldeídos. Em um outro estudo, Peterson e colaboradores (2000) viram que o farelo da semente desengordurada de crambe foi tóxico para a mosca doméstica (*Musca domestica*) e atribuíram este efeito aos compostos 2-(S)-1-ciano-2-hidroxi-3-butenos (SCHB) e Feniletil Cianeto. Também foi visto que, glicosinolatos das sementes com possuem efeito tóxicos para as larvas de mosquito *Aedes aegypti*, larvas de mosca doméstica (*Musca domestica*), besouros de grãos, como o besouro vermelho da farinha (*Tribolium castaneum*) e o besouro do grão serrado (*Oryzaephilus surinamensis*) (TSAO, 1996).

As predições *in silico* são ferramentas úteis para iniciar os estudos de mecanismo de ação, as quais foram também empregadas por Bitencourt et al. (2022), ao investigar possíveis alvos para o composto sabineno, isolado de *Schinus molle* L sobre as larvas de *Ae. aegypti*. No presente trabalho os estudos *in silico* forneceram evidências de que o ácido erúico apresenta alvos moleculares importantes no inseto. Dentre as moléculas apontadas nesse estudo algumas foram selecionadas, como a *CYP2J substrate*, relacionada a cadeia respiratória, observados no trabalho de Castillo-Morales e colaboradores (2021) em que alvos relevantes como citocromo P450, foram estudados.

Processos biológicos relacionados ao sistema imune como *Macrophage colony-stimulating*, na literatura foi observado que, pesticidas como atrazina, compostos organofórmicos, carbamatos e piretróides também inibem a sobrevivência e o crescimento de leucócitos, interferindo funções imunológicas específicas das células imunes (LEE, G., & CHOI, K., 2020). Além desses, o Mancozeb, clorotalonil, e tiofanato metílico são pesticidas comumente usados na agricultura, induziu a proliferação de macrófagos exercem um efeito imunomodulador no sistema imunológico (WEIS, 2019). Ainda, dados relatados por Huang e colaboradores (2019), ao usarem o óleo essencial de *Arisaema fargesii* e seu constituinte isolado apresentaram efeito inibitório sobre as enzimas de defesa das larvas do mosquito *Aedes*.

A predição *in silico* também apontou para o efeito na *Acetyltransferase inhibitor* que segundo Zhang e colaboradores (2022) a arilalquilamina, N-acetiltransferase (aaNAT) em *Aedes aegypti* está envolvida principalmente na pigmentação e formação da cutícula tanto na mosca-das-frutas oriental (*Bactrocera dorsalis*) quanto no vetor do arbovírus, *Aedes aegypti*. (ZENG et al., 2024). Também a *Chitinase inhibitor*, envolvida na interrupção e regulação da quitina, que já foi investigado em gorgulhos vermelhos da palmeira, (*Rhynchophorus ferrugineus*) em que o Novaluron, retardou o crescimento e a remodelação da quitina (HUSSAIN et al., 2019). Nos estudos de Jiang e colaboradores (2023) testaram substâncias com efeito inibitório significativo na trealase, que inibiu significativamente a atividade da quitinase em pupas fêmeas (JIANG et al., 2023).

Neste, foram observadas alterações morfológicas no exoesqueleto das larvas tratadas com o ácido erúico, podendo sugerir uma ação neste

mecanismo. Esse fato também observado por Bertonceli e colaboradores (2022) ao tratar as larvas com rotenóides isolados de *Clitoria fairchildiana* em concentrações de 80 PPM e 160 PPM. Outros estudos sugerem que compostos como reguladores de crescimento de insetos, harmalina, inibidores de trealase e ésteres de timol podem impedir a ecdise de larvas de insetos ao inibir o desenvolvimento larval, causar anomalias morfogênicas e afetar o metabolismo da quitina (RAHMAN *et al.*, 2023; TANG *et al.*, 2024). E embora nossa investigação tenha sido morfológica, podemos sugerir estudos futuros voltados ao metabolismo da ecdise.

Alvos moleculares relacionados ao sistema digestório também foram encontrados como *Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase inhibitor*. As β -1,3-glucanases foram descritas como abundantes no trato digestivo de insetos das ordens *Collembola*, *Trichoptera*, *Dictyoptera*, *Orthoptera*, *Isoptera*, *Coleoptera* e *Diptera*, e como as β -glucanases não estão presentes em vertebrados, elas podem ser usadas como alvo para o controle de insetos, o qual foi visto por Genta e colaboradores (2009) em *Tenebrio molitor*. Também já foi elucidado um inibidor de tripsina de sementes maduras de *S. mukorossi*, esses genes desempenham papéis cruciais no processo de digestão e no desenvolvimento larval e seu silenciamento retarda o crescimento larval, e por isso tem potencial para ser usado como um agente de controle biológico em mosca-das-frutas do melão e outras pragas (LI *et al.*, 2017).

Ainda encontramos vias reguladoras de lipídeos como a *Lipid metabolism regulator*, sabendo que os lipídios, incluindo ácidos graxos, são os segundos maiores constituintes em insetos, desempenham uma variedade de funções fundamentais e vitais. Pesticidas como Azadiractina, piriproxifeno e tebufenozida regulam significativamente o metabolismo de ácidos graxos em larvas de *Bactrocera Dorsalis*, com efeitos específicos na biossíntese de ácidos graxos e no metabolismo do ácido linoleico (ZHOU, 2024).

Além desses efeitos, a atividade inseticida e redutora da oviposição também foram sugeridas, por predição, e isto também foi visto em compostos voláteis, extraído das sementes de *Syagrus coronata* (SANTOS *et al.*, 2017). Por fim, o *in silico* propõem o *Neurotransmitter antagonista* que são compostos tóxicos que atuam como antagonistas de neurotransmissores em insetos e são de grande interesse devido ao seu potencial uso como inseticidas. Antagonistas de

pequenas moléculas de receptores de dopamina de mosquitos (DARs) estão sob investigação como uma nova classe de inseticidas seletivos de vetores. Antagonistas que inibem os DARs dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* também causam mortalidade larval em bioensaios. Atualmente, os quatro principais alvos nervosos são a acetilcolinesterase para organofosforados e metilcarbamatos, o receptor nicotínico de acetilcolina para neonicotinoides, o canal receptor/cloreto de ácido γ -aminobutírico para policlorociclohexanos e fiproles, e o canal de sódio dependente de voltagem para piretróides e diclorodifeniltricloroetano (HILL et al., 2016). Neste mesmo sentido este trabalho investigou a ação larvicida do ácido erúcico, na acetilcolinesterase (AChE). Este método baseia-se na inibição da atividade da AChE em clivar o substrato butiriltiocolina formando butirato e tiocolina. A tiocolina produzida reduz o ferricianeto de potássio, de cor amarela, em ferrocianeto de potássio, incolor. A diminuição das leituras da absorbância em 405nm decorrente da redução do ferricianeto de potássio, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da colinesterase na amostra. O kit para dosagem da atividade AChE foi adquirido da Labtest Diagnóstica S.A. Foi possível estimar que houve uma redução de cerca de 46% na atividade acetilcolinesterase quando as larvas foram expostas ao ácido erúcico. A inibição da AChE pode levar ao acúmulo de neurotransmissores, resultando em paralisia e morte larval contribuindo para a atividade larvicida observada. O efeito inibitório da AChE foi observado por Bortolucci e colaboradores (2019) para componentes do óleo de *Schinus terebinthifolius* e por Jankowska e colaboradores (2017) para componente do óleo essencial de *Schinus molle*.

Neste, os resultados histopatológicos mostraram que as larvas tratadas com ácido erúcico apresentaram alterações significativas no intestino anterior e médio, incluindo vacuolização citoplasmática e ruptura nuclear. Essas mudanças celulares são indicativas de dano severo, o que pode explicar a alta mortalidade observada nas larvas expostas. Esse resultado também foi observado em larvas de *Ae. aegypti* tratadas com extrato bruto etanólico da casca do caule da *Magonia pubescens* onde as principais alterações observadas incluíram, destruição total ou parcial das células do mesêntero, alta vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrofico, hipertrofia das células e, aparente estratificação epitelial (ARRUDA, 2003). Também relatado por Oliveira

e colaboradores (2021) que o R-limoneno causou alterações patológicas no epitélio do intestino médio do *Ae. aegypti*, incluindo vacuolização citoplasmática e ruptura nuclear. também observaram alterações histopatológicas e citotóxicas no intestino médio das larvas de *Aedes aegypti*, incluindo vacuolização citoplasmática e danos à borda em escova das células digestivas promovidas pelo piriproxifeno (FIAZ *et al.*, 2019). Esses resultados nos levam a sugerir que as larvas de mosquitos *Ae. aegypti* tenham ingerido o conteúdo oleoso, do crambe e do ácido erúico por filtragem de partículas suspensas na água, pois elas utilizam estruturas bucais especializadas para criar correntes de água, onde ingerem partículas alimentares, como micro-organismos, detritos orgânicos e outros materiais em suspensão (SOUZA, *et al.*, 2019) e pode ocorrer ao tentar se ajustar a obstrução do sifão na extremidade posterior para respirar, enquanto flutuam na superfície da água (LEE, *et al.*, 2018).

Outro fator importante observado em larvas tratadas com ácido erúico foi a extrusão do conteúdo do intestino a partir da matriz peritrófica. Estudos sugerem que a extrusão da matriz peritrófica em *Aedes aegypti* é um processo induzido pela alimentação sanguínea, essencial para a formação e função da matriz, e que pode ser afetado por fatores como a presença de enzimas específicas, regulação genética e substâncias externas que sugere um mecanismo de defesa onde larvas eliminam todo o alimento contaminado (ALVES *et al.* 2010; BOTAS *et al.* 2017). De fato, esse tipo de reação a agentes tóxicos é uma evidência expressiva relacionada à queda na sobrevivência.

Efeitos deletérios na cutícula, no metabolismo lipídico e nas enzimas digestivas foram descritos por Alves e colaboradores (2010). Estes pesquisadores observaram alterações no corpo gorduroso e no intestino médio de larvas de *Culex quinquefasciatus* após exposição a diferentes inseticidas. Segundo o autor, essas larvas expostas a inseticida também exibiram diferenças nos grânulos do citoplasma, em relação às larvas controle, com redução no tamanho das microvilosidades no ápice das células digestivas, e vesículas foram encontradas. Esses dados sugerem que alterações no corpo gorduroso e no intestino médio são uma resposta comum à intoxicação celular.

Dessa forma, podemos reforçar que o ácido erúico pode interferir em múltiplas vias biológicas que precisam ser investigadas. Dessa forma, devemos considerar fatores como a composição do óleo de crambe, com presença do

ácido erúico e outros compostos; exercendo assim, um evento multifatorial afetando tecido intestinal, cutícula, AChE e culminando com o evento morte.

As micropartículas são partículas sólidas e esféricas com dimensões que variam de 1 a 1000 micrômetros (ARSHADY, 1991). As micropartículas se dividem em duas categorias, microcápsulas, que são sistemas reservatório onde a substância ativa é envolvida por uma membrana capsular composta de polímeros com espessuras variáveis e microesferas, que são sistemas matriciais nos quais o fármaco está uniformemente disperso e/ou dissolvido em uma rede polimérica. (KAS, 2020; ONER, 2000).

A tecnologia da microencapsulação tem sido utilizada em diversas indústrias, como na agrícola, alimentar, de produtos domésticos, médica, gráfica e cosmética. (SILVA *et al*, 2003). São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (BATYCKY *et al.*, 1997).

De acordo com o seu tamanho, as cápsulas são classificadas como nanopartículas ou micropartículas, variando de 0,01 a 0,2 μm e de 1 a 100 μm (MARTIM, 2015). Acima de 100 μm elas são denominadas de micropartículas (SANTOS *et al.*, 2000).

As micropartículas encontram aplicações também no setor de agrotóxicos. Os sistemas de liberação controlada de pesticidas de baixa massa molar foram utilizados pela primeira vez na agroindústria na década de 50. Já nos anos 70, novas formulações capazes de liberar pesticidas de alta massa molar foram desenvolvidas. Nos últimos anos, o empenho em desenvolver novos sistemas de liberação de pesticidas vem crescendo, em virtude do alto grau de toxicidade dos defensivos agrícolas e seu uso excessivo (MOGUL *et al.*, 1996).

O encapsulamento é definido como uma técnica capaz de revestir ou empacotar substâncias sólidas, líquidas ou gasosas, através de um revestimento polimérico, as quais seu conteúdo é liberado de forma controlada e sob condições específicas. Esses são geralmente biocompatíveis, biodegradáveis e oriundos de matérias primas naturais (DE OLIVEIRA MELO, 2021). Microesferas são um exemplo de tais sistemas uma vez que podem ser usadas para a

liberação prolongada de vários princípios ativos empregados nas áreas farmacêutica, médica e na agricultura (SILVA, 2003).

A interação iônica pode recorrer-se a uma técnica de emulsificação para obter micropartículas de alginato de cálcio, segundo a qual uma solução aquosa de alginato de sódio é dispersa numa fase imiscível e as gotas de gel formadas reagem com íons de cálcio, que são adicionados à fase externa, formando-se microesferas (SILVA, 2003).

O alginato (ALG) é um biopolímero aniônico composto de cadeias lineares de ácido α -L-glucurônico e β -D-mannurônico, as quais em presença de íons tais como Ca^{++} formam hidrogéis, filmes, esferas, micro- e nanopartículas, com capacidade para encapsulamento de uma série de substâncias tais como dextrorubina, insulina, antifúngicos, etc (SARMENTO, 2007). Entre as metodologias de microencapsulação, a técnica de gelificação iônica é considerada um método simples, barato e rápido, na qual ocorre a interação entre um polímero aniônico com íons de cálcio, em condições brandas de temperatura utilizando polissacarídeos com baixa ou nenhuma toxicidade, com objetivo de formar hidrogéis (RÉ; SANTANA; ÁVILA, 2010).

A técnica de gelificação iônica pode ser realizada por dois métodos: gelificação interna (emulsão) e externa, também conhecida como difusão. No primeiro método, a ionização do agente de reticulação, normalmente um sal de cálcio, ocorre mediante a redução do pH e a complexação deste com os grupamentos ácido carboxílicos dos ácidos orgânicos em um meio contendo uma emulsão óleo-água, permitindo a formação das partículas de gel e, conseqüentemente, a retenção do material de núcleo (COOK *et al.*, 2013; ARDEKANI, 2015). O alginato de cálcio (CaAlg) tem sido considerado um dos biopolímeros mais adequados para a produção de esferas, devido à sua composição, estrutura sequencial (tem uma grande importância para a sua função como material de encapsulamento, já que depende geralmente de espessamento, de formação de gel e de estabilização) (ROY *et al.*, 2005 *apud* MELO, 2021).

Como foi descrito, a versatilidade da técnica permite que esta seja aplicada no encapsulamento de diversos compostos, para a liberação de inseticidas (INOUE, 1997), como pigmentos naturais (DE MOURA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019 *apud* MELO, 2021), antioxidantes naturais (DELADINO

et al., 2008; CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013 *apud* MELO, 2021), fármacos (SILVA et al., 2006; SILVA; FIDELIS; FOOK, 2014 *apud* MELO, 2021), microrganismos prebióticos (ETCHEPARE et al., 2016; HOLKEM et al., 2017; RADDATZ et al., 2020 *apud* MELO, 2021), antimicrobianos (MARTÍN-VILLENA et al., 2013; MARTÍN et al., 2015), entre outros agentes com propriedades ativas benéficas.

Contudo, visando melhorar a persistência e aplicação do óleo de crambe, foi proposto o encapsulamento do óleo. Os bioensaios com cápsula de óleo de crambe mostraram que o encapsulamento reduz a sobrevivência em 60% no tempo de 96h, já o óleo puro essa redução é de 93% em 72h. Isso sugere uma liberação controlada dos componentes ativos, incluindo o ácido erúcico, afetando de forma gradativa as larvas.

Essa técnica de gelificação iônica com cápsulas de alginato reticuladas com cálcio (ALG/Ca) já foi descrita em diversos fármacos (PASQUALIM, 2011) e é largamente usado com óleo essencial para uso como larvicida, por exemplo, o *Croton zehntneri* Pax et Hoffm (CZ) utilizado em larvas do mosquito *Aedes aegypti* em teores de 1,81 a 4,25mg de óleo levaram na faixa de 72 a 100% de mortalidade de larvas após 24h (DE PAULA, 2010). Os estudos sugerem que o encapsulamento de óleos essenciais em diferentes matrizes (como fermento, nanoemulsões, microcápsulas e nanocápsulas) é eficaz como larvicida de mosquitos, proporcionando uma liberação controlada e prolongada, além de melhorar a estabilidade e a bioatividade desses óleos.

O encapsulamento de óleos tem como vantagem controlar a liberação dos compostos, resultando em ação prolongada e sustentada no controle de pragas sendo útil na agronomia, apresentando-se como uma alternativa viável aos pesticidas sintéticos. Isso traz benefícios ambientais significativos, como a redução do uso de produtos químicos sintéticos e a minimização do impacto ecológico (MAES et al., 2019). No encapsulamento do óleo da semente de *Pongamia pinnata* em cascas de *poliureia* demonstrou controle eficaz das populações de pulgões e moscas-brancas na berinjela, tornando-se uma alternativa potencial aos inseticidas sintéticos (PURKAIT et al., 2021).

CONCLUSÃO

A eficácia do óleo de crambe e do ácido erúcico, como agente larvicida contra *Aedes aegypti* é relevante e inédito. Os resultados demonstraram que o óleo puro tem efeito mais imediato do que o óleo encapsulado, porém esse é um efeito esperado em compostos ativos encapsulados, onde a atividade do composto pode ser prolongada, devido a lenta dispersão. Sendo um larvicida potencialmente significativo para o desenvolvimento de novos bioinseticidas.

As análises morfológica e histopatológica revelaram efeitos significativos no intestino médio das larvas, essas descobertas são consistentes com a literatura existente, reforçando o papel do ácido erúcico em interferir em múltiplas vias biológicas nos insetos, especialmente na inibição da acetilcolinesterase.

Aqui destacamos a importância do uso de óleos vegetais, como o de crambe, no controle do vetor de doenças como dengue, Zika, chikungunya, dando uma alternativa aos inseticidas sintéticos. Colaborando com as tendências mundiais de redução do uso de produtos químicos sintéticos, contribuindo significativamente para a área da biociência e biotecnologia, na bioprospecção de compostos naturais no manejo de pragas. A inovação apresentada no encapsulamento do óleo de crambe abre caminhos para futuras aplicações em agronomia e saúde pública.

Como perspectivas futuras para o óleo de crambe encapsulado podemos sugerir depósito de patente visando a proteção intelectual e comercialização deste bioinseticida inovador, dada a eficácia demonstrada neste trabalho. As cápsulas podem ser caracterizadas e sua aplicação no campo, avaliadas, com foco na estabilidade e liberação controladas sendo importante para a implementação prática desta tecnologia. Além disso, é válido a exploração de combinações do óleo de crambe com outros compostos naturais para avaliar efeitos sinérgicos; investigar o impacto do óleo de crambe em diferentes estágios de desenvolvimento de mosquitos e testá-lo em outros vetores. Além de avaliar sua biodisponibilidade no ambiente e ação em organismo não-alvos.

O trabalho apresentado não só avança o conhecimento no uso de óleos vegetais como agentes larvicidas, mas também estabelece uma base sólida para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas.

6 REFERÊNCIAS

- ALI, S. (2023). Estudo laboratorial para o efeito do óleo de nim (*Azadirachta indica*) contra larvas de mosquito (*Culiseta longiareolata*) na província de Wasit/Iraque. *Journal of Wasit for Science and Medicine*. <https://doi.org/10.31185/jwsm.462>.
- ALVES, Stênio Nunes; SERRÃO, José Eduardo; MELO, Alan Lane. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. *Micron*, v. 41, n. 6, p. 592-597, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.04.004>.
- ARAUJO, J. S.; CARVALHO, L. P.; MELO, E. J. T.; MACHADO, O. L. T. 2S albumin from crambe (*Crambe abyssinica*) against *Trypanosoma cruzi*, 2023.
- ARRUDA W, OLIVEIRA GMC, SILVA IG. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *A. aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop*;36(1):17-25.2003.
- ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules. Part 2. Polyactides and related polyesters. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v. 17, p. 1-21, 1991.
- ATABANI, A. E., SILITONGA, A. S., ONG, HOCHST C., MAHLIA, T. M. I., MASJUKI, HOCHST HOCHST, BADRUDDIN, I. A., & FAYAZ, HOCHST Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, 211-245. 2013.
- BATYCKY R P, Hanes J, Langer R E, Edwards D A (1997). A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *Journal of Pharmaceutical Science* 86:1.464-1.477.
- BECKER N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 383-98.
- BERTONCELI, M. A. A. et al. Rotenoids from *Clitoria Fairchildiana* R.A. Howard Seeds (Fabaceae) Affect the Cellular Metabolism of Larvae of *Aedes Aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 186, n. July, p. 105167, 2022.
- BESERRA, E.B., Eraldo M. de Freitas, José T. de Souza, Carlos R. M. Fernandes & Keliana D. Santos. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre, 99(3):281-285, 30 de setembro de 2009.
- BESERRA, E.B., FERNANDES, C.R.M., QUEIROGA, M.F.C., CASTRO JR, F.P. Resistência de Populações de *A. aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao

organofosforado temefós na Paraíba. *Neotropical Entomology*, 36(2): 303-307. 2007.

BHATT, S., Gething, P., Brady, O. *et al.* A distribuição global e a carga da dengue. *Natureza* 496 , 504–507 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12060>.

BISPO, A. S., Delfino, L. D., Costa, B. J., Suchek, E. M., Adão, D. C., Fonseca, F. C., ... & Vechiatto, W. W. D. (2010). Caracterização de óleos vegetais extraídos mecanicamente sob condições variadas, visando a produção de biodiesel. In *4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel; 7º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel*.

BITENCOURT, R. D. O. B., de Souza Faria, F., Marchesini, P., dos Santos-Mallet, J. R., Camargo, M. G., Bittencourt, V. R. E. P., ... & da Costa Angelo, I. (2022). Entomopathogenic fungi and Schinus molle essential oil: The combination of two eco-friendly agents against Aedes aegypti larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 194, 107827.

BOROVSKY, D.; MAHMOOD, F. Feeding the mosquito Aedes aegypti with TMOF and its analogs: effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regulatory Peptides*, v. 57, p. 273-281, 1995.

BORTOLUCCI, W., Oliveira, H., Silva, E., De Araújo Almeida Campo, C., Gonçalves, J., P., R., Colauto, N., Linde, G., & Gazim, Z. (2019). Óleo essencial e frações de Schinus terebinthifolius no controle do Aedes aegypti. *Revista de Biociências* . <https://doi.org/10.14393/bj-v35n5a2019-41999>.

BOTAS, G.; CRUZ, R.; ALMEIDA, F.; DUARTE, J.; ARAÚJO, R.; SOUTO, R.; FERNANDES, C. Baccharis reticularia DC. and limonene nanoemulsions: promising larvicidal agents for Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) control. *Molecules*, v. 22, p. 1990, 2017.

BRACCO, J.E., DALBON, M., MARINOTTI, O., BARATA, J.M.S. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. *Revista Saúde Pública*, 31(2): 182-183. 1997.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. A sociedade contra a dengue: série B. textos básicos em saúde. DF. 2011. Disponível em:<
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sociedade_contra_dengue.pdf >
acesso em 11 de dezembro 2024.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. DF 2009. Disponível em:<
[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_o_controle_dengue.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf)> acesso em 11 de dezembro de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia plano de ação para redução da dengue e outras arboviroses. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: www.gov.br. Acesso em: 10 de Março de 2025.

BROGDON, W.G.; MCALIISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p. 605-613, 1998.

CARLSSON, A. S. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum—A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie*, 91(6), 665-670. 2009.

CASTILLO-MORALES, Ruth Mariela et al. Impact of *Cymbopogon flexuosus* (Poaceae) essential oil and primary components on the eclosion and larval development of *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 24291, 2021.

CHAVASSE, D. C., Yap, H. H., & World Health Organization. (1997). *Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance* (No. WHO/CTD/WHOPES/97.2). World Health Organization.

CHEN, C. D.; SELEENA, B.; CHIANG, Y. F.; LEE, H. L. Field evaluation of the bioefficacy of diflubenzuron (Dimilin®) against container-breeding *Aedes* sp. mosquitoes. *Trop Biomed*, v. 25, p. 80-86, 2008.

CHEREMISINOFF, N., & King, J. (2020). Inseticidas organofosforados. *Propriedades tóxicas de pesticidas*. <https://doi.org/10.1201/9781003067290-7>.

CICILIANO, L. G.; SANTOS, L. K. dos; LAVIOLA, B. G.; FAVARO, S. P. ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 7., 2023, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2023. p. 72-76. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1158076>.

COLODETTI, T. V., Martins, L., Rodrigues, W., Brinate, S. V., & Tomaz, M. A. (2012). Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. *Enciclopédia biosfera*, 8(14).

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, v. 11, n. 3, p. 315-35, 2013. doi: 10.2174/1570159X11311030006.

CONSOLI, R. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994.

CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228p.

COOK, Michael T. et al. Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan–alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic

bacteria after oral administration. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, n. 1, p. 52-60, 2013.

CORBEL, V.; STANKIEWICZ, M.; PENNETIER, C.; FOURNIER, D.; STOJAN, J.; GIRARD, E.; DIMITROV, M.; MOLGO, J.; HOUGARD, J. M.; LAPIED, B. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent DEET. *BMC Biol.*, v. 7, p. 47, 2009.

DA SILVA, Thayná Rhayssa Batista; DA COSTA, Polyana Felype Ferreira; DOS SANTOS, Solange Laurentino. Perigos no uso de agrotóxicos pela saúde pública no controle vetorial do *Aedes aegypti*. *Revista Movimentos Sociais e Dinâmicas Espaciais*, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2020.

DAHLKE, C. F., & Simonetti, A. P. M. (2010). Interferência de diferentes temperaturas na germinação do crame. *Revista Cultivando o Saber*, 3(4), 167-174.

DE GÓES CAVALCANTI, L. P.; ALMEIDA BARRETO, F. K. de; ALVES BARBOSA OLIVEIRA, R. de M.; PONTES CANUTO, I. F.; BEZERRA LIMA, A. A.; LIMA, J. W. O., et al. Trinta anos de dengue no Ceará: história, contribuições para ciência e desafios no cenário atual com tripla circulação de arbovírus. *J Health Biol Sci.*, v. 6, n. 1, p. 65-82, 2017. Disponível em: <https://unichristus.emnuvens.com.br/jhbs/article/view/1415>.

DE OLIVEIRA MELO, Filipe; CONSTANT, Patrícia Beltrão Lessa. Microencapsulação por gelificação iônica: Uma prospecção tecnológica com base no INPI. *Cadernos de Prospecção*, v. 14, n. 4, p. 1236-1247, 2021.

DE OLIVEIRA, S., Da Cruz, R., Rolim, L., Cavalcanti, J., De Souza, I., Da Silva, R., De Holanda, K., & Neto, P. (2024). Emulsão do óleo da semente de *Euterpe oleracea* (açai): estudo de atividade e segurança contra *Aedes aegypti*. *Cadernos de Educação e Desenvolvimento*. <https://doi.org/10.55905/cuadv16n2-009>.

DE PAULA, Haroldo CB et al. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri pax et hoffm. *Polímeros*, v. 20, p. 112-120, 2010.

DE SOUZA, M., Da Silva, L., Santos, M., Macêdo, M., Lacerda-Neto, L., Coutinho, H., De Oliveira, L., & Cunha, F. (2020). Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Desenho farmacêutico atual*. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200806100500>.

DELMAR, E. G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J. W.; GEOKAS, M. C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, v. 99, p. 316-320, 1979. DINIZ, M. M. C. S. L., et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. *Rev. Saúde Pública*, v. 48, n. 5, p. 775-782, 2014.

DUSFOUR, I., Zorrilla, P., Guidez, A., Issaly, J., Girod, R., Guillaumot, L., ... & Strode, C. (2015). Deltamethrin resistance mechanisms in *Aedes aegypti* populations from three French overseas territories worldwide. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004226.

ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 95, p. 271-278, 1961.

FAN, Y.; SCOTT, J. G. The F1534C voltage-sensitive sodium channel mutation confers 7- to 16-fold resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, v. 76, n. 6, p. 2251–2259, 2020.

FALASCA, S. L., Flores, N., Lamas, M. D. C., Carballo, S. M., & Anschau, A. (2010). Crambe abyssinica: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11), 5808-5812.

FERREIRA, A. B. *HOCHST Novo Dicionário da Língua Portuguesa*. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p.1314, 1986.

FERREIRA, M. D. L., Fernandes, D. A., Nunes, F. C., Teles, Y. C., Rolim, Y. M., Silva, C. M. D., ... & Souza, M. D. F. D. (2019). Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(5), 582-590.

FIAZ, M., et al. O piriproxifeno, um análogo do hormônio juvenil, danifica as células do intestino médio e interfere no comportamento das larvas do *Aedes aegypti*. *PeerJ*, v. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7717/peerj.7489>.

FIOCRUZ. 10 minutos contra a Dengue. <<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html> >Acesso em 11 de dezembro de 2024.

FIOCRUZ. Introdução aos aspectos científicos do vetor *Aedes aegypti*. 2019.

FORATTINI, O. P. *Culicidologia médica*, vol. 2. São Paulo: EDUSP, 2002.

FRANÇA, S. B., et al. Larvicidal activity and in silico studies of cinnamic acid derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116299>.

FREITAS, D. A., et al. Síndrome congênita do zika: uma revisão sistemática. *PLoS UM*, v. 15, n. 12, e0242367, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>.

FUKUTO, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental health perspectives*, 87, 245-254.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. FUNASA. Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 84p. 2001.

GANESAN, P.; STALIN, A.; PAULRAJ, M. G.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Biocontrol and non-target effect of fractions and compound isolated from *Streptomyces rimosus* on the immature stages of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and the compound interaction with Acetylcholinesterase (AChE1). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 161, p. 120-128, 2018.

GENTA, F., Bragatto, I., Terra, W., & Ferreira, C. (2009). Purificação, caracterização e sequenciamento da principal beta-1,3-glucanase do intestino médio de larvas de *Tenebrio molitor*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39 12, 861-74 . <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.003>.

GEORGHIOU, G. P., & Mellon, R. B. (1983). Pesticide resistance in time and space. In *Pest resistance to pesticides* (pp. 1-46). Boston, MA: Springer US.

GEORGHIOU, George P.; LAGUNES-TEJEDA, Angel. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. 1991.

GIULIANO, G., Campolo, O., Forte, G., Urbaneja, A., Pérez-Hedo, M., Latella, I., Palmeri, V., & Giunti, G. (2024). Atividade inseticida da nanoemulsão à base de óleo essencial de *Allium sativum* contra *Spodoptera littoralis*. *Insetos*, 15. <https://doi.org/10.3390/insects15070476>.

GLATFELTER, G., Jones, A., Rajnarayanan, R., & Dubocovich, M. (2020). Ações farmacológicas de inseticidas carbamato em receptores de melatonina de mamíferos. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 376, 306 - 321. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000065>.

GOMES, A. C., et al. Potencial larvicida de extratos e compostos isolados de frutos de *Piper cubeba* contra larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pesquisa de Produtos Naturais*, v. 37, n. 16, p. 2787-2794, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2131784>.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health*, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S3–S11, 2011.

GUARDS, R & COLLINS, FHOCHST Anopheline mosquitoes and the they transmit. In: BEARY, BJ & MARQUARDT, WC (eds). *The Biology of Disease Vectors*. Niwot: University Press of Colorado, p. 73-84, 1996.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. *Pharmaceutics Development Technology*, v. 8, p. 253, 2003.

HEMINGWAY J, RANSON HOCHST *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. *Annual Review Entomology*. 45:371-391. 2000.

HEMINGWAY, J., HAWKES, N.J., MCCARROLL, L., RANSON, *HOCHST* The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 653-665. 2004.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009-1015. 2000.

HILL CA, Doyle T, Nuss AB, Ejendal KF, Meyer JM, Watts VJ. Comparative pharmacological characterization of D1-like dopamine receptors from *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* suggests pleiotropic signaling in mosquito vector lineages. *Parasit Vectors*. 2016 Apr 6;9:192. doi: 10.1186/s13071-016-1477-6. PMID: 27048546; PMCID: PMC4822259.

HOLLAND, R., & Crossthwaite, A. (2024). Alquilsulfonas: novos andaimes químicos direcionados ao transportador vesicular de acetilcolina inauguram uma nova geração de inseticidas. *Ciência do manejo de pragas* . <https://doi.org/10.1002/ps.8462>.

HUANG, Y., Lin, M., Jia, M., Hu, J., & Zhu, L. (2019). Composição química e atividade larvicida contra mosquitos *Aedes* de óleos essenciais de *Arisaema fargesii*. *Ciência do manejo de pragas* . <https://doi.org/10.1002/ps.5542> .

HUSSAIN A, AlJabr AM, Al-Ayedh H. Development-Disrupting Chitin Synthesis Inhibitor, Novaluron, Reprogramming the Chitin Degradation Mechanism of Red Palm Weevils. *Molecules*. 2019 Nov 26;24(23):4304. doi: 10.3390/molecules24234304. PMID: 31779078; PMCID: PMC6930496.

INOUE, M.; ONTSUBO, T.; IMAI, M. *Proceedings International Symposium Controlled Release Bioactive Materials*, v. 24, p. 733-734, 1997.

JAMAL, A., & Mondal, S. (2024). Atividades larvicidas de vários óleos essenciais extraídos de plantas contra larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Insecta: Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. Disponível em: <https://doi.org/10.22271/j.ento.2024.v12.i5a.9376>.

JIANG, X., Zhong, F., Chen, Y., Shi, D., Chao, L., Yu, L., He, B., Xu, C., Wu, Y., Tang, B., Duan, H., & Wang, S. (2023). Novos compostos ZK-PI-5 e ZK-PI-9 regulam a reprodução de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), com potencial inseticida. *Journal of Economic Entomology*, 116, 1850 - 1861. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/toad140>.

KASAI, S. et al. Discovery of super-insecticide-resistant dengue mosquitoes in Asia: Threats of concomitant knockdown resistance mutations. *SCIENCE ADVANCES*, v. 8, n. from 2000, p. 2022.03.05.483084, 2022.

KAS, H. S.; ONER, L. Microencapsulation using coacervation/phase separation: an overview of the technique and applications. In: WISE, D. L., ed. *Handbook of*

Pharmaceutical controlled release technology. New York: Marcel-Dekker, 2000. p. 301-328.

KHAN, S., Uddin, M., Rizwan, M., Khan, W., Farooq, M., Shah, A., Subhan, F., Aziz, F., Rahman, K., Khan, A., Ali, S., & Muhammad, M. (2020). Mecanismo de resistência a inseticidas em insetos/pragas. *Revista polonesa de estudos ambientais*, 29, 2023-2030. Disponível em: <https://doi.org/10.15244/pjoes/108513>.

KIM, J. C., et al. Preparation of microspheres by an emulsification-complexation method. *J. Colloid Interface Sci.*, Amsterdam, v. 248, p. 1-4, 2002.

KLOWDEN, M. J. *Physiological Systems in Insects*. San Diego: Elsevier Academic Press, 3rd edition, 2013.

LAZZERI, L., et al. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. *Industrial Crops and Products*, v. 3, n. 1-2, p. 103-112, 1994.

LEE, G., & Choi, K. (2020). Efeitos adversos de pesticidas nas funções do sistema imunológico. *Bioquímica e fisiologia comparativas. Toxicologia e farmacologia: CBP*, 108789. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108789>.

LEE, S. J., et al. Efeitos da camada de película de óleo e surfactante na respiração sifonal e sobrevivência em larvas de quarto instar do mosquito *Aedes togoi* em condições de laboratório. *Sci Rep*, v. 8, p. 5694, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23980-5>.

LELIS, R. T. Efeitos de extratos de plantas da mata atlântica em *A. aegypti* (Diptera: Culicidae). Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2012.

LI, Y., Hou, M., Shen, G., Lu, X., Wang, Z., Jia, F., Wang, J., & Dou, W. (2017). Análise funcional de cinco genes de protease semelhantes à tripsina na mosca-das-frutas oriental, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Bioquímica e fisiologia de pesticidas*, 136, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.08.004>.

LIM, L. Y.; WAN, L. S.; THAI, P. Y. Chitosan microspheres prepared by emulsification and ionotropic gelation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York, v. 23, p. 981-985, 1997.

MACHADO, Mariana Fonseca et al. Estudo do crambe (*Crambe abyssinica*) como fonte de óleo para produção de biodiesel. Itaúna/MG–UFMG, 2007.

MAES, C.; Bouquillon, S.; Fauconnier, M. L. Encapsulamento de óleos essenciais para o desenvolvimento de pesticidas de origem biológica com liberação controlada: uma revisão. *Moléculas*, v. 24, n. 14, p. 2539, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24142539>.

MARQUES, Márcia MM et al. Larvicidal activity of *Tagetes erecta* against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 27, n. 2, p. 156-158, 2011.

MARTELLI, F., Hernandez, N., Zuo, Z., Wang, J., Wong, C., Karagas, N., Roessner, U., Rupasinghe, T., Robin, C., Venkatachalam, K., Perry, T., Batterham, P., & Bellen, H. (2022). Baixas doses do inseticida orgânico spinosad desencadeiam defeitos lisossômicos, ROS elevados, desregulação lipídica e neurodegeneração em moscas. *eLife* , 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.73812>.

MARTINS, J., Batail, N., Silva, S., Rafik-Clément, S., Karelovic, A., Debecker, D. P., ... & Uzio, D. (2015). CO₂ hydrogenation with shape-controlled Pd nanoparticles embedded in mesoporous silica: Elucidating stability and selectivity issues. *Catalysis Communications*, 58, 11-15.

MARTÍN-VILLENA, M. J. et al. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydrate polymers*, v. 94, n. 1, p. 1-11, 2013.

MASCARENHAS, M., Garasia, S., Berthiaume, P., Corrin, T., Greig, J., Ng, V., ... & Waddell, L. (2018). A scoping review of published literature on chikungunya virus. *PloS one*, 13(11), e0207554.

MATTOS, C., et al. Acaricidal Properties of Bio-Oil Derived From Slow Pyrolysis of *Crambe abyssinica* Fruit Against the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Frontiers in Physiology*, v. 12, 768522, 2021. doi: 10.3389/fphys.2021.768522.

MENDONÇA, F. de A., et al. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. *Sociedade & Natureza*, v. 21, n. 3, p. 257-269, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1982-45132009000300003>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. <https://www.gov.br/saude/pt-br/campanhas-da-saude/2021/combateao-mosquito-aedes>. Acessado em 02 de dezembro de 2024.

MOGUL, M. G., et al. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 16, p. 289-320, 1996.

MONTELLA, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., Braga, I. A., & Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), 467-477.

MOREIRA, HOCHSTJ. DA C.; BRAGANÇA, HOCHSTB.N. Manual de identificação de plantas infestantes - cultivos de verão. Campinas-SP. 642 pp. 2010.

MULLER, A. Armazenamento e germinação de sementes de Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst, Brassicaceae), CAMPO GRANDE, Anais. CAMPO GRANDE, 2008, UCDB.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary para CID 5281116, Erucic Acid. Recuperado em 25 de novembro de 2024 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erucic-Acid>.

NDIONE RD, FAYE O, NDIAYE M, DIEYE A, AFOUTOU JM. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* Juss) on *A. aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *Afr J Biotechnol*. 2007;6(24):2846-54.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 13ª Edição. Editora ATHENEU, 2016.

NGOAGOUNI, C., Kamgang, B., Brengues, C. *et al.* Perfil de suscetibilidade e mecanismos metabólicos envolvidos em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* resistentes a DDT e deltametrina na República Centro-Africana. *Parasites Vectors* 9 , 599 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1887-5>.

OLIVEIRA, F., et al. Distúrbios histológicos, histoquímicos e energéticos causados pelo R-limoneno em larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Acta tropica*, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105987>.

OPLINGER, E. S. ET AL. Crambe: alternative field crops manual. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/crambe.html>>. Acesso em: 16 nov. 2018 overseas territories worldwide. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(11).1991.

OPLINGER, E.S.; OELKE, E.A.; KAMINSKI, A. R.; PUTNAM, D. *HOCHST*; TEYNOR, T. M.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. Crambe: alternative field crops manual. St. Paul: University of Wisconsin and University of Minnesota, 2000. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/crambe.html>>. Acesso em: 11 de dezembro de 2024.

OSANAI, C. H., Travassos da Rosa, A. P. A., Tang, A. T., Amaral, R. D., Passos, A. D. C., & Tauil, P. L. (1983). Outbreak of dengue in Boa Vista, Roraima. Preliminary report.

OSBORNE, R. H. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.*, v. 69, p. 117-142, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02054-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02054-3).

PAHO - Pan American Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. (Cient. Pub. n. 548), 98 pp., 1994.

PANNO, G.; PRIOR, M. Avaliação de substratos para a germinação de Crambe abyssinica. *Cultivando o saber*, v. 2, n. 2, p. 151-157, 2009.

PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. *Brazil-Médico*, v.1, n.13, p.173-7, 1923.

Peterson, C., et al. Componentes inseticidas na refeição de Crambe abyssinica. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, v. 17, p. 27-36, 2000.

PETERSON, C., et al. Componentes inseticidas na refeição de Crambe abyssinica. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, v. 17, p. 27-36, 2000.

PITOL, C.; Cultura do Crambe. Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno – 2008. Disponível em: <www.fundacaoms.org.br>acesso em 23 de abril de 2017.

POZEBON, H.; Arnemann, J. A. Como funcionam os inseticidas carbamatos e organofosforados. Disponível online, 2020.

PRINA, A. (2000). A taxonomic revision of Crambe, sect. Leptocrambe (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133(4), 509-524.

PURKAIT, A., et al. Encapsulamento, liberação e atividade inseticida do óleo de semente de Pongamia pinnata (L.). *Heliyon*, v. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06557>.

RAHMAN, A., Khan, I., Usman, A., & Khan, H. (2023). Evaluation of Insect Growth Regulators (IGRs) as biological pesticides for control of Aedes aegypti mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases*, 61, 129 - 135. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0972-9062.392257>.

RAHUMAN, A. A., et al. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from Citrullus colocynthis (Linn.) Schrad. *Parasitology research*, v. 103, p. 1383-1390, 2008.

RAULT, L. C., O'Neal, S. T., Johnson, E. J., & Anderson, T. D. (2019). Association of age, sex, and pyrethroid resistance status on survival and cytochrome P450 gene expression in Aedes aegypti (L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 156, 96-104.

RÊ, M. I. Microencapsulação em busca de produtos 'inteligentes'. *Ciência Hoje – Revista de divulgação científica da sociedade brasileira para o progresso a ciência*, São Paulo, v. 27, n. 162, p. 24-29, jul. 2000.

RÉ, M. I.; SANTANA, M. H. A.; ÁVILA, M. A. Encapsulation Technologies for Modifying Food Performance. In: Taylor and Francis Group, LLC: 2010, p. 223-275.

REZENDE, G. L. et al. Embryonic desiccation resistance in *A. aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Developmental Biology*, v. 8, n. 1, p. 82, 2008.

Richardson, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: *Methods in Plant Biochemistry*. (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds). Vol. 5 Academic Press, New York, 1991.

ROCHA, I. U., et al. Exploiting the combination of entomopathogenic fungi and Illicium verum essential oil against Aedes aegypti larvae. *Biological Control*, v. 193, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107827>.

ROSLAN, M. A., Ngui, R., Abd Karim, M. A. A., Rosmini, U. S., Ong, P. S., Ahmad, M. A., ... & Wan Sulaiman, W. Y. (2024). A study on Wolbachia-dengue-carrying Aedes mosquitoes (diptera: culicidae) focuses on the sustainability and frequency of Wolbachia in high-rise buildings in Selangor, Malaysia. *Applied Entomology and Zoology*, 1-12.

Roteiro de produtos químico: manual prático [Chemicals road map: workbook]. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2021. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ROMANELLO, Marina; WALAWENDER, Maria; HSU, Shih-Che; MOSKELAND, Annalyse; PALMEIRO-SILVA, Yasna; SCAMMAN, Daniel et al. Relatório de 2024 da Lancet Countdown sobre saúde e alterações climáticas: enfrentando ameaças recorde devido a ações tardias. 2024. Disponível em: <<https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2824%2901822-1>>. Acesso em: 13 mar. 2025.

SANTOS, A. B., Ferreira, V. P., Grosso, C. R. F. (2000). Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 3, 26-30.

SANTOS, L., Nascimento, J., Santos, M., Marriel, N., Bezerra-Silva, P., Rocha, S., Silva, A., Correia, M., Paiva, P., Martins, G. ., Navarro, D., Silva, M., & Napoleão, T. (2017).

O óleo volátil rico em ácidos graxos das sementes de Syagrus coronata possui atividades larvicidas e dissuasoras de oviposição contra o Aedes aegypti. *Patologia Fisiológica e Molecular de Plantas*, 100, 35-40. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2017.05.008>.

SANTOS, V. M. R. D., Donnici, C. L., DaCosta, J. B. N., & Caixeiro, J. M. R. (2007). Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, 30, 159-170.

SARMENTO-LEITE, Rogério. Uma nova geração de stents farmacológicos. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, v. 15, p. 217-218, 2007.

SARQUIS, Í., et al. Carapa guianensis Aubl. (Meliaceae) óleo associado à fibroína da seda, como alternativa aos surfactantes tradicionais, e ativo contra larvas do vetor Aedes aegypti. *Culturas e Produtos Industriais*, v. 157, p. 112931, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112931>.

SENTHIL-NATHAN, S. (2020). Uma revisão dos mecanismos de resistência de inseticidas sintéticos e botânicos, fitoquímicos e óleos essenciais como agentes

larvicidas alternativos contra mosquitos. *Frontiers in Physiology*, 10. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01591>.

SEO, S., JUNG, C., KANG, J., LEE, H., KIM, S., HYUN, J., & PARK, I. (2015). Atividades inibitórias larvicidas e de acetilcolinesterase de óleos essenciais de plantas apiaceae e seus constituintes contra *aedes albopictus* e desenvolvimento de formulação. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 45, 9977-86. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03586>.

SEO, S., PARK, H., & PARK, I. (2012). Atividade larvicida dos óleos de ajowan (*Trachyspermum ammi*) e bálsamo do Peru (*Myroxylon pereira*) e misturas de seus constituintes contra mosquitos, *Aedes aegypti*, toxicidade aguda em pulgas d'água, *Daphnia magna*, e resíduos aquosos. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 23, 5909-14. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf301296d>.

SIERRA, I., Latorre-Estivalis, J., Traverso, L., Gonzalez, P., Aptekmann, A., Nadra, A., Masuh, H., & Ons, S. (2021). Análise transcriptômica e docking molecular revelam genes envolvidos na resposta de larvas de *Aedes aegypti* a um óleo essencial extraído de eucalipto. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009587>.

SILVA, C. E., et al. Avaliação de ácidos graxos da soja: grão inteiro, casca, cotilédones e hipocótilo. Londrina: Embrapa Soja, 2009. (Documentos / Embrapa Soja, 323).

SILVA, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., & Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, 1-20.

SILVA, Leilane M. M. S., et al. Fatty acid-rich volatile oil from *Syagrus coronata* seeds has larvicidal and oviposition-deterrent activities against *Aedes aegypti*. *Journal of Ethnopharmacology*, Elsevier BV, 2017. Disponível em: www.sciencedirect.com.

SILVA, R. G. G., et al. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. *Industrial Crops and Products*, v. 70, p. 48-55, 2015.

SILVA, V., et al. Histologia e ultraestrutura do intestino médio larval de *Aedes albopictus* infectado com *Bacillus thuringiensis* var. israelense. *Pesquisa e técnica de microscopia*, v. 71, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jemt.20605>.

SIMAS, N. K., Lima, E. D. C., Conceição, S. D. R., Kuster, R. M., Oliveira Filho, A. M. D., & Lage, C. L. S. (2004). Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química nova*, 27, 46-49.

SNELLING, E. P., et al. Molting of insect trACHaE captured by light and electron microscopy in the metathoracic femur of a third instar locust *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, v. 57, p. 1312-1316, 2011.

SODERLUND, D. (2011). Mecanismos moleculares de neurotoxicidade de inseticidas piretróides: avanços recentes. *Archives of Toxicology*, 86, 165 - 181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>.

SOONWERA, M.; Phasomkusolsil, S. Efeito dos óleos de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Syzygium aromaticum* (cravo) na morfologia e mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles dirus*. *Parasitology Research*, v. 115, p. 1691-1703, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4910-z>.

SOUZA, A. D. V; FÁVARO, S.P.; ÍTALO, L.C.V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. *Universidade Católica Dom Bosco. MS. Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.10, p.1328-1335, out. 2009.

SOUZA, R. S., et al. Microorganism-Based Larval Diets Affect Mosquito Development, Size and Nutritional Reserves in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Front Physiol.*, v. 10, p. 152, 2019. doi: 10.3389/fphys.2019.00152.

SPARKS, T., CROSSTHWAITE, A., NAUEN, R., BANBA, S., CORDOVA, D., EARLEY, F., EBBINGHAUS-KINTSCHER, U., FUJIOKA, S., HIRAO, A., KARMON, D., KENNEDY, R., NAKAO, T., POPHAM, H., SALGADO, V., WATSON, G., WEDEL, B., & WESSELS, F. (2020). Inseticidas, produtos biológicos e nematicidas: atualizações na classificação do modo de ação do IRAC - uma ferramenta para o gerenciamento de resistência. *Bioquímica e fisiologia de pesticidas*, 167, 104587. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104587>.

TAJIK, S., et al. Zika virus tropism and pathogenesis: understanding clinical impacts and transmission dynamics. *Virology*, v. 21, p. 271, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02547-z>.

TANG, B., HU, S., LUO, Y., SHI, D., LIU, X., ZHONG, F., JIANG, X., HU, G., LI, C., DUAN, H., & WU, Y. (2024). Impacto de três compostos de tiazolidinona com esqueletos de piperina na atividade da trealase e no desenvolvimento de larvas de *Spodoptera frugiperda*. *Journal of agricultural and food chemistry*. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c08898>.

TSAO, R., et al. Toxicidades inseticidas de extratos contendo glucosinolato de sementes de crambe. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, v. 13, p. 109-120, 1996.

VALLE, D. Controle químico de *Aedes aegypti*, Resistência a Inseticidas e alternativas. In: VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. *Dengue teorias e práticas*, 2015. p. 75-92.

VETTER, Walter; DARWISCH, Vanessa; LEHNERT, Katja. Erucic acid in Brassicaceae and salmon—An evaluation of the new proposed limits of erucic acid in food. *NFS journal*, v. 19, p. 9-15, 2020.

VILLENA, María José Martín et al. Development of gastro-resistant tablets for the protection and intestinal delivery of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. *International journal of pharmaceutics*, v. 487, n. 1-2, p. 314-319, 2015.

WEAVER, S., et al. Zika, Chikungunya e outras doenças virais emergentes transmitidas por vetores. *Revisão anual de medicina*, v. 69, p. 395-408, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>.

WEIS, G., ASSMANN, C., CADONÁ, F., BONADIMAN, B., ALVES, A., MACHADO, A., DUARTE, M., DA CRUZ, I., & COSTABEBER, I. (2019). Efeito imunomodulador dos pesticidas mancozeb, clorotalonil e tiofanato metílico em células de macrófagos.. *Ecotoxicologia e segurança ambiental* , 182, 109420. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109420> .

WORLD HEALTH ORGANIZATION. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON518>. Acessado em 29 de novembro de 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Registro epidemiológico semanal, 6 de dezembro de 2024, n. 49, 2024,99 ,719–740 <http://www.who.int/wer> (pp. 601-624). Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379717/WER9949-eng-fre.pdf>> acesso em 10 de dezembro de 2024.

YAMANY, A. S., et al. Morphological description of the pupa of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using a scanning electron microscope. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, v. 76, n. 1, p. 43-54, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-13120>.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Curso de defensivos agrícolas. Porto Alegre: ABEAS, 1990.

ZARA, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25(2), 391-404.

ZENG, T., Teng, F. Y., Wei, H., Lu, Y. Y., Xu, Y. J., Qi, Y. X. AANAT1 regulates insect midgut detoxification through the ROS/CncC pathway. *Commun Biol*. 2024 Jul 3;7(1):808. doi: 10.1038/s42003-024-06505-x. PMID: 38961219; PMCID: PMC11222512.

ZHANG, L., Tang, Y., Chen, H., Zhu, X., Gong, X., Wang, S., Luo, J., Han, Q. Arylalkalamine N-acetyltransferase-1 acts on a secondary amine in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *FEBS Lett*. 2022 Apr;596(8):1081-1091. doi: 10.1002/1873-3468.14316. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35178730.

ZHONGHY, W. C., et al. Gross morphology and ultrastructure of salivary glands of the mute cicada *Karenia caelatata* Distant (Hemiptera: Cicadoidea). *Micron*, v. 45, p. 83-91, 2013.

ZHOU, Y., Zhang, M., Sun, M., Wan, L., Chen, J., & Zhang, Z. (2024). Efeitos dos reguladores de crescimento de insetos Azadiractina, Piriproxifeno e Tebufenozida no metaboloma de ácidos graxos de larvas de *Bactrocera Dorsalis*. *Journal of agricultural and food chemistry*. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c07153>.

ZORN, K., et al. Estratégias para enriquecimento de ácido erúcico do óleo de *Crambe abyssinica* por variantes melhoradas da lipase A de *Candida antarctica*. *Processo Bioquímico*, v. 79, p. 65-73, 2019.

APÊNDICES

Apêndice A: Alvos de ácido erúico selecionados a partir da análise no software PASS online®.

Molecular targets of erucic acid selected from analysis on the PASS online platform				
Erucic acid				
Activity	Activity probability	Activity / Molecular target	Activity probability	Activity / Molecular target
Cytochrome molecules	0,974	CYP2J substrate	0,595	CYP2E substrate
	0,973	CYP2J2 substrate	0,599	CYP2C9 substrate
	0,902	CYP4A11 substrate	0,593	CYP2A substrate
	0,886	Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor	0,575	CYP2C6 substrate
	0,877	CYP2E1 inhibitor	0,531	CYP7 inhibitor
	0,873	CYP4A substrate	0,499	CYP4F8 substrate
	0,869	CYP4A2 substrate	0,522	CYP2C19 substrate
	0,805	CYP3A1 substrate	0,48	CYP4F12 substrate
	0,804	CYP2C12 substrate	0,506	CYP2D16 substrate
	0,756	CYP4B substrate	0,487	CYP2A1 substrate
	0,74	CYP2E1 inducer	0,466	CYP2B substrate
	0,733	Cytochrome-c3 hydrogenase inhibitor	0,494	CYP3A substrate
	0,735	CYP2C8 substrate	0,466	CYP2A4 substrate
	0,728	CYP4B1 substrate	0,425	CYP2B10 substrate
	0,714	CYP2C8 inhibitor	0,415	CYP4F substrate
	0,701	CYP2C9 inducer	0,431	CYP2F1 substrate
	0,704	CYP3A2 substrate	0,392	CYP2C29 substrate
	0,689	CYP2C10 substrate	0,384	GST T substrate
	0,693	CYP2B6 substrate	0,384	GST T1-1 substrate
	0,692	Nitrate reductase (cytochrome) inhibitor	0,444	CYP3A4 substrate
	0,675	CYP4A1 substrate	0,403	CYP2A2 substrate
	0,674	Palmitoyl-CoA hydrolase inhibitor	0,383	CYP2A3 substrate
	0,654	D-lactate dehydrogenase (cytochrome) inhibitor	0,414	CYP2B5 substrate
	0,662	Mitochondrial processing peptidase inhibitor	0,4	CYP1A substrate
	0,637	CYP2C2 substrate	0,388	CYP1A2 substrate
	0,636	CYP4F2 substrate	0,373	CYP3A inducer
	0,637	CYP3A3 substrate	0,372	CYP3A4 inducer
	0,631	CYP2A6 substrate	0,382	CYP2D15 substrate
	0,63	CYP2C substrate	0,336	CYP19A1 expression inhibitor
	0,626	CYP3A5 substrate	0,339	CYP2A8 substrate
	0,606	CYP2C18 substrate	0,328	CYP2D6 substrate
	0,607	CYP2E1 substrate	0,305	CYP2D2 inhibitor
	0,604	CYP2C11 substrate	0,31	CYP2D substrate
Induction of alterations in immune response	0,92	Macrophage colony stimulating factor agonist	0,672	GST P1-1 substrate
	0,867	IgA-specific metalloendopeptidase inhibitor	0,59	Cathepsin T inhibitor
	0,797	Leukopoiesis stimulant	0,523	Transcription factor NF kappa B stimulant
	0,778	Phosphatidylserine decarboxylase inhibitor	0,501	JAK2 expression inhibitor
	0,724	TNF expression inhibitor	0,321	Transcription factor NF kappa A inhibitor
	0,685	GST P substrate	0,361	Caspase 3 stimulant
	0,676	GST M substrate	0,649	Antipruritic, allergic
	0,306	NOS2 expression inhibitor		
Nervous system	0,82	GABA aminotransferase inhibitor	0,516	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
	0,659	GABA C receptor agonist	0,356	GABA transporter 3 inhibitor
	0,578	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase inhibitor	0,319	GABA B receptor agonist
	0,547	Neurotransmitter antagonist	0,346	Octopamine antagonist
Chitinase and chitin synthesis	0,861	Acetylcholinesterase inhibitor	0,75	Beta-carotene 15,15'-monooxygenase inhibitor
	0,856	Arginine 2-monooxygenase inhibitor	0,751	2-Hydroxyquinoline 8-monooxygenase inhibitor
	0,824	Cutinase inhibitor	0,71	Mandelate 4-monooxygenase inhibitor
	0,779	5-O-(4-coumaroyl)-D-quinate 3'-monooxygenase inhibitor	0,704	Glyceryl-ether monooxygenase inhibitor
	0,752	Alkanal monooxygenase (FMN-linked) inhibitor	0,656	Chitinase inhibitor
Possible action in digestion	0,417	Chitin deacetylase inhibitor		
	0,909	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase inhibitor	0,749	Catalase inhibitor
	0,88	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase inhibitor	0,742	Galactolipase inhibitor
	0,875	Fucosterol-epoxide lyase inhibitor	0,725	Glucan 1,4-alpha-maltoetrahydrolase inhibitor
	0,851	Superoxide dismutase inhibitor	0,713	Glucanase inhibitor
	0,838	Glucan 1,4-alpha-maltotriohydrolase inhibitor	0,685	Antiinflammatory, intestinal
	0,839	Mucositis treatment	0,689	Fructose 5-dehydrogenase inhibitor
	0,811	IgA-specific serine endopeptidase inhibitor	0,688	Glucan endo-1,6-beta-glucosidase inhibitor
	0,807	Lactase inhibitor	0,591	Glucan 1,4-beta-glucosidase inhibitor
	0,785	1,4-Lactonase inhibitor	0,533	Glucan endo-1,3-alpha-glucosidase inhibitor
	0,762	Gastrin inhibitor	0,508	1,4-Alpha-glucan branching enzyme inhibitor
Induction of lipidic alterations	0,754	Nitrite reductase (NO-forming) inhibitor	0,421	Glucan 1,6-alpha-glucosidase inhibitor
	0,928	Lipoprotein lipase inhibitor	0,744	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) inhibitor
	0,908	Lipid metabolism regulator	0,731	Phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase inhibitor
	0,905	Sphinganine kinase inhibitor	0,654	Steroid N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor
	0,891	Prostaglandin-A1 DELTA-isomerase inhibitor	0,661	Phospholipid-translocating ATPase inhibitor
	0,891	Phosphatidylcholine-retinol O-acyltransferase inhibitor	0,606	Phospholipase C inhibitor
	0,86	Alcohol O-acetyltransferase inhibitor	0,546	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase inhibitor
	0,861	Phosphatidate phosphatase inhibitor	0,542	Alkylglycerophosphoethanolamine phosphodiesterase inhibitor
	0,856	Fatty-acyl-CoA synthase inhibitor	0,531	Cholesterol oxidase inhibitor
	0,837	Alkylglycerophosphoethanolamine hydrolase inhibitor	0,427	Lipid peroxidase inhibitor
	0,831	Phosphatidylglycerophosphatase inhibitor	0,403	Inositol-polyphosphate 5-phosphatase inhibitor
	0,807	Glycosylphosphatidylinositol phospholipase D inhibitor	0,399	Cholesterol synthesis inhibitor
	0,798	Cholesterol antagonist	0,413	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase inhibitor
	0,303	Glycosylphosphatidylinositol diacylglycerol-lyase inhibitor		
insecticidal activity	0,318	Insecticide		
Oviposition	0,572	Ovulation inhibitor		

Apêndice B: larvas de *Aedes aegypti* L2-L3 tratadas com ácido erúcico na concentração de 2,0 mg/mL (A). B: larva controle. C e C.1 seta preta indica membrana exposta após tratamento com ácido erúcico.

