



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO R-LIMONENO, EM CONCENTRAÇÃO
SUBLETAL, SOBRE A HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO
MÉDIO, E COMPOSTOS ENERGÉTICOS EM LARVAS DE *Aedes Aegypti* L.
(DIPTERA: CULICIDAE)”**

FERNANDA MARQUES DE OLIVEIRA

RECIFE

2018

“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO R-LIMONENO, EM CONCENTRAÇÃO SUBLETAL, SOBRE A HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO MÉDIO, E COMPOSTOS ENERGÉTICOS EM LARVAS DE *Aedes Aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)”

FERNANDA MARQUES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como um dos pré requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador:

Prof^o Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Coorientadoras:

Prof^a Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Dr.^a Glaucilane dos Santos Cruz

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

O48a Oliveira, Fernanda Marques de
Avaliação do efeito do R-Limoneno, em concentração subletal, sobre a histologia e histoquímica do intestino médio, e compostos energéticos em larvas de *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae) / Fernanda Marques de Oliveira. – 2018.
67 f. : il.

Orientador: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Coorientadoras: Valéria Wanderley Teixeira; Glaucilane dos Santos Cruz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, BR-PE,
2018.

Inclui referências.

1. Diptera 2. Monoterpeno 3. Mesêntero 4. Proteínas 5. Carboidratos
6. Histoquímica I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, orient. II. Teixeira, Valéria
Wanderley, coorient. III. Cruz, Glaucilane dos Santos, coorient. IV. Título

CDD 636.089

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO R-LIMONENO, EM CONCENTRAÇÃO
SUBLETAL, SOBRE A HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO INTESTINO
MÉDIO, E COMPOSTOS ENERGÉTICOS EM LARVAS DE *Aedes Aegypti* L.
(DIPTERA: CULICIDAE)”**

FERNANDA MARQUES DE OLIVEIRA

Aprovada em _____ de 2018

Banca examinadora:

Prof^o Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof.^a Dra. Valéria Wanderley Teixeira
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof^o Dr. Anísio Francisco Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr^a Glaucilane dos Santos Cruz
PNPD - PPGEA - UFRPE

**A Deus por ter permitido a realização deste trabalho (Meu sonho),
dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu amor maior, motivo da minha existência. Que me anima, conforta, ajuda e me ensina a enxergar que já preparou o melhor para minha vida. Pois tudo é possível ao que Crê (Marcos 9.23). Um dia sonhei e hoje estou realizando este grande sonho de concluir o mestrado, porque para Deus nada é impossível (Lucas 1. 37). Agradeço - te Deus, pois sem ti nada poderia fazer (João 15.4).

Ao meu orientador professor Dr. Álvaro Águiar Coelho Teixeira que pacientemente me ensinou e me fez aprender aquilo que era complexo com grande simplicidade. Que sempre esteve disposto a me ajudar. Quando mais precisei, nos momentos tão difíceis da minha vida, o senhor sempre estendeu as mãos e me ajudou, não tenho como paga- ló, todo dinheiro seria pouco.

A minha coorientadora Dr^a Valéria Wanderley Teixeira por todo conhecimento transmitido, por ser sempre esse espelho para o meu crescimento da vida acadêmica e vida profissional, me encorajando a galgar lugares mais altos.

A minha coorientadora Glaucilane dos Santos Cruz por toda ajuda, trabalho e aprendizado.

Aos meus pais amados: Luiz Fernando Marques de Oliveira e Maria das Dores Gomes que durante o percurso do mestrado foi acometida de câncer, mas graças a Deus já está melhor. E nesta data tão importante para minha vida está presente entre nós. Saibam que vocês sempre foram os melhores mestres da minha vida, que me ensinaram com sabedoria o melhor caminho a ser trilhado.

Aos meus familiares, meus irmãos, Thiago Marques de Oliveira, Lucas Diego Marques de Oliveira e Mônica Lopes Gomes. A minha tia Maria de Fátima Lopes, a minha sobrinha Ana Débora Lopes da Silva e prima Adriele dos Santos Lopes que me apoiaram e incentivaram durante todo o percurso. Amo vocês família.

Ao meu amado noivo Jefferson Nascimento da Silva por sempre está ao meu lado me apoiando, incentivando e acreditando em mim. Agradeço por todo cuidado, paciência, carinho e amor. Pois com você eu sou muito mais feliz. Amo-te.

A todos os meus amigos, especialmente Thiago José de Souza Alves, uma pessoa tão boa que sempre me ajudou desde início desta jornada, falar de você, é falar de alguém que é do “bem”, sempre pronto a ajudar a quem precisa. A minha amiga Fabiana Félix, uma pessoa simples e que tem um “coração enorme”, pois mesmo sendo tão ocupada sempre se dispôs a me ajudar. A Edmilton Amaro que pacientemente também me ensinava e ajudava tirando minhas dúvidas. Ao casal Tiago Henrique Oliveira e Josemary Oliveira que sempre me auxiliavam e tiravam mais dúvidas. A Wellington Marques e Graciete Marques pela nossa amizade, cada conversa, conselhos, durante esses anos tão difíceis, além de você Wellington sempre consertar os notebooks, impressoras quando quebravam sua participação foi de grande valia nesta etapa da minha vida. Como também seus filhos Gabriela Marques e Felipe Marques que muito me alegravam. A Rosângela Amâncio, por toda amizade.

A todos do trabalho da Prefeitura do Recife, gestores, supervisores e agentes que sempre me ajudavam quando precisava. Especialmente a Elizabete Regina, Fausto Filho, Emilly Karine, Fernando Barros, Domingos Antônio, Edson Rodrigues, Ednice Tereza, Natalie Free, Fábio Correia e Maria Auxiliadora.

Aos irmãos da igreja que oraram por mim. Especialmente minha amiga irmã Maria das Graças de Andrade Silva saibas que suas orações foram atendidas. E a seus filhos Maycon Andrade, Carlos Andrade e Jeckson de Andrade -por toda amizade e a você Jeckson ainda por toda ajuda, principalmente no inglês.

Aos meus amigos do laboratório, Hilton Nobre, que é literalmente nobre, por toda ajuda e incentivo nos momentos que mais precisei, Kamilla Dutra e Cristiane Thalita Silva por toda ajuda nos experimentos, além de toda gentileza, generosidade e bondade sempre comigo. A Andrezzo Adenilton por sempre me ajudar quando precisei.

A todos os amigos e professores, pela ajuda e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Coordenador professor Prof^o Dr. Anísio Francisco Soares por todo apoio e disposição, sempre pronto a ajudar. A Universidade Federal Rural de Pernambuco por disponibilizar toda estrutura para o meu aprendizado.

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o principal transmissor da dengue em 128 países. Aproximadamente 390 milhões de pessoas são infectadas e 20.000 dos afetados morrem ao ano. Os monoterpenos são eficientes larvicidas contra esse vetor, dentre eles o limoneno que atua no intestino médio das larvas, interferindo em seu desenvolvimento. O objetivo da pesquisa foi avaliar a ação do limoneno, em concentração subletal, sobre a histologia, histoquímica do intestino médio, e níveis de carboidratos neutros e proteínas totais em larvas do *Ae. aegypti*. Foram utilizados bioensaios de larvas 3^o ínstar. O limoneno foi usado na CL₅₀ de 27 ppm. Formaram-se os tratamentos: limoneno e controle (água e etanol), analisados após 12 e 24h. O intestino médio das larvas tratadas após 12h apresentou células colunares, protuberâncias e vacuolização citoplasmática e após 24h houve total desorganização do epitélio. Histoquimicamente as larvas tratadas apresentaram níveis superiores de glicogênio quando comparadas ao grupo controle, assim como para proteína total. Bioquimicamente, houve aumento significativo dos níveis de proteína total nas larvas tratadas em relação ao controle 12 h e redução em relação ao controle 24 h. Verificou-se, respectivamente, aumento e redução dos níveis de glicogênio e açúcar total nas larvas tratadas em relação aos controles. Conclui-se que o limoneno provoca alterações na histologia e histoquímica no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti*, além de interferir nos níveis de proteínas, glicogênio e açúcar total..

Palavras-chave: Diptera, Monoterpeno, Intestino médio, Histoquímica.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main transmitter of dengue in 128 countries. Approximately 390 million people are infected and 20,000 of those die each year. The monoterpenes are efficient larvicides against this vector, among them the limonene acts in the midgut of the larvae, interfering in its development. The objective of the research was to evaluate the action of limonene, in sublethal concentration, on histology, histochemistry of middle intestine, and levels of neutral carbohydrates and total proteins in *Ae. aegypti* larvae. Bioassays of 3rd instar larvae were used. Limonene was used at the LC₅₀ of 27 ppm. The treatments were: limonene and control (water and ethanol), analyzed after 12 and 24 h. The midgut of the larvae treated after 12h presented columnar cells, protuberances and cytoplasmic vacuolization and after 24h there was total disorganization of the epithelium. Histochemically, the treated larvae had higher levels of glycogen when compared to the control group as well as for total protein. Biochemically, there was a significant increase in total protein levels in the treated larvae in relation to the 12 h control and reduction in relation to the 24 h control. There was an increase and reduction in glycogen and total sugar levels in the treated larvae in relation to the controls. It is concluded limonene causes pathological changes in histology and histochemistry in the midgut of the *Ae. aegypti* larvae, besides interfering in proteins level, glycogen and total sugar.

Key words: Diptera. Monoterpene. Midgut. Histochemistry.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fotomicrografia do intestino médio de larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. A-B (controle 12 e 24, respectivamente), C (R-limoneno 12h) e D (R-limoneno 24h). Ep: epitélio; seta curta: célula cilíndrica; seta longa: protuberância; ponta de seta: célula regenerativa; seta tracejada: vacúolos citoplasmáticos. Azul de Toluidina.61

FIGURA 2: Histoquímica para glicogênio no intestino médio de larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. A-B (controle 12 e 24, respectivamente), C (R-limoneno 12h) e D (R-limoneno 24h). Quantificação do glicogênio em pixels (E). Verificar marcação positiva em todos os tratamentos, porém sendo mais intensa nos tratamentos com R-limoneno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). PAS.62

FIGURA 3: : Histoquímica para proteína total no intestino médio de larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. A-B (controle 12 e 24, respectivamente), C (R-limoneno 12h) e D (R-limoneno 24h). Quantificação de proteína total em pixels (E). Verificar marcação positiva em todos os tratamentos, porém sendo mais intensa nos tratamentos com R-limoneno, e menos no controle 12 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). xilidina Ponceau.63

FIGURA 4: Bioquímica para proteína total em larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. Verificar aumento dos níveis de proteína total nas larvas tratadas com R-limoneno em relação ao controle 12 h e redução em relação ao controle 24 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).64

FIGURA 5: Bioquímica para glicogênio em larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. Verificar aumento dos níveis de glicogênio nas larvas tratadas com R-limoneno em relação aos controles 12 e 24 h. Entre os controle houve redução desse nutriente com 24 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).65

FIGURA 6: Bioquímica para açúcar total em larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. Verificar redução significativa dos níveis de açúcar total nas larvas tratadas com R-limoneno em relação aos controles 12 e 24 h, sendo mais efetiva nesse ultimo período.

O controle 24 h apresentou o maior nível, porém sem diferir de 12 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).66

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	PÁG.
I	
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Culicidae.....	14
2.2 Mosquitos e a sua importância na saúde.....	16
2.2.1 Dengue.....	16
2.2.2 Chikungunya.....	17
2.2.3 Zica.....	17
2.2.4 Febre amarela.....	17
2.3 <i>Aedes aegypti</i>.....	17
2.4 Controle do <i>Aedes aegypti</i>.....	20
2.4.1. Organoclorados	20
2.4.2. Organofosforados.....	20
2.4.3. Carbamatos.....	21
2.5 Óleos essenciais.....	21
2.6 Limoneno.....	22
2.7 Intestino médio dos mosquitos.....	23
2.8 Reservas nutricionais.....	23
3. REFERÊNCIAS.....	25
II	
ATIVIDADE DO R-LIMONENO SOBRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE LARVAS DE <i>Aedes Aegypti</i> L. (DIPTERA: CULICIDAE)	
Introdução.....	40
Material e métodos.....	42

Resultados.....	45
Discussão.....	46
Conclusão.....	50
Referências.....	50

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes sp.* que se reproduz em habitats tropicais e subtropicais. O principal vetor, *Aedes aegypti*, é uma espécie que se prolifera de forma cosmotropical em recipientes com água e em torno de casas. Vetores secundários incluem *Ae. albopictus*, um vetor importante no Sudeste da Ásia e que se espalhou para as Américas, África Ocidental e na Bacia do Mediterrâneo, *Ae. mediovittatus* no Caribe, e *Ae. polynesiensis* e *Ae. scutellaris* na região do Pacífico Ocidental. Apesar de ocorrerem ciclos zoonóticos envolvendo macacos em algumas áreas de floresta da África Ocidental e do Sudeste da Ásia, não há nenhuma evidência de que esses desempenham qualquer papel em epidemias de doenças humanas. Por conseguinte, o controle pode ser dirigido para o *Ae. aegypti* encontrado em muitos tipos de recipientes domésticos, como frascos de armazenamento de água, tambores, tanques e recipientes de plantas ou flores. Esses insetos não voam longe, dispersando provavelmente não mais do que 100 m do local da emergência (REITER et al., 1995; HONÓRIO et al., 2003; MORI et al., 2004; HARRINGTON et al., 2005) e são altamente antropofílicos, ou seja, raramente se alimentam-se de hospedeiros não-humanos.

A dengue comum e a hemorrágica ocorrem em 128 países, com uma estimativa anual de 20.000 mortes, além de mais de 50% da população mundial estar em risco de contaminação (BRADY et al., 2012; BHATT et al., 2013). A sua prevenção consiste no controle vetorial, implementação de bons sistemas de vigilância e no desenvolvimento de vacinas. Como ainda não existe nenhuma vacina validada, o controle vetorial é muito importante, consistindo, principalmente, na eliminação de criadouros naturais e artificiais dos mosquitos, além da aplicação de inseticidas tanto para larvas quanto para os adultos (LIGON, 2005).

Dadas essas limitações, o controle ou mesmo a eliminação de populações de vetores peridomésticas pode parecer viável, mas a experiência tem provado de outro modo. Muitas tentativas de erradicação falharam, por várias razões: programas verticais foram ineficientes e insustentáveis, espaço ao ar livre durante a pulverização foi ineficaz, larvicidas foram muitas vezes rejeitados pelas comunidades e mensagens educativas para a população não tiveram sucesso (GUBLER & Clark 1994; SLOSEK, 1986; PARKS & LLOYD, 2004; PÉREZ-GUERRA et al., 2009). Estudos têm

demonstrado a resistência a diversas classes de inseticidas de populações de *Ae. aegypti* em diversos estados brasileiros, como São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Sergipe e Alagoas (MARCORIS et al., 2003; LUNA et al., 2004). Além disso, a utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos tem contaminado o ambiente e os organismos benéficos (ABDOLLAHI et al., 2004; NAKATA et al., 2005), fazendo-se necessário o desenvolvimento de produtos com mais eficiência e menor impacto ambiental.

Como alternativa a esses sintéticos, temos os óleos essenciais (OE) que são compostos voláteis oriundos do metabolismo secundário das plantas, com ação inseticida comprovada em vários insetos praga. Podem ser obtidos através da hidrodestilação. Eles desempenham papéis significativos na defesa das plantas contra bactérias, fungos, vírus, como também contra animais, como os herbívoros, por deterrência, impalatabilidade, reduzindo a absorção, entre outros. Outras funções desempenhadas estão correlacionadas a atratividade, beneficiando a dispersão de sementes e polens (BAKKALI et al., 2008). Esses óleos podem ser classificados em fenilpropanóides, sesquiterpenos oxigenados, e os monoterpenos os quais são considerados mais eficientes larvicidas (CHENG et al., 2009a; ACIOLE et al., 2011; LIMA et al., 2011). Dentre os monoterpenos podemos citar o limoneno (CHENG et al., 2009b; ACIOLE et al., 2011; RUIZ et al., 2011).

O limoneno é o principal constituinte encontrado nas cascas de frutas cítricas. É o terpeno de maior relevância nos óleos essenciais provenientes das cascas das frutas cítricas, como exemplo, a laranja. No Código de Regulamentos Federais, o limoneno está na lista das substâncias geralmente reconhecidas como seguras (THOMAS & BESSIÉRE, 1989; MIRA, 1999; CRF, 2018). Sendo assim, é muito utilizado em diversas indústrias, entre elas, as de solvente para desengordurar os metais antes da pintura; as comestíveis, como aditivo de sabor nas comidas; nas perfumarias e nos produtos de limpeza como fragrância. (FILIPSSON et al., 1998). Além do mais, nesse composto também foram constatadas propriedades inseticidas contra vários insetos (IBRAHIM et al., 2001).

Nos últimos anos, pesquisas têm despertado um grande interesse na comunidade científica em busca de propriedades contra insetos, utilizando os OE e seus componentes, uma vez que eles são relativamente seguros para o meio, para a saúde do

homem e, além do mais, existe um enorme potencial botânico disponível na natureza. No entanto, ainda existe falta de informação sobre como cada composto age individualmente nessas misturas, fazendo-se necessária a continuidade de pesquisas sobre essas substâncias e não apenas relativas à toxicidade (PAVELA, 2009; 2015).

Trabalhos têm comprovado que o composto limoneno, além de apresentar toxicidade em larvas do *Ae. Aegypti*, atua principalmente no intestino médio das larvas de mosquito, interferindo no desenvolvimento larval, mesmo em concentrações sub-letais (RAY et al., 2007; FERNANDES et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2015). Logo, podemos deduzir que os compostos podem afetar as reservas bioquímicas, modificando a sobrevivência e o comportamento da larva e do adulto (HARDSTONE et al., 2010; WALIWITIYA et al., 2009).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do composto limoneno em concentração subletal sobre a histologia e a histoquímica do intestino médio, assim como níveis de carboidratos (açúcares e glicogênio) e proteínas totais em larvas de *Ae. aegypti*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Culicidae

O táxon Culicidae é monofilético e engloba todas as espécies de mosquitos. Seus representantes, quando no estágio adulto, são delgados, possuem peças bucais alongadas e longas pernas, além de cerdas em grande parte do corpo, tornando-os facilmente reconhecíveis (HARBACH & KITCHING, 1998). Devido à falta de ferramentas de estudo mais conclusivas, a classificação atual dos membros do táxon Culicidae não reflete inteiramente sua história evolutiva. Portanto, apesar de estar sujeita a modificações, a família Culicidae é atualmente composta por duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (HARBACH & HOWARD 2007; REIDENBACH et al., 2009). Culicinae é a maior subfamília do táxon Culicidae, abrangendo 3.059 espécies (HARBACH, s.d.). Seus representantes são denominados comumente como “mosquitos verdadeiros” e seus membros são considerados mais derivados que os da subfamília Anophelinae (PAWLOWSKI et al., 1996; BESANSKY & FAHEY 1997; MILLER, CRABTREE & SAVAGE, 1997).

Os mosquitos apresentam ampla diversidade morfológica, paralela a uma espetacular irradiação em praticamente todo tipo de ambiente, o que proporcionou a esses animais um enorme sucesso evolutivo (GRIMALDI & ENGEL, 2005). Eles habitam regiões tropicais e temperadas, sendo algumas espécies encontradas até bem além do Círculo Polar Ártico (FOLEY et al., 2007). No entanto, seu número e diversidade são muito maiores em ambientes de floresta tropical (HARBACH & HOWARD, 2007).

Os mosquitos são normalmente encontrados em ambientes cuja umidade é alta. Algumas espécies vivem a poucos metros do solo, enquanto outras, principalmente as silvestres, vivem no dossel de florestas. O tempo de voo e a duração da atividade alimentar são geralmente característicos de cada espécie. Em relação ao período de atividade, há culicídeos noturnos, crepusculares ou ativos durante o dia (HARBACH & HOWARD 2007).

Os culicídeos são insetos holometábolos (de metamorfose completa), pois possuem distintos estágios de desenvolvimento, com seu ciclo de vida incluindo as fases de ovo, larva, pupa e adulto. O estágio de pupa é uma fase quiescente, mas nos estágios larvais precisam se alimentar para dar continuidade ao seu desenvolvimento (WIEGMANN et al., 2009). As fases imaturas dos mosquitos são encontradas em um amplo espectro de ambientes aquáticos, ocupando principalmente corpos temporários e permanentes de água subterrânea (HARBACH & HOWARD 2007).

Fêmeas e machos adultos de Culicidae são em geral morfológicamente distintos, principalmente quanto às antenas, peças bucais e genitália. As diferenças são mais visíveis em relação à morfologia das antenas e do aparelho bucal. Fêmeas possuem antenas pilosas, estruturas de perfuração no aparelho bucal e são geralmente mais robustas que os machos que, por sua vez, têm antenas plumosas e não apresentam probóscide com peças perfurantes (FORATTINI, 2002).

Todos os mosquitos machos se alimentam exclusivamente de líquidos de plantas como néctar, mel, sumos de frutas e exudados. No entanto, com exceção dos gêneros *Toxorhynchites*, *Malaya* e *Topomyia*, as fêmeas de mosquitos se alimentam de sangue de animais vivos, o que faz delas excelentes veículos para transmissão de patógenos, exibindo uma enorme importância médica (HARBACH & HOWARD 2007).

O sangue ingerido pelas fêmeas é requerido para o desenvolvimento de seus ovos de forma absoluta (anautogenia) ou facultativa (autogenia). Fêmeas anautógenas não

produzem ovos sem o repasto sanguíneo. Nas fêmeas autógenas, um lote de ovo é desenvolvido após a emergência do estágio adulto, porém a alimentação de sangue é necessária para a produção dos lotes posteriores (CLEMENTS, 1992).

2.2. Mosquitos e sua importância na saúde

Os mosquitos são os que mais têm chamado à atenção da saúde pública dentro da entomologia médica. Possivelmente isso ocorre devido ao fato dessa família (Culicidae) abrigar insetos envolvidos na transmissão de várias doenças ao homem e aos animais domésticos (FORATTINI, 2002). A Organização Mundial da Saúde classificou o mosquito como "inimigo mais indomável da humanidade" e "inimigo da saúde pública número um" devido as consequências humanas e econômicas resultantes das doenças que incapacitam e matam milhões de pessoas todos os anos, transmitindo malária, filariose, dengue, encefalite japonesa e outras doenças (WHO, 1996; ROBERTS, 2002).

As arboviroses (Arbv) são um problema mundial de saúde pública devido a sua crescente dispersão territorial e necessidade de ações de prevenção e controle cada vez mais complexas. São descritas como um grupo de doenças virais, transmitidas por vetores (Arthropod-borne vírus) segundo a WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, (2009). O surgimento de recentes Arbv em locais antes indenes como Brasil e outros países da América é uma grande problemática para a Saúde Pública, pois toda população é suscetível e está exposta ao risco de infecção, pois não existem vacinas disponíveis como método profilático, nem existem antivirais efetivos para o tratamento (CHANCEY et al., 2015). As principais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* são: Dengue, chikungunya, zica e febre amarela.

2.2.1. Dengue

É uma doença infecciosa aguda que pode apresentar-se nas pessoas de forma assintomática ou sintomática. Quando o indivíduo apresenta sintomas, pode se tornar grave e levar à morte. Essa enfermidade é transmitida por mosquitos *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* o seu principal vetor que se dispersa rapidamente e mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, podendo disseminar 4 sorotipos distintos, são eles: DEN-1,

DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Nos últimos 50 anos, a incidência de dengue aumentou 30 vezes com um total de 20.000 mortes, sendo considerada a principal arbovirose que atinge o ser humano, gerando uma grave problemática na saúde durante todos os anos. Hoje ainda não existe tratamento específico nem nenhuma vacina disponível para a dengue (LIGON 2005; WHO, 2018, s.d.).

2.2.2 Chikungunya

A chikungunya foi descrita pela primeira vez em 1952 na Tanzânia, esse nome significa "aquilo que se curva" devido às fortes dores nas articulações (ROBINSON, 1955). Essa artralgia intensa pode permanecer meses ou anos, podendo se transformar em motivo de dor e incapacidade crônica nas pessoas. Além desse sintoma, outros como febre e dor de cabeça são características dessa doença, como também da dengue e da zica. Nesse caso, pode haver erros diagnósticos devido às similaridades dos sinais clínicos compartilhados. Hoje não existe cura nem nenhuma vacina disponível ou medicamentos específicos para aliviar os sintomas. Portanto, faz-se necessária a prevenção dos criadores do vetor (*Ae. aegypti*) como uma medida de controle dessa doença a fim impedir a disseminação do vírus através desse mosquito (WHO, 2017).

2.2.3 Zica

O vírus Zika é um flavivírus transmitido às pessoas através da picada do mosquito *Ae. Aegypti*. Ele foi descoberto na Uganda em 1947, em macacos Rhesus, logo após, foi identificado no homem na Uganda e Tanzânia em 1952. O primeiro grande surto da doença ocasionado por esse vírus ocorreu na Ilha de Yap. Hoje é comprovado cientificamente que esse vírus é uma causa da microcefalia e da síndrome de Guillain-Barré, além disso, outras complicações neurológicas estão sendo estudadas.

Sua transmissão além de ser através da picada do mosquito *Ae. Aegypti*, pode ser também através de relações sexuais. Assim sendo, além das medidas preventivas contra o vetor, o uso de preservativos em homens e mulheres sexualmente ativos é necessário. Assim como a dengue e a chikungunya, quanto a zica, não há nenhuma vacina validada (WHO, 2018).

2.2.4 Febre amarela

É uma doença infecciosa hemorrágica causada por um vírus do gênero flavivírus, família Flaviviridae. A expressão “amarela” se refere à icterícia presente em algumas pessoas. Endêmica em 47 países, sendo 34 na África e 13 nas Américas Central e do Sul. Existem dois ciclos principais de aquisição da doença, através dos mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* na região silvestre e do *Aedes aegypti* na área urbana. Sua prevenção é através de uma vacina eficiente e acessível na qual uma dose apenas garante imunidade para toda a vida. Além da imunização, o controle dos mosquitos se dá através da eliminação dos criadouros utilizando larvicidas nos recipientes com água e inseticidas para matar os alados. Hoje não há nenhum medicamento específico contra o vírus, fazendo-se necessário um tratamento hospitalar de qualidade para aumentar as taxas de sobrevivência dos indivíduos. À vista disso, combater *Ae. aegypti* é essencial para diminuir o risco da reinsertão dessa doença, bem como enfrentar a dengue, a chikungunya e a zika (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; BRASIL, 2018)

2.3. *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* é uma espécie de mosquito inserido na Ordem *Diptera*, Subordem Nematocera, Família Culicidae e Subfamília Culicinae. Esse vetor é capaz de transmitir 4 sorotipos distintos, são eles: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4, é de origem africana com populações selvagens e domésticas. Entretanto, é considerado um mosquito cosmopolita (NELSON, 1986; CONSOLI & OLIVEIRA 1994; FORATTINI, 2002).

Vários fatores antrópicos contribuem para a expansão da população dessa espécie no mundo, como o aumento de recipientes não biodegradáveis, as coletas de lixo insuficientes, as péssimas condições de moradia, o enfraquecimento dos sistemas de saúde e, sobretudo, as condições deficientes do saneamento básico. (ALVA, 1997). Os fatores ambientais também afetam o ciclo de vida do vetor como a temperatura, o alimento disponível e a quantidade de larvas presente no criadouro. Quando as condições ambientais são favoráveis, após a eclosão da larva, o desenvolvimento até a fase adulta pode durar até 10 dias. Devido a isso, ao eliminar os criadouros com

frequência, o ciclo de vida que é formado por 4 fases, ovo, larva, pupa e adulto é interrompido (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2018).

O ovo do *Ae. aegypti* mede cerca 0,4 mm de comprimento, no início apresenta cor branca, mas com o tempo fica escuro devido ao contato com o oxigênio. É altamente resistente ao ressecamento, resistindo até 450 dias até ocorrer o contato com a água que propicie a eclosão, o que é uma vantagem enorme para a proliferação do mosquito. O desenvolvimento embrionário do mosquito é realizado em 48 horas em condições favoráveis de umidade e temperatura. Durante sua vida, uma fêmea pode originar até 1.500 mosquitos. Para garantir a dispersão e a preservação da espécie, ela distribui os ovos em diversos criadouros. Caso ela esteja infectada pelo vírus da dengue ao realizar a oviposição, é possível que as larvas filhas nasçam com o vírus pelo procedimento conhecido como transmissão vertical (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2018).

As larvas são aquáticas e têm aparência vermiforme devido ao *Ae. aegypti* ser um inseto holometábolo, a fase larvária é o período de alimentação para dar continuidade ao crescimento (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). As larvas passam grande parte do tempo se alimentando de matéria orgânica acumulada nas paredes e no fundo dos criadouros. Possuem quatro estágios evolutivos que duram até 5 dias em condições ambientais ótimas. O corpo da larva é dividido em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen é subdividido em oito segmentos e na sua extremidade localiza-se o sifão para a respiração na superfície da água local onde ela fica em pé em posição vertical. É sensível a movimentos bruscos na água e se movimenta fazendo um S em seu deslocamento. Na presença de luz move-se agilmente para o fundo do recipiente buscando abrigo devido a fotofobia (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA, 2001).

A pupa tem aspecto de uma vírgula, essa fase dura de dois a três dias. O corpo é dividido em cefalotórax e abdômen. A cabeça e o tórax são juntos, formando o cefalotórax. A larva não se alimenta e é nessa fase que acontece a metamorfose (do estágio larvário para o adulto). Quando é perturbada, move-se muito, mas geralmente fica parada na superfície da água, o que favorece a emergência do alado. Apresenta um par de tubos respiratórios que atravessam a água permitindo a respiração (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FUNASA, 2001).

O *Ae. aegypti* adulto é escuro, com listras brancas no corpo, tem uma estimativa de vida de 30 a 35 dias. Após 24 horas da emergência, ambos os sexos já se encontram aptos para o acasalamento. Apenas uma inseminação é capaz de fecundar todos os ovos que a fêmea chega a produzir ao longo da sua vida. No repasto sanguíneo, as fêmeas adquirem proteínas para o desenvolvimento dos ovos e realizam uma postura em torno de 3 dias em condições de temperaturas satisfatórias. Frequentemente se alimentam mais de uma vez, entre duas sucessivas posturas, especialmente quando perturbadas antes de total ingurgitação (cheias de sangue). Essa ocorrência resulta na mudança de hospedeiros, disseminando os vírus a vários deles. Durante a oviposição, a fêmea grávida é atraída por depósitos com superfície áspera, escuros ou sombreados, onde deposita os ovos. Prefere água limpa ao invés de água poluída e distribui cada postura em muitos recipientes. O hábito domiciliar é evidente pelo fato de que ambos os sexos são encontrados em proporções similares dentro das casas (endofilia), como quartos, banheiros e cozinha e, eventualmente, no peridomicílio. Durante o repouso as paredes, móveis, roupas penduradas e mosquiteiros são os locais preferidos (FUNASA, 2001).

2.4. Controle do *Aedes aegypti*

Para controlar a multiplicação de *Ae. aegypti* faz-se necessária uma aplicação continuada de inseticidas sintéticos com doses progressivamente aumentadas, trazendo provavelmente risco de toxicidade para os seres humanos e animais (LUNA et al., 2004). O controle químico tem sido ineficaz em impedir o desenvolvimento dessa espécie vetorial, uma vez que ela é resistente a inseticidas, como organoclorados, organofosforados e carbamatos (HEMINGWAY & HILARY, 2000).

2.4.1. Organoclorados

O diclorodifeniltricloroetano (DDT) foi um dos organoclorados mais usados mundialmente, desde a Segunda Guerra Mundial contra o tifo, contra o mosquito vetor da malária e para controlar pragas na agricultura (KONRADSEN, 2004). Esses compostos podem ser acumulados ao longo da cadeia alimentar nos animais, plantas, frutos e água expostas a essas substâncias, gerando um problema para a saúde pública e do ecossistema (PERES, 2003).

2.4.2. Organofosforados

Em 1965, a American Cyanamid Company introduziu os organofosforados no mercado. Desde então, eles são utilizados em vários locais mundialmente. O temefós é um pesticida muito utilizado em vários lugares do mundo no controle de vetores biológicos de diversas doenças, trazendo grande perigo para a saúde humana, assim como também inimigos naturais (MÉLO et al., 2008). Atualmente, os organofosforados são a principal causa de intoxicação aguda, sendo responsáveis por mais de 2/3 de intoxicações por inseticidas e mais de 250.000 mortes por ano através de autointoxicações não acidentais, representando 30% dos suicídios no mundo (CAREY; DUNN; COURTNEY & GASPARI, 2013).

2.4.3. Carbamatos

São sais ou ésteres do ácido carbônico, com substituição dos hidrogênios hidroxílicos e amínicos por átomos, grupos funcionais ou radicais muito instáveis em condições neutras e alcalinas à temperatura ambiente. Seus principais representantes são carbaril e carbofurano. São utilizados como inseticidas e herbicidas e geralmente são inibidores da enzima acetilcolinesterase (WHO, 2006).

Tendo em vista que o tempo de comercialização de um novo produto é de difícil cálculo, mas certamente limitado em função da rápida aquisição de resistência, a indústria, por sua vez, tem hesitado em investir na pesquisa de defensivos químicos novos (HEMINGWAY & HILARY, 2000; CHAGAS et al., 2002; TAUIL 2006; BRASIL, 2009).

Além dos inseticidas sintéticos, outro caminho utilizado para o enfrentamento do vetor é a utilização de inseticidas biológicos que tenham atividade larvicida, como exemplo, os que usam esporos da bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* – BTI (BRAGA; VALLE, 2007; PLUEMPANUPAT et al., 2013). A descoberta de novas substâncias com potencial para controlar a sobrevivência e a reprodução do vetor é imprescindível ao considerar-se o papel que o *Aedes* executa na transmissão da doença (MARCONDES, 2011). Os inseticidas naturais fornecem alternativas para o controle de suas populações resistentes agindo nas distintas fases do desenvolvimento e apresentam diversos mecanismos de ação (NAVARRO-SILVA, MARQUES & DUQUE, 2009).

2.5. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, lipossolúveis, incolores, mas eventualmente coloridos, podendo ser produzidos através de todas as partes dos vegetais, como, raiz, caule, folha, semente e fruto. Integram um dos significativos grupos de matérias primas para várias indústrias como as de perfumarias, alimentos e farmacêuticas. Estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos. Eles e seus componentes estão sujeitos a um interesse crescente nos últimos anos, uma vez que são relativamente seguros para o meio, como também para a saúde do ser humano, tem uma grande aceitação pelos usuários e potencial para uso polivalente, embora as pesquisas ainda sejam principiantes ao comparar-se com o enorme potencial botânico acessível na natureza (FILIPISSON et al., 1998 ; BAKKALI et al, 2008).

Diversos estudos com óleos e seus compostos oriundos de plantas, como as espécies *Cymbopogon wynterianus*, *Piper marginatum* e *Piper nigrum* comprovam a atividade larvicida contra *A. aegypti* (FURTADO et al., 2005; AUNTRAN et al., 2009, VELOSO et al., 2015; CUSTÓDIO, et al., 2016). Costa (et al. 2005), demonstraram mortalidade de 100% frente às larvas do *Ae. aegypti* ao estudarem o potencial ativo das espécies, *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* aplicando as seguintes concentrações de CL₅₀ de 21,4; 19,5 e 18,5 nessa ordem. Alguns monoterpenos, componentes de vários óleos essenciais, são descritos na literatura por apresentarem atividade repelente e até mesmo larvicida de mosquitos (YANG & MA 2005; JAENSON et al., 2006), como por exemplo, o limoneno (DHARMAGADDA et al., 2005; KIRAN et al., 2006; PITASAWAT, CHAMPAKAEW & CHOOCHOTE et al., 2007; MORA et al. 2010; NASCIMENTO et al., 2013), evidenciando que os óleos essenciais e seus compostos permitem interferir com as funções básicas metabólicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais dos insetos (ORMANCEY, 2001; PROCÓPIO et al., 2003; LIU et al., 2006).

2.6. Limoneno

O limoneno pertence à família dos terpenos, classificado como um monoterpeno, apresenta isomeria óptica, logo existem dois enântiômeros. O S-limoneno que está presente em muitos vegetais, como exemplo as ervas do gênero *Mentha* spp e o R-

limoneno que é o composto majoritário nos óleos essenciais proveniente das cascas das frutas cítricas, como exemplo, a laranja e limão. Esse composto é liberado em grande quantidade para a atmosfera através de fontes biogênicas e antropogênicas (FILIPSSON et al., 1998; DEMYTTENAERE, J. & KIMPE, 2001; CHEMICAL COMPANY, 2018). Suas aplicações são várias, entre elas, nas indústrias farmacêuticas, nas de comida, como aditivo de sabor e nas de fragrância nos produtos de limpeza e perfumes. Além dessas aplicabilidades, esse composto possui propriedades inseticidas (IBRAHIM et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que alguns óleos essenciais que apresentam em sua composição o limoneno, afetam a histofisiologia do intestino médio de várias espécies de insetos, produzindo alterações nos teores dos lipídios, proteínas e carboidratos (LEVY et al. 2004; SHARMA et al. 2011; CHAPMAN 2013; CRUZ et al., 2016). CRUZ et al (2017) demonstraram que o limoneno, especialmente em associação a outro composto, causou efeitos adversos sobre nutrição e reprodução em *Spodoptera frugiperda*, alterando parâmetros essenciais para sua sobrevivência e estabelecimento em culturas. Também foi constatado o alto potencial desse composto que é encontrado no óleo essencial de *Aristolochia trilobata* em larvas e adultos fêmeas de uma população altamente resistente a piretróides (deltametrina e permetrina), (Silva et al., 2018).

2.7. Intestino médio de mosquitos

As células da parede do intestino médio são cilíndricas, participam na produção e secreção enzimática, absorvem nutrientes, são ricas em microvilosidades e possuem núcleo basal e esférico (ROMOSER, 1996; ALVES et al., 2010). As células repousam sobre uma membrana basal contínua em contato com a hemolinfa, apresentando ainda um labirinto basal (HECKER et al., 1974; HECKER, 1977).

As células epiteliais do intestino médio dos mosquitos produzem matriz peritrófica (MP) em resposta à ingestão de sangue. Vários papéis foram propostos para essa estrutura, dentre eles o de proteção contra patógenos e proteção física do epitélio (MARQUARDT, 2005).

A MP impede que o alimento ingerido fique em contato direto com o epitélio. A formação dessa matriz ocorre diferentemente em culicíneos e anofelinos. Nesses

últimos, o material precursor da matriz já está presente em grânulos que são liberados após a ingestão de sangue (HECKER, 1977). Em culicíneos, a MP é formada pelas células do intestino médio (RUDIN & HECKER, 1976).

2.8. Reservas nutricionais

Nos insetos holometábolos, a aquisição de recursos nos estádios larvais determina as reservas de energia em adultos. As reservas de energia podem ser consideradas como um traço de história de vida devido à sua correspondência com a longevidade e a fecundidade de um mosquito individual (MOSTOWY & FOSTER 2004, BARGIELOWSKI et al., 2012, MAÍGA et al., 2012; KAUFMANN et al., 2013). O tamanho do corpo (peso da pupa, peso do adulto, comprimento da asa, etc.) dos mosquitos também depende da alimentação larval, pelo que os recursos alimentares dos habitats larvais desempenham um papel significativo no ciclo de vida do mosquito (ARRIVILLAGA & BARRERA, 2004; MOGI, 2010. Para uma determinada espécie de mosquito, quanto maior o tamanho de um indivíduo, maior o teor de reservas de proteína, glicogênio e lipídios no surgimento, o que influencia a fecundidade e a longevidade e, assim, contribui para a aptidão do mosquito (BRIEGEL 2003). Pequenas larvas de mosquito com privação nutricional têm reservas de energia mais baixas do que as maiores, como consequência disso, os mosquitos femininos menores precisam tomar mais refeições no sangue para a maturação do ovo durante a fase adulta (BRIEGEL & TIMMERMANN 2001). Isso foi demonstrado em *A. aegypti* (LINNAEUS, 1762; GRIMSTAD & WALKER, 1991; NAKSATHIT, EDMAN & SCOTT, 1999), *Culex pipiens pallens* (LINNAEUS, 1758; SHIN, AKRAM & LEE, 2012). As reservas de energia podem, portanto, ser consideradas indicadores cruciais dos esforços larvários para a aquisição e a assimilação de recursos no tamanho do corpo adulto e também determinantes da longevidade e da fecundidade.

As preferências de habitat da oviposição e o padrão de desenvolvimento de mosquitos vetoriais podem resultar em diferenças nos traços da história da vida e, portanto, nas reservas de energia. Como consequência das diferentes estratégias de desenvolvimento de larvas, incluindo a aquisição de recursos, as reservas de energia em diferentes mosquitos podem variar. Mesmo que os mosquitos se desenvolvam nos

mesmos habitats, suas características fisiológicas, genéticas e morfológicas podem levar a diferenças no padrão de desenvolvimento e, portanto, à aquisição de recursos e reservas de energia. A qualidade dos recursos dos habitats das larvas também pode contribuir para as diferenças nas reservas de energia dos mosquitos (RICHARDS, ANDERSON & ALTO et al., 2012, TABACHNICK, 2013, TSURIM et al., 2013). Por exemplo, os mosquitos que se desenvolvem em drenagens de esgoto variam em desenvolvimento de larvas e, conseqüentemente, em reservas de energia, em contraste com os que se desenvolvem em fitocromas e pequenos habitats de contêineres (BANERJEE, ADITYA & SAHA et al., 2015).

Os alimentos são metabolizados para fornecer energia necessária e reservas sob a forma de nutrientes como carboidratos (glicose, trealose e glicogênio) proteínas e lipídios para insetos a fim de completar o desenvolvimento, realizar metabólicos básicos processos, engajar-se em atividades de reprodução (STEELE & DOWNER, 1981) e fornecer substratos para o funcionamento normal do sistema nervoso (STRANG, 1982). Durante as fases de alimentação, os carboidratos ingeridos são convertidos em lípidos (VAN & LUM 1961; CANDY, KERKUT & GILBER et al., 1985; DOWNER, KERKUT & GILBERT, 1985). Os lipídios são usados através de catabolismo para produzir trealose e glicogênio que podem ser usados diretamente durante a muda, o tamanho prolongado, ogênese e funções normais do corpo (BEENAKKERS, VAN DER HORST & VAN MARREWIJK et al., 1981). Portanto, níveis energéticos de larvas e adultos podem alterar a sobrevivência e as reservas usadas em voo possivelmente alterando o acasalamento, a busca do hospedeiro e a oviposição de comportamentos.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S. et al. Insecticides and oxidative stress: a review. **Journal Medical Science Monitor**. v. 6, n. 10, p.141-147, jun. 2004.

ACIOLE, S.D.G. et al. Insecticidal activity of three species of Guatteria (*Annonaceae*) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Etimología**. v. 37, n. 2, p. 262-268, 2011.

ALVA, E.N. **Metrópoles (In) Sustentáveis**. 1. ed. Rio de Janeiro: Relume Dumara, 1997.

ALVES, S. N.; SERRÃO, J. E.; MELO, A. L. Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. **Journal Elsevier-Micron**. v. 41, p. 592-597, 2010.

ARRIVILLAGA, J.; BARRERA, R. Food as a limiting factor for *Aedes aegypti* in water-storage containers. **Journal of Vector Ecology**. v. 29, n. 1, p.11-20, jun. 2004.

AUTRAN, E. S. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq.(Piperaceae). **Journal Elsevier-Bioresource Technology**. v.7, n. 7, p. 2284-2288, 2009.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Journal Food and chemical toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.

BANERJEE, S.; ADITYA, G.; SAHA, G.K. Household wastes as larval habitats of Dengue vectors: comparison between urban and rural areas of Kolkata, India. **Journal Plos One**. v.10, n, 10, out. 2015.

BARGIELOWSKI, I. et al. Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Journal Vector-Borne Zoonotic Diseases**.v.12, n. 12, p.1053-1058, dez. 2012.

BEENAKKERS, A. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. A. Role of lipids in energy metabolism. In.: Energy metabolism in insects. **Journal Springer**. Boston, MA, p.53-100, 1981.

BESANSKY, N.J.; FAHEY, G.T. Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal Molecular Biology and Evolution**. v.14, n. 1, p.442-454, 1997.

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

BRADY, OLIVER J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_de_dengue.pdf. Acesso em 30 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. World Health Organization. **Febre amarela: Guia para profissionais de Saúde**. 1. ed. 2018 Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5578:folha-informativa-febre-amarela&Itemid=875. Acesso em 10 jan. 2018

BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. **Journal Vector of Ecology**. v.28, n. 1, p.1-11, 2003.

BRIEGEL, H.; TIMMERNMANN, S.E. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological Aspects of Development and Reproduction. **Journal of Medical Entomology**. v. 38, n. 4, p. 566-571, 2001.

CANDY, D.J.; KERKUT, G.A.; GILBER, L.I. Intermediary metabolism, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **Journal Pergamon Ltd**. Oxford, United Kingdom, v.1, p. 43, 1985.

CAREY, L.; DUNN, C.; GASPARI, J. Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 189, n. 2, p. 403-410, nov. 2013.

CHAGAS, A.C.S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.39, n.5 p.247-253, 2002.

CHANCEY, C. et al. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. **Journal BioMed Research Internacional**. 2015.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: University Press, 2013.

CHENG, S.S. et al. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Journal Elsevier-Bioresource Technology**. v.100, n. 1, p. 452-456, jan. 2009a.

CHENG, S.S. et al. Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Journal Pest Management Science**. v.65, n. 3, p.339-343, 2009b.

CLEMENTS, A.N. **The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction**. Chap. & Hall: New York and London, 1992.

CONSOLI, R. AGB; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

COSTA, J.G.M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, 304-309, dez. 2005.

CRUZ, G.S. et al. Sublethal effects of essential oils from *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Lamiaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales: Apiaceae) on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**. v.109, n. 2, p.660-666, abr. 2016.

CRUZ, G. S. et al. Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Elsevier-Chemico-Biological Interactions**. v. 263, n. 1, p.74-80, fev. 2017.

CUSTÓDIO, K.M. et al. A biodegradable device for the controlled release of *Piper nigrum* (Piperaceae) standardized extract to control *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 49, n.6, p.687-692, nov-dez.2016.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 265-270, 2001.

DHARMAGADDA, V.S.S. et al. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Journal Elsevier-Bioresource Technology**. v.96, n. 11, p.1235-1240, jul. 2005.

DOWNER, R.G.H.; KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I.L. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **Journal Pergamon Ltd.** Oxford, United Kingdom. v.77, p.114, 1985.

ESTADOS UNIDOS. U.S. Department of Health & Human Services. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21-Part 182.60**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.6>
Acesso em 15 mar. 2018.

FERNANDES, K.M. et al. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. **Journal Elsevier Parasitology International**. v. 63, n. 3, p.506-512, jun. 2014.

FILIPSSON, F.; BARD, A.; KARLSSON, J. **World Health Organization & International Programme on Chemical Safety**. World Health Organization. Geneva. v. 5, p. 1-36, 1998.

Florida Chemical Company, 2018. Disponível em: <http://www.floridachemical.com/index.php/product-applications/d-limonene-and-other-citrus-terpenes>. Acesso em 17 fev. 2018.

FOLEY, D.H.; RUEDA, L.M.; WIKERSON, RC. Insight into global mosquito biogeography from country species records. **Journal of Medical Entomology**. v.44, n. 4, p.554-567, jul. 2007.

FORATINI, O.P. **Culicidologia médica**. vol. 2. Edusp: São Paulo, 2002.

FURTADO, R.F. et al. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Revista Neotropical Entomologia**. Londrina, v.34, n.5, p.843-847, set-out. 2005.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE; **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 2001

GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. **Evolution of the Insects**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

GRIMSTAD, P.R.; WALKER, E.D. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse Virus. IV. Nutritional deprivation of larvae affects the adult barriers to infection and transmission. **Journal of Medical Entomology**. v. 28, n.3, p.378-386, 1991.

GUBLER, D.J.; CLARK, G.G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.50, n. 6, p.50-60, 1994.

HARBACH, R.E. **Mosquito Taxonomic Inventory** (s.d.). Disponível em <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> Acesso em 19 fev. 2018.

HARBACH, R.E.; HOWARD, T.M. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). **Journal European Mosquito Bulletin**. v.23, p.1-66, 2007.

HARBACH, R.E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Journal Systematic Entomology**. v.23, n. 4, p.327-370, jan. 1998.

HARDSTONE, M.C. et al. Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 2, p.188-198, mar. 2010.

HARRINGTON, L.C. et al. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.72, n. 2, p.209-220, fev. 2005.

HECKER, H. et al. Morphometric analysis of the midgut of female *Aedes aegypti* (L.) (Insect, Diptera) under various physiological conditions. **Journal Cell and Tissue Research**. v.152, n. 1, p. p. 31-49, set. 1974.

HECKER, H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insect, Diptera). **Journal Cell and Tissue Research**. v.184, n. 3, p.321-341, nov.1977.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H.. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.

HONÓRIO, N.A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). In: An urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil, **Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 98, n. 2, p.191-198, mar. 2003.

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science in Finland** v.10,p.243-259,apr. 2001.

INTITUTO OSVALDO CRUZ. Disponível em:
<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>
Acesso em 10.01.18

JAENSON, T.G.; PALSSON, K.; BORG-KARLSON, A.K. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. **Journal of Medical Entomology**. v. 43, n. 1, p.113-119, 2006.

KAUFMANN, C.; COLLINS, L.F.; BROWN, M.R. Influence of age and nutritional status on ght performance of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal Insects**, v. 4, n. 3, p. 404-412, 2013.

KIRAN, S. R. et al. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Journal Elsevier-Bioresource Technology**. v.97, n.18, p. 2481-2484, dez. 2006.

KONRADSEN, F. et al. Engineering and malaria control: learning from the past 100 years. **Acta Tropica**, v. 89, n. 2, p. 99-108, set. 2004.

LEVY, S.M. et al. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): Light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 64, n. 3b, p.633-638, ago. 2004.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. In: SEMINARS IN PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES. **Journal Elsevier**. v.16, n. 1, p.60-65, 2005.

LIMA, M.A.A. et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**. v.10, p.11716–11720, 2011.

LIU, C.H. et al. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Journal Elsevier-Bioresource Technology**. v.97, n. 15, p. 1969-1973, out. 2006.

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

MACORIS, M.L.G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.98, n.5, p.703-708, 2003.

MAÏGA, H. et al. Variation in energy reserves and role of body size in the mating system of *Anopheles gambiae*. **Journal of Vector Ecology**. v.37, n.2, p.289-297, 2012.

MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

MARQUARDT, W.C. **Biology of Disease Vectors**. 2. ed. vol. 2. Burlington, Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2005.

MÉLO, M. E. B. et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 67, n. 3, p. 196-201, 2008.

MILLER, B.R.; CRABTREE, M.B.; SAVAGE, H.M. Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8S ribosomal DNA sequences (*Diptera: Nematocera*). **Insect Molecular Biology**. v.6, n. 2, p.105-114, 1997.

MIRA, B. et al. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition1. **The Journal of supercritical fluids**. v.14, n. 2, p. 95-104, jan.1999.

MOGI, M. Unusual life history traits of *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting *Nepenthes* pitchers. **Journal Annals of the Entomological Society of America**. v. 103, n. 4, p. 618-624, 2010.

MORA, F.D. et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Eugenia triquetra* essential oil from Venezuelan Andes. **Journal Natural Product Communications**. v.5, n. 6, p.965-968, 2010.

MORI; A. Reinvestigation of an endogeneous meiotic drive system in the mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. v.41, n. 6, p.1027–1033, nov. 2004.

MOSTOWY, W.M.; FOSTER, W.A. Antagonistic effects of energy status on meal size and egg-batch size of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal Vector of Ecology**. v.29, n.1, p.84-93, jun. 2004.

NAKATA, H. et al. Concentrations and compositions of organochlorine contaminants in sediments, soils, crustaceans, fishes and birds collected from Lake Tai, Hangzhou Bay and Shanghai city region, China. **Journal Environ Pollut**. v.133, n. 3, p.415-429, fev. 2005.

NAKSATHIT, A.T.; EDMAN, J.D.; SCOTT, T.W. Partitioning of glycogen, lipid, and sugar in ovaries and body remnants of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed human blood. **Journal of Medical Entomology**. v.36, n.1, p.18-22, 1999.

NASCIMENTO, J.C.; et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C DC. (Piperaceae). **Journal Pest Management Science**. v.69, n.11, p.1267-1271, nov.2013.

NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; DUQUE, L.J.E. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 53, n. 1, p. 1-6, 2009.

NELSON, M. J. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud, 1986.

ORMANCEY, X. **Formulation of essential oils in functional perfumery. Parfums, Cosmetiques, Actualites** [online]. v.157, p.30-40, 2001. Acesso em 21 fev. 2018.

PARKS, W.; LLOYD, L. Planning social mobilization and communication for dengue fever prevention and control. In: **World Health Organization**. Genève, 2004.

PAVELA, R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Journal Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 311-315, 2009.

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

PAWLOWSKI, J. et al. Phylogeny of the infraorder *Culicomorpha* (Diptera: Nematocera) based on 28S RNA gene sequences. **Journal Systematic Entomology**. v.21, n. 2, p.167-178, abr. 1996.

PERES F, MOREIRA JC, DUBOIS GS. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres F, Moreira JC, organizadores. **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. p.23-4.

PÉREZ-GUERRA, C.L. et al. Community beliefs and practices about dengue in Puerto Rico. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v. 25, p. 218-26, 2009.

PITASAWAT, B.; CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W. Aromatic plantderived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. **Journal Elsevier-Fitoterapia**. v.78, n.3, p.205-210, abr. 2007.

PLUEMPANUPAT, S. et al. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Journal Elsevier-Industrial crops and products**. v. 44, p. 653-658, jan. 2013.

PROCÓPIO, S.D.O. et al. Bioactivity of powders from some plants on *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae). **Journal Ciência e Agrotecnologia**. v.27, n. 6, p.1231-1236, nov-dez. 2003.

PROCÓPIO, T.F. et al. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Revista Plos One**. v.10, n.5, 2015.

RAY, K. et al. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. **Journal of Insect Science**. v.9, n. 1, p.1-13, jan. 2007.

REIDENBACH, K.R. et al. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. **Journal BMC Evolutionary Biology**. v.9, p. 298, 2009.

REITER, P.; ANDERSON, R.A.; CLARK, G.G. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.52, n. 2, p.177-179, 1995.

RICHARDS, S.L.; ANDERSON, S.L.; ALTO, B.W. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for dengue virus in the Florida Keys. **Journal of Medical Entomology**. v.49, n.4, p.942-946, 2012.

ROBERTS, L. Mosquitoes and disease. **Journal Science**. v. 298, n. 5591, p. 82-83, out. 2002.

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

ROMOSER, W.S. The vector alimentar system. **Biology of Disease Vectors**. vol.1, p.298-317, 1996.

RUDIN, W.; HECKER, H. Morphometric comparison of the midgut epithelial cells in male and female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera). **Journal Elsevier-Tissue and Cell**. v.8, n.3, p.459-470, 1976.

RUIZ, C. et al. Chemical composition, antioxidant and mosquito larvicidal activities of essential oils from *Tagetes filifolia*, *Tagetes minuta* and *Tagetes elliptica* from Perú. **Journal Thieme-Planta Médica**. v.77, n.12, p. 30, 2011.

SHARMA, P. et al. Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. **Journal Elsevier-Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v.4, n.4, p.301-304, 2011.

SHIN, S.M.; AKRAM, W.; LEE, J.J. Effect of body size on energy reserves in *Culex pipiens pallens* females (Diptera: Culicidae). **Journal Entomological Research**. v.42, n.3, p.163-167, mai. 2012.

SILVA, I. M. et al., (2018). Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpene bioinsecticides. *Pest management science*, v.74, n.4, p.1001-1012.

SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interaction with the human population. **Journal Elsevier-Social Science e Medicine**. v.23, p.249-257, 1986.

STEELE, J.E.; DOWNER, R.G.H. The role of carbohydrate metabolism in physiological function. In: **Energy Metabolism in Insects**. New York: Plenum, 1981, p.101-133.

STRANG, R.H.C. Energy metabolism in the insect nervous system, In: **Energy Metabolism in Insects**. New York: Plenum, p.1982, p.169-206.

TABACHNICK, W.J. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.10, n.1, p.249-277, jan. 2013.

TAUIL, P.L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, n.3, p.275-277, 2006.

THOMAS, A.F.; BESSIÉRE, Y. (1989) Limonene. **Journal Natural Products Reports**. n. 3, p. 291-309, 1989.

TSURIM, I. et al. Inter- and intra-specific density-dependent effects on life history and development strategies of larval mosquitoes. **Revista Plos One**. v.8, n. 57875, mar. 2013.

VAN, H.E.; LUM, PT. Sex as a regulator of triglyceride metabolism in the mosquito. **Journal Science**. v.134, n. 3494, p.1979-1980, dez.1961.

VELOSO, R.A. et al. Óleos essenciais de manjeriço e capim citronela no controle de larvas de *Aedes aegypti*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.10, n.2, p.101-105, 2015.

WALIWIYIYA, R.; KENNEDY, C.J.; LOWENBERGER, C.A. Larvicidal and oviposition altering activity of monoterpenoids, transanithole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal Pest Management Science**. v.65, n.3, p.241-248, 2009.

WIEGMANN, B.M. et al. Single-copy nuclear genes resolve the phylogeny of the holometabolous insects. **Journal BMC Biology**. v.7, p. 34, jun. 2009.

World Health Organization. **The world health report 1996: fighting disease, fostering development**. WHO, 1996. Disponível em:

<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Acesso em 16 out. 2016.

World Health Organization. et al. **Pesticides and their application:** for the control of vectors and pests of public health importance. 2006.

World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. New Edition, 2009.

Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>.
Acessado em: 16/10/2016.

World Health Organization. WHO (s.d.) Disponível em:

http://www.searo.who.int/entity/vector_borne_tropical_diseases/data/data_factsheet/en/
Acesso em 17 fev. 2017.

World Health Organization. WHO 2017. **Chikungunya.** Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> Acesso em 20 jan. 2018.

World Health Organization. WHO 2018. Disponível em:

<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> Acesso em 10 fev. 2018.

YANG, P.; MA, Y. Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. **Journal of Vector Ecology**. v. 30, n. 2, p. 231-234, dez. 2005.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE DO R-LIMONENO SOBRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE LARVAS DE *Aedes Aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)

Fernanda Marques de Oliveira¹; Valéria Wanderley Teixeira¹; Glaucilane dos Santos Cruz²; Cristiane Thalita dos Santos Silva²; Kamilla de Andrade Dutra²; Hilton Nobre da Costa²; Thiago José de Souza Alves³; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira*

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural Federal de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 - Recife, PE, Brasil.

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

³Centro Universitário Brasileiro, Rua Joaquim Felipe, 250, Boa Vista, 50050-340-Recife-PE, Brasil.

*Autor para correspondência: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira- UFRPE-DMFA.

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

Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro.teixeira@ufrpe.br (AAC Teixeira)

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o principal transmissor da dengue em 128 países. Aproximadamente 390 milhões de pessoas são infectadas e 20.000 dos afetados morrem ao ano. Os monoterpenos são eficientes larvicidas contra esse vetor, dentre eles o limoneno que atua no intestino médio das larvas, interferindo em seu desenvolvimento. O objetivo da pesquisa foi avaliar a ação do limoneno, em concentração subletal, sobre a histologia, histoquímica do intestino médio, e níveis de carboidratos neutros e proteínas totais em larvas do *A. aegypti*. Foram utilizados bioensaios de larvas 3^a ínstar. O limoneno foi usado na CL₅₀ de 27 ppm. Formaram-se os tratamentos: limoneno e controle (água e etanol), analisados após 12 e 24h. O intestino médio das larvas tratadas após 12h apresentou células colunares, protuberâncias e vacuolização citoplasmática e após 24h houve total desorganização do epitélio. Histoquimicamente as larvas tratadas apresentaram níveis superiores de glicogênio quando comparadas ao grupo controle, assim como para proteína total. Bioquimicamente, houve aumento significativo dos níveis de proteína total nas larvas tratadas em relação ao controle 12 h e redução em relação ao controle 24 h. Verificou-se, respectivamente, aumento e redução dos níveis de glicogênio e açúcar total nas larvas tratadas em relação aos controles. Conclui-se que o limoneno provoca alterações na histologia e histoquímica no intestino médio de larvas de *A. aegypti*, além de interferir nos níveis de proteínas, glicogênio e açúcar total.

Palavras-chave: Diptera, Monoterpeno, Intestino médio, Histoquímica

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main transmitter of dengue, approximately 390 million people are infected and 20,000 of the affected die each year. The monoterpenes are efficient larvicides against this vector, among them the limonene that acts in the midgut of the larvae, interfering in its development. The objective of the research was to evaluate the action of limonene in sublethal concentration on histology, histochemistry of midgut, and levels of neutral carbohydrates and total proteins in *Ae. aegypti*. 3rd instar larvae were used in the bioassays. Limonene was used at the LC₅₀ of 27 ppm. The treatments were: limonene and control (water and ethanol), analyzed after 12 and 24h. The midgut of the larvae treated after 12h presented columnar cells, protuberances and cytoplasmic vacuolization and after 24h there was total disorganization of the epithelium. Histochemically, the treated larvae had higher levels of glycogen when compared to the control group as well as for total protein. Biochemically, there was a significant increase in total protein levels in the treated larvae relative to the 12 h control and reduction in relation to the 24 h control. There was an increase and reduction in glycogen and total sugar levels in the treated larvae in relation to the controls. It is concluded that limonene causes changes in histology and histochemistry in the midgut of the *Ae. Aegypti* larvae, besides interfering in proteins level, glicogen and total sugar.

Key words: Diptera. Monoterpene. Midgut. Histochemistry.

INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) é o principal inseto transmissor da dengue, doença infecciosa viral que por vezes, propicia complicações podendo ser fatal. A dengue é endêmica em 128 países, sendo frequente em todos os trópicos. Anualmente, estima-se que 390 milhões de pessoas são infectadas pelo *A. aegypti*, das quais 96 milhões apresentam formas graves da doença, e aproximadamente mais de 3,9 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção (Brady et al., 2012; Bhatt et al., 2013; WHO 2018).

Ae. aegypti é um vetor que tem se adaptado facilmente ao meio urbano, utilizando locais com acúmulo de água como sítio de oviposição e desenvolvimento da fase larval, A transmissão do vírus para humanos ocorre através da picada das fêmeas adultas infectadas, as quais se alimentam diurnamente (Eldridge 2005; Klowden 2007). Massebo et al. (2009) e Silva et al. (2017) ressaltando que este culicídeo também é vetor de outras doenças, tais como chikungunya, febre amarela e zica; de modo que, a busca por alternativas de controle dessa espécie vem sendo intensificada, visto que a sua principal medida profilática é o combate ao vetor (Zara et al., 2016) e que somado a isto, não existe medicamentos e vacinas disponíveis que previnam a propagação dessas arboviroses (Ligon; Konishi 2011; Gupta; Reddy 2013).

Um dos principais métodos para o combate ao *Ae. aegypti* é o uso de inseticidas sintéticos. Entretanto, existem evidências de resistência deste vetor a certas classes de inseticidas sintéticos tais como os organoclorados, piretróides, carbamatos e organofosforados (Lumjuan et al., 2011; Hemingway; Hilary, 2000; Zara et al., 2016). Além da contaminação ambiental e de não apresentarem seletividade a organismos não alvos como os polinizadores e inimigos naturais (Macoris et al., 2003; Braga; Valle

2007; Melo-Santos et al., 2010; Polson et al., 2011). Contudo, novos insumos de combate a este vetor, tais como os óleos essenciais, se apresentam promissores, já que superaram a maioria dos desafios associados com inseticidas sintéticos: resistência, toxicidade aos organismos não-alvos e desequilíbrios ecológicos (Hemingway; Hilary, 2000; Shaalan et al., 2006; Kovendan et al., 2013).

Diversas plantas já foram identificadas como produtoras de óleos essenciais e seus compostos com ação larvicida para *Ae. Aegypti*. Sendo os estudos de toxicidade desses óleos concentrados em espécies botânicas pertencentes às famílias Myrtaceae, Zingiberaceae, Asteraceae e Lamiaceae (Magalhães et al., 2010; Park et al., 2011; Govindarajan et al., 2012; Warikoo & Kumar, 2013). Os óleos essenciais podem ser classificados em fenilpropanóides, sesquiterpenos oxigenados e os monoterpenos os quais são considerados eficientes larvicidas (Cheng et al., 2009a; Aciole et al., 2011; Lima et al., 2011). Dentre os monoterpenos, o limoneno vem se destacando em pesquisas toxicológicas (Cheng et al., 2009b; Aciole et al., 2011; Ruiz et al., 2011).

O limoneno apresenta isomeria óptica, logo existem dois enantiômeros, o S-limoneno que está presente em muitos vegetais, e o R-limoneno, o composto majoritário encontrado nas cascas das frutas cítricas (Demyttenaere, J. & Kimpe, 2001). Nascimento et al. (2017) verificaram que o óleo essencial de *Lippia pedunculosa*, (Lamiales: Verbenaceae) rico em R-limoneno, na CL₅₀ de 58 ppm ocasionou toxicidade em larvas de *Ae. aegypti* de 3º instar. Muitos óleos e seus compostos atuam principalmente no intestino médio das larvas, interferindo no desenvolvimento larval (Ray et al., 2007; Fernandes et al., 2014; Procópio et al., 2015); nesse sentido, podemos inferir que tais compostos podem afetar as reservas energéticas (açúcar, glicogênio, trealose, proteínas e lipídios), alterando desde a sobrevivência até o comportamento desses organismos (Waliwitiya et al., 2009; Hardstone et al., 2010).

A literatura relata que larvas de *Ae. Aegypti* utilizam os carboidratos e proteínas como as principais fontes de energia para seu desenvolvimento, pois os lipídios são catabolizados a trealose e glicogênio, e qualquer interferência ocasiona efeitos adversos na sobrevivência desses organismos (Beenackers et al., 1981). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do composto R-limoneno, em concentração subletal, sobre a histologia e histoquímica do intestino médio e bioquímica em larvas de *Ae. aegypti*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Insetos

As larvas de *Ae. aegypti* foram coletadas em focos encontrados nas residências de moradores das seguintes localidades: UR7 - Várzea, Rosa Selvagem, Várzea baixo, e Barreiras, (regiões de alta infestação do *Ae. aegypti*), todas pertencentes ao bairro da Várzea, (Latitude -8.0532808, e Longitude -34.9742031), localizado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Posteriormente os insetos foram transportados ao laboratório de fisiologia de insetos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram acondicionados em um recipiente plástico contendo 3 litros de água destilada. As larvas foram, então, avaliadas e os insetos de 3º instar separados em placas de petri (dimensões da placa) com pipetas plásticas e separadas em grupos (n=20) para a realização dos bioensaios.

2.2 Bioensaios

O composto R-limoneno a 97% de pureza foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA. A concentração utilizada foi utilizada a CL₅₀ de 27 ppm (0,0002 g de

R-limoneno + 0,7 mL de etanol + 100 mL de água destilada) a metodologia utilizada foi adaptada conforme a proposta por Santos et al., 2011. As larvas foram separadas com o auxílio da pipeta Pasteur (3mL) e colocadas em papel de filtro para a remoção do excesso de água e posteriormente foram distribuídas 20 larvas em copos de plástico descartáveis (50 mL) contendo 20 mL de R-limoneno na concentração acima citada, estabelecendo-se os seguintes tratamentos: R-limoneno e controle onde utilizou-se apenas água e etanol. As análises foram realizadas após 12 e 24 h da instalação do experimento.

2.3 Análises histológica e histoquímica do intestino médio

Os mesêntero das larvas, de todos os tratamentos, foram coletados nos intervalos estabelecidos (12 e 24h) e fixados em formol tamponado a 10% por 24 h. Em seguida foram desidratados e processados para inclusão em historesina (Leica, Solms, Alemanha). Os cortes foram feitos em um micrótomo semiautomático Leica a 5 μ e corados com azul de toluidina (histologia), ácido periódico de Schiff (carboidrato) e xilidina Ponceau (proteína), observados em microscópio óptico (Olympus BX60, Olympus America, Inc., NY, EUA) e fotografados usando uma câmera digital acoplada ao microscópio. Foram utilizadas 5 larvas por tratamento sendo cada larva foi considerada uma repetição.

2.4 Quantificação de carboidratos neutros e proteína total no intestino médio

As imagens capturadas foram submetidas ao editor de imagens GIMP[®] 2.8 programa (Programa de Manipulação de Imagem GNU, plataformas UNIX) para converter as imagens digitais em uma escala de cinza (preto e branco). Esta segmentação de cores permite a medição dos números de pixels no tecido selecionado

(Temitope 2013). Para cada tratamento (controle e R-limoneno em cada intervalo), três lâminas de diferentes insetos foram usadas. Em cada lâmina, foram avaliadas quatro seções, totalizando 12 seções/tratamento.

2.5. Testes bioquímicos

2.5.1. Proteína total

Um *pool* de larvas de 3^o instar foram maceradas em 100 µL tampão fosfato de sódio (pH 7,4 a 0,01M), homogeneizadas e centrifugadas a 2000 rpm durante 2 min. Para a quantificação, utilizou-se o método de análise de proteína Bradford (Bradford, 1976) com leitura em espectrofotômetro a 595 nm. As análises foram feitas em duplicatas. Todo procedimento foi realizado em baixa temperatura. Cada *pool* foi realizado com 20 larvas e constituiu uma repetição, sendo 5 repetições por experimento, totalizando 100 larvas.

2.5.2. Glicogênio e açúcar total

Foi utilizado um *pool* com larvas de 3^o instar maceradas em 200 µL de tampão fosfato de sódio (pH 7,4 a 0,01M) e adicionado ao homogeneizado 200 µL de sulfato de sódio + 800 µL de metanol + clorofórmio (1:1). Posteriormente procedeu-se a centrifugação a 2000 rpm durante 2 min. O precipitado foi utilizado para a análise de glicogênio e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio, para análise do açúcar total. O glicogênio e açúcar total foram analisados pelo método antrona-ácido sulfúrico (Van Handel 1985). A absorbância foi lida a 625 nm. As análises de glicogênio e açúcar total foram realizadas em duplicatas. Todo procedimento foi realizado em baixa temperatura. Cada *pool* foi realizado com 40 larvas e constituiu uma repetição, sendo 5 repetições por experimento, totalizando 200 larvas.

2.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste Dunn ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Análise histológica do intestino médio

O intestino médio das larvas de 3^o instar *Ae. aegypti* do controle apresentaram as mesmas características histológicas nos períodos analisados, caracterizadas por um epitélio simples com dois tipos celulares: células cilíndricas e alongadas (ou digestivas) com núcleo esférico e central, e as células regenerativas com formato piramidal, localizadas na base do epitélio (Fig. 1A e C). Em contraste, o intestino médio das larvas de *Ae. aegypti* após 12 h do tratamento com o R-limoneno apresentaram modificações significativas células colunares de larvas caracterizadas de alteração da morfologia, presença de protuberâncias na região apical e vacuolização citoplasmática (Fig. 1B). Já após 24 h observou-se total desorganização da lâmina epitelial (Fig. 1D).

3.2 Análises histoquímica e quantificação do glicogênio e proteína total no intestino médio

Houve marcação positiva em todos os tratamentos para a presença de glicogênio (Fig. 2A-D). Entretanto, a análise da quantificação revelou que o intestino médio das larvas tratadas com R-limoneno apresentaram níveis mais elevados quando comparadas aos seus respectivos controles, sem, no entanto, diferirem entre si (Fig. 2E). Para proteína total, também verificou-se marcação positiva em todos os tratamentos (Fig.

3A-D), porém com teores significativamente maiores nos tratamentos com R-limoneno, e o menor no controle 12 h, que diferiu até do controle 24 h (Fig. 3E).

3.3 *Quantificação de proteína total, glicogênio e açúcar total nas larvas*

Proteína total: houve aumento significativo dos níveis de proteína total nas larvas tratadas com R-limoneno em relação ao controle 12 h e redução em relação ao controle 24 h. Entre os controles observou-se aumento dos níveis de proteína total com 24 h (Fig. 4).

Glicogênio: verificou-se aumento dos níveis de glicogênio nas larvas tratadas com R-limoneno em relação aos controles 12 e 24 h. Entre os controle houve redução desse nutriente com 24 h (Fig. 5).

Açúcar total: Observou-se redução significativa dos níveis de açúcar total nas larvas tratadas com R-limoneno em relação aos controles 12 e 24 h, sendo mais efetiva nesse último período. O controle 24 h apresentou o maior nível, porém sem diferir de 12 h (Fig. 6).

Discussão

O limoneno é um composto cujas atividades inseticidas e insetistáticas são bastante conhecidas (Ibrahim et al., 2001). Campolo et al. (2015) estudando dois óleos essenciais de casca de *Citrus sinensis* (L.) e *Citrus limon* (L.) (Sapindales : Rutaceae), constataram que esses óleos são abundantemente ricos em R-limoneno, apresentando-se eficientes contra larvas de *Aedes* de 4º instar, por sua vez, Silva et al. (2018) demonstraram o enorme potencial toxológico desse composto, encontrado no óleo essencial de *Aristolochia trilobata* L. (Aristolochiaceae), sobre larvas de 3º instar e fêmeas adultas de *Ae. aegypti* numa população resistente a piretróides, a interação do

óleo essencial com o culicídeo foi capaz de afetar sua locomoção, posteriormente acarretando sua morte. Ainda, segundo Botas et al. (2017), ao submeterem larvas de *Ae. aegypti* (4º instar) em nano emulsões do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC (Asteraceae), cujo R-limoneno constitui o componente majoritário, observaram uma inibição da acetilcolinesterase desse díptero.

Esse composto monoterpênico pode atuar sobre diversos modos de ação em insetos, tais como através do contato tópico (via penetração da cutícula), fumigação (causando danos as estruturas respiratórias), ingestão (afetando os componentes do sistema digestivo), e inibindo a produção de acetilcolinesterase (Ibrahim *et al.* 2001, Maragoni *et al.* 2012). Dentre as áreas de atuação do composto, o sistema digestivo, especificamente o mesêntero ganha notoriedade, visto que é uma região onde ocorre a síntese e secreção de enzimas e hormônios além de atuar como local de absorção dos nutrientes, assim, quaisquer alterações que ocorram nesse local podem ser capazes de afetar o crescimento e desenvolvimento dos insetos (Levy et al., 2004, Chapman 2013).

A análise histológica do intestino médio das larvas tratadas com o limoneno revelou alterações morfológicas significativas, compatíveis com o processo de degeneração celular ou apoptose (Valloto et al., 2010; Perumalsamy et al., 2013), o que pode comprometer a fisiologia digestiva (Marquardt 2005). Esses dados nos levam a crer que compostos isolados de plantas, como o limoneno, não são retidos pela matriz peritrófica do intestino médio, cuja função é proteger contra partículas abrasivas e infecções microbianas (Hegedus et al., 2009; Kelkenberg et al., 2015), podendo levar a morte do inseto em detrimento de histopatologias desenvolvidas no epitélio, que, conseqüentemente, irão refletir nos processos vitais e reprodutivos, uma vez que à absorção e digestão de nutrientes serão suprimidas [Mordue (Luntz) & Nisbet 2000], sendo assim, o mesêntero torna-se um órgão importante para os estudos

ecotoxicológicos (Catae *et al.*, 2014). Segundo Barbehen et al. (2001) e Senthil-Nathan (2008), os produtos derivados de plantas são capazes de ocasionar alterações histofisiológicas nos insetos atuando na morfologia de células e tecidos, e causando prejuízos sobre a imunologia celular.

Histoquímicamente o intestino médio das larvas tratadas com o limoneno, revelaram maior marcação para carboidratos e proteínas, quando comparados aos seus respectivos controles. Os carboidratos são requeridos em diversos processos metabólicos; funcionando como a principal fonte energética dos insetos; além disso, são responsáveis por inúmeras funções metabólicas e estruturais; tais como atuar na formação da quitina, através de longas cadeias de N- acetilglucosamina, e participam da síntese de aminoácidos e da conversão de alguns grupos lipídicos (Arrese, 2010, Chapman 2013).

Segundo Parra (1999) o aumento no teor de carboidratos propicia um alongamento na longevidade dos insetos, e conseqüentemente sua diminuição, reduz a sobrevivência desses organismos. Assim como os carboidratos, as proteínas são de fundamental importância para a sobrevivência dos insetos, por participarem de diversos processos estruturais, enzimáticos, de transporte, atuarem na maturação dos ovos por meio da vitelogenina, participarem do armazenamento de moléculas, e atuarem como receptores de membrana (Guizzo et al., 2012; Rosas-Mejía et al., 2015). Dessa forma, podemos sugerir que o acúmulo dessas moléculas nas células epiteliais do intestino médio, se faz necessário para a realização de alguns processos fisiológicos. O limoneno, presumivelmente, pode ter induzido a alguns danos dentre os que foram observados na histologia do *Ae. aegypti*, como presença de protuberâncias na região apical, vacuolização citoplasmática e total desorganização da lâmina epitelial. Assim, as reservas nutricionais, observadas nos resultados, foram relocadas para responder a esses

danos. Em contrapartida, Cruz *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2016), ao usarem óleo de cravo e de citronela, sob as gônadas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) verificaram que a marcação deste componente foi mais intensa no controle ao invés dos tratamentos ao P.A.S., enquanto Costa *et al.* (2017), observou uma menor quantificação em pixels de proteínas na coloração Xilidina Ponceau quando avaliou o efeito do Lufenuron sobre outra espécie holometabólica, demonstrando assim que o modo de ação dos inseticidas, a fisiologia do inseto, o tempo e o modo de aplicação podem alterar sua resposta.

Em insetos holometábolos, a aquisição de recursos nos estágios imaturos determina as reservas de energia nos adultos, sendo essas reservas energéticas são determinantes para a longevidade e a fecundidade do inseto (Mostow; Foster 2004; Bargielowski *et al.*, 2012; Maïga *et al.*, 2012; Kaufmann *et al.*, 2013). Em nossos resultados, as análises bioquímicas revelaram aumento do teor de proteínas totais em comparação ao controle de 12 h e redução em relação ao controle 24 h. Esse aumento pode caracterizar uma desordem estar relacionado ao estresse resultante da interação do organismo com o limoneno nas primeiras horas de contato. Souza *et al.* (2015) observaram que larvas de terceiro instar de *Ae. aegypti*, ao serem submetidas a uma concentração subletal, contendo 10 g mL^{-1} do inseticida natural m-pentadecadienil-fenol, expressaram níveis aumentados de proteínas relacionado ao estresse, fato que corrobora com nossa pesquisa. Entretanto, a sua redução deve-se, provavelmente, a interferência ocasionada pelo composto sobre os hormônios que regulam a síntese proteica, (Senthilkumar *et al.*, 2009).

Sneha & Preet (2016) observaram que larvas de *Ae. aegypti* tratadas com concentrações subletais do óleo de nim, apresentaram redução do glicogênio após 24, 48 e 72 h. Assim, o aumento dos níveis de glicogênio total nas larvas tratadas com R-

limoneno, evidenciado nesta pesquisa pode estar relacionado ao tempo de exposição ao composto (12 e 24 h). Outra hipótese fundamentada pela redução do teor de açúcar total, que é constituído na sua maior parte pela glicose, a qual não é prontamente usada pelos insetos como fonte de energia; em vez disso, é utilizada na síntese de glicogênio (Friedman 1985). Isso confirma o acúmulo do glicogênio observado pela histoquímica nas larvas tratadas com R-limoneno em ambos os períodos avaliados, uma vez que essa molécula só é encontrada armazenada no interior das células (Candy 1985; Alves 2017).

5. Conclusão

Conclui-se que o limoneno em concentração subletal (CL_{50} de 27 ppm) é capaz de interferir na fisiologia do intestino médio de larvas de *Ae. aegypti*, reduzindo a capacidade de absorção e ou armazenamento de nutrientes, o que pode acarretar danos a sobrevivência deste inseto, e conseqüentemente, pode representar uma ferramenta promissora para o controle desse importante vetor.

6. Referências

Aciole, S.D.G.; Piccoli, C.F.; Duquel, J.E.; Costa, E.V.; Navarro-Silva, M.A.; Marques, F.A.; Maia, B.L.N.S.; Pinheiro, M.L.B.; Rebelo, M.T. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (*Annonaceae*) against *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). **Rev. Colomb. Entomol.**, v. 37, p. 262–268, 2011.

Arrese, E.L.; Howard, A.D.; Patel, R.T.; Rimoldi, O.J.; Soulages, J.L. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. **Rev. Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.40, p.91-99, 2010.

Bargielowski, I.; Kaufmann, C.; Alphey, L.; Reiter, P.; Koella, J. Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Vect. Borne Zoon. Dis.**, v.12, p. 1053–1058, 2012.

Beenackers, A.M.T.; Horst, D.J.V.D.; Marrewijk, W.J.A.V. Role of lipids in energy metabolism, In Downer R.G.H. **Energ Metabol. Insec.** Plenum, New York, p.53-100,1981.

Botas, Gisele da S. et al. Baccharis reticularia DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) **Control. Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1990, 2017.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal., Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.

Brady O.J.; Gething P.W.; Bhatt S.; Messina J.P.; Brownstein J.S.; Hoen AG et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Negl Trop Dis**. 2012;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.

Braga, I.A.; Valle, D. *Aedes Aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. **Epidemiol. Serv. Saúd.**, v.16, p. 279–293, 2007.

Bhatt S.; Gething P.W.; Brady O.J.; Messina J.P.; Farlow A.W. Moyes CL et.al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**. 2013;496:504–7. doi:10.1038/nature12060.

Candy, D.J. Intermediary metabolism, pp. 1Ð43. *In* G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **Pergamon Ltd.**, Oxford, United Kingdom, 1985.

Chapman, R.F. *The insects: structures and function*. Cambridge, Cambridge University Press, p.929, 2013.

Campolo, Orlando et al. Larvicidal effects of four citrus peel essential oils against the arbovirus vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. economic entomol.**, v. 109, n. 1, p. 360-365, 2015.

Cruz, G. D. S. et al. (2015). Alteraciones Histológicas e Histoquímicas Provocadas por el Aceite Esencial de Clavo de Olor en las Gónadas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Intern. J. Morphol.** v. 33, n. 4, p. 1393-1400.

Demyttenaere, Jan; de Kimpe, Norbert. Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 265-270, 2001.

Eldridge, B. F. Mosquitoes, the Culicidae. *In*: Marquardt, W. C. *Biology of disease vectors*, 2nd ed. **Elsevier**, Amsterdam, p. 95–111, 2005.

Fernandes, K.M.; Neves, C.A.; Serrão, J.E.; Martins, G.F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. **Parasitol. Int.**, v. 63, p.506–512, 2014.

Friedman, S. Carbohydrate metabolism. *In* G. A. Kerkut and L. I. Gilbert [eds.], *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. **Pergamon Ltd.**, Oxford, United Kingdom, p. 44-76, 1985.

Filipsson, A. Falk; Bard, J.; Karlsson, S. Concise International Chemical Assessment Document 5: Limonene. **World Health Organization**. Geneva, v. 5, p. 1-36, 1998.

Guizzo, M.G.; Abreu, L.; Masuda, A.; Logullo, C.; Vaz-Junior, I.S. Metabolism of Biomolecules in the Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Sci Vet.**, v.40, p. 1010-1022, 2012.

Govindarajan, M.; Sivakumar, R.; Rajeswari, M.; Yogalakshmi, K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitol. Res.**, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2012.

Gupta, B.; Reddy, B.P.N. Fight against dengue in India: progresses and challenges. **Parasitol. Res.**, v. 112, n. 4, p.1367-1378, 2013.

Hardstone, M.C.; Huang, X.; Harrington, L.C.; Scott, J.G. Differences in Development, Glycogen, and Lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 47, n. 2, p.188-198, 2010.

Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **An. Rev. Entomol.**, v.54, p. 285-302, 2009.

Hebeish, A.; Fouda, M. M., Hamdy, I. A., El-Sawy, S. M., & Abdel-Mohdy, F. A. Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. **Carb. polymers**, v. 74, n. 2, p. 268-273, 2008.

Ibrahim, M.A.; Kainulainen, P.; Aflatuni, A.; Tiilikkala, K.; Holopainen, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agric. Food Sci.** 2001, 10, 243–259.

Kaufmann, C.; Collins, L.F.; Brown, M.R. Influence of age and nutritional status on flight performance of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).

Insects, v.4, p. 404–412, 2013.

Kelkenberg, M.; Naresh, J.O.; Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H. Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.56, p. 21-28, 2015.

Klowden, M.J. Making generalizations about vectors: is there a physiology of “the mosquito” **Entomol. Rev.**, v.37, p.1–13, 2007.

Konishi, E. Issues related to recent dengue vaccine development. **Trop. Med. Health.**, v. 39, p.63–71, 2011.

Kovendan, K.; Murugan, K.; Kumar, P.M.; Thiagarajan, P.; William, S.J. Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. **Parasitol. Rev.**, v.112, n.3, p.1205-1219, 2013.

Levy, S.M.; Falleiros, A.M.F.; Gregório, E.A.; Arrebola, N.R.; Toledo, L.A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Braz. J. Biol.**, v.64 p.633-638, 2004.

Lima, M.A.A.; Oliveira, F.F.M.; Gomes, G.A.; Lavor, P.L.; Santiago, G.M.P.; Nagao-Dias, A.T.; Arriaga, Â.M.C.; Lemos, T.L.G.; Carvalho, M.G. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants species from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Afr. J. Biotechnol.**, v.10, p.11716–11720, 2011.

Lumjuan, Nongkran et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect biochem. mol. Biology**. v. 41, n. 3, p. 203-209, 2011.

Macoris, M.D.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C.; Bracco, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v.98, n.5, p.703-708, 2003

Magalhães, L.A.M.; Lima, M.P.; Marques, M.O.M.; Facanali, R.; Pinto, A.C.S.; Tadei, W.P. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four Guarea species. **Molecules.** v. 15, n.8, p.5734-5741, 2010.

Maïga, H.; Dabiré, R.K.; Lehmann, T.; Tripet, F.; Diabaté, A. Variation in energy reserves and role of body size in the mating system of *Anopheles gambiae*. **J. Vect. Ecol.** v.37, n.2, p. 289–297, 2012.

Marquardt, W.C. **Biol. Dis. Vect.** Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts. 2. ed, p.785, 2005.

Massebo, F., Tadesse, M., Bekele, T., Balkew, M.; Gebre-Michael, T. (2009). Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) in Ethiopia. **A. J. Biotech.** v.8, n.17, p. 4183.

Melo-Santos, M.A.V.; Varjal-Melo, J.J.M.; Araújo, A.P.; Gomes, T.C.S.; Paiva, M.H.S.; Regis, L.N.; Furtado, A.F.; Magalhaes, T.; Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Ayres, C.F.J. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Trop.**, v.113, n.2, p.180-189, 2010.

Mordue (Luntz) ; Nisbet, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **An. Soc. Entomol. Bras.**, v. 29, p.615-632, 2000.

Mostoway, W.M.; Foster, W.A. Antagonistic effects of energy status on meal size and egg-batch size of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). **J. Vect. Ecol.**, v.29, n.1, p.84–93, 2004.

Park, H.M.; Kim, J.; Chang, K.S.; Kim, B.S.; Yang, Y.J.; Kim, G.H.; Shin, S.C.; Park, I.K. Larvicidal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **J. Med. Entomol.**, v.48, n. 2, p.405-410, 2011.

Parra, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, FEALQ. p.137, 1999.

Pavela, R. (2016). History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects-a review. *Plant Prot. Sci*, n..52, p.229-241.

Perumalsamy, H.; Kim, J.R.; Oh, S.M.; Jung, J.W.; Ahn, Y.J.; Kwon, H.W. Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. **Rev. Plos One**, v.8, n.11, p. e80226, 2013.

Polson, K.A.; Brogdon, W.G.; Rawlins, S.C.; Chadee, D.D. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Trop.** v.117, n.1, p.31-38, 2011.

Procópio, T.F.; Fernandes, K.M.; Pontual, E.V.; Ximenes, R.M.; Oliveira, A.R.C.; Souza, C.S.; Melo, A.M.M.A.; Navarro, D.M.A.F.; Paiva, P.M.G.; Martins, G.F.; Napoleão, T.H. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Rev. Plos One**, v.10, n. 5, p.1-19, 2015.

Ray, K.; Mercedes, M.; Chan, D.; Choi, C.Y.; Nishiura, J.T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. **J. Insect Sci.** v.9, p.1–13, 2007.

Rosas-Mejía, M.; Correa-Sandoval, A.; Venegas-Barrera, C.S.; Horta-Veja, J.V. Preferências entre cinco carboidratos en *Pheidole bilimeki* (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Zool. Mex.**, v. 31, p. 291-297, 2015.

Ruiz, C.; Cachay, M.; Domínguez, M.; Velásquez, C.; Espinoza, G.; Ventosilla, P.; Rojas, R. Chemical composition, antioxidant and mosquito larvicidal activities of essential oils from *Tagetes filifolia*, *Tagetes minuta* and *Tagetes elliptica* from Perú. **Planta. Med.**, v. 2, n. 2, p.146–155, 2011.

Santos, S.R.L.; Melo, M.A.; Cardoso, A.V.; Santos, R.L.C.; Sousa, D.P.; Cavalcanti, S.C.H. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v.84, p.150–153, 2011.

Senthilkumar, N.; Varma, P.; Gurusubramanian, G. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston). **Parasitol. Res.**, v.104, p.237–244, 2009.

Silva, T. I.; Alves, A.C.L.; Azevedo, F. R.; Marco, C.A.; Santos, H.R.; Azevedo, R. (2017b). Actividad larvicida de aceites esenciales en *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Idesia (Arica)**, v.35 n. 2, p.63-70.

- Silva, A.L.C.; Loshino, R.S.; Petersen, V.; Lima, A.F.; Cunha, M.P.; Wiley, M.R.; Ladner, J.T.; Prieto, K.; Palacios, G.; Costa, D.D.; Suesdek, L.; Zanotto, P.M.A.; Capurro, M.L. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **Rev. Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 6, p.1-11, 2017a
- Shalan, E.A.S.; Canyon, D.V.; Bowden, B.; Younes, M.W.F.; Abdel-Wahab, H.; Mansour, A.H. Efficacy of botanical extracts from *Callitris glaucophylla*, against *Aedes aegypti* and *Culex annulirostris* mosquitoes. **Trop. Biomed.**, v.23, p.180–185, 2006.
- Silva, I. M., Martins, G. F., Melo, C. R., Santana, A. S., Faro, R. R., Blank, A. F., & Bacci, L. (2018). Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpene bioinsecticides. **Pest manag. Sci.**, v.74 n.4, p.1001-1012.
- Sneha, A.; Preet, S. Impact of sublethal conventional and biorational larvicidal stress on fitness status in nutritionally challenged *Aedes aegypti* larvae. **Int. J. Mosq. Res.**,v.3, n.1, p.39-46, 2016.
- Souza, T. M.; Menezes, E.S B.; Oliveira, R.V.; Almeida Filho, L.C.P.; Martins, J.M.; Moreno, F.B.; Carvalho, A.F.U. Further evidences for the mode of action of the larvicidal m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds against *Aedes aegypti*. **Acta tropica**, v.152, p.49-55, 2015.
- Temitope, O.O. Morphology and histology of the alimentary tract of adult palm weevil, *Rhynchophorus phoenicis Fabricius* (Coleoptera: Curculionidae), **J. Dev. Biol. Tissue. Eng.**; v. 5, p.13–17, 2013.
- Valotto, C.F.B.; Carvasin, G.; Silva, H.H.G.; Geris, R.; Silva, I.G.D. Alterações Morfo-Histológicas Em Larvas De *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) Causadas Pelo Tanino Catéquico Isolado da Planta do cerrado *Magonia Pubescens* (Sapindaceae), 2010.

Van Handel, E. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* v.1, p.299–301, 1985.

Waliwitiya, R.; Kennedy, C.J.; Lowenberger, C.A. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, transanethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Pest Manag., Sci.** v.65, p.241–248, 2009.

Warikoo, R.; Kumar, S. Impact of *Argemone mexicana* extracts on the tidal, morphological, and behavioral response of dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res.** v. 112, n. 10, p. 3477-3484, 2013.

WHO - World Health Organization. (s.d.). **What is dengue.** Disponível em <http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>. Acesso em 19 fev. 2018.

Zara, A.L.S.A.; Santos, S.M.; Oliveira, E.S.F.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

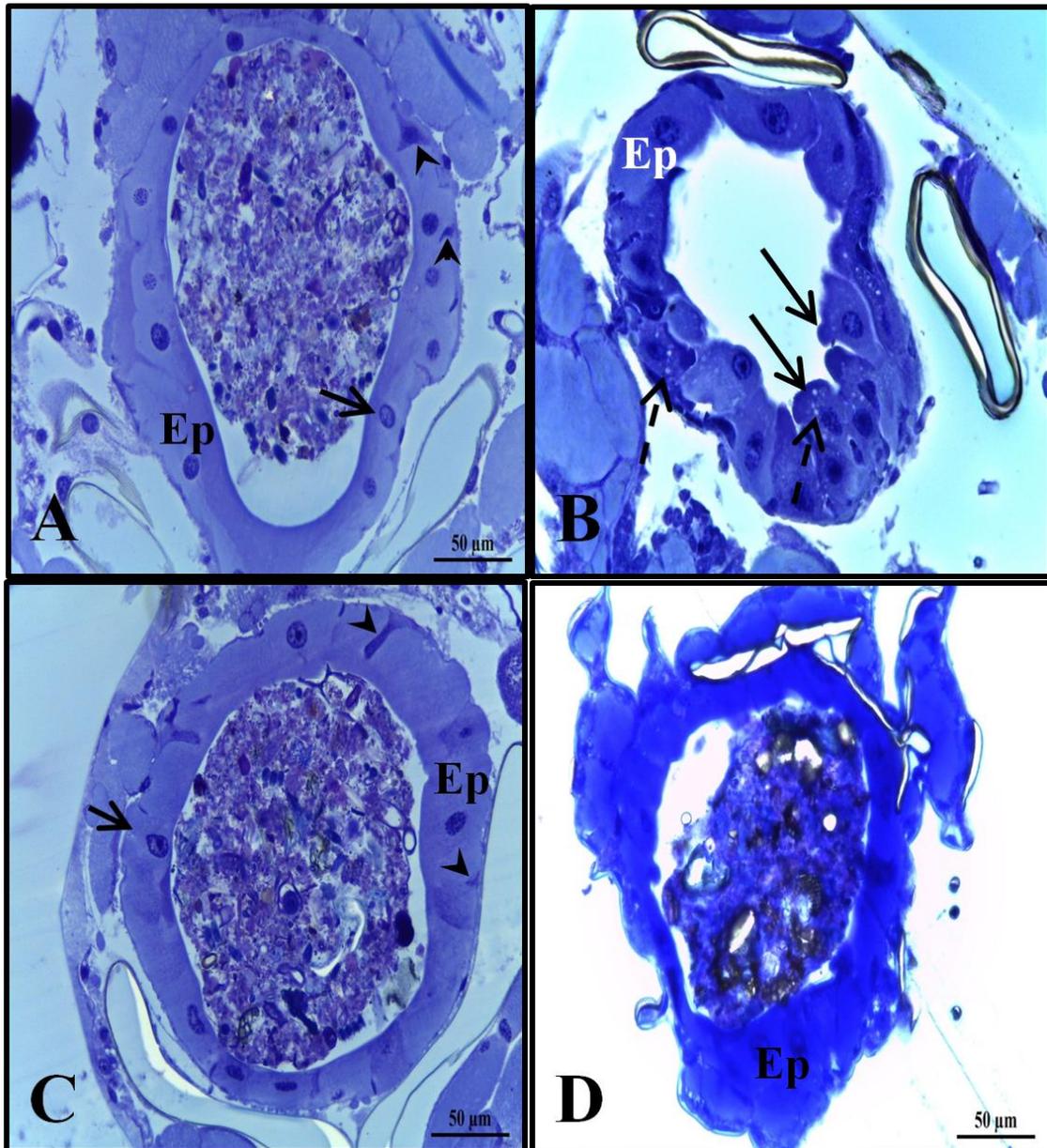


Figura 1: Fotomicrografia do intestino médio de larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. A-C (controle 12 e 24, respectivamente), B (R-limoneno 12h) e D (R-limoneno 24h). Ep: epitélio; seta curta: célula cilíndrica; seta longa: protuberância; ponta de seta: célula regenerativa; seta tracejada: vacúolos citoplasmáticos. Azul de Toluidina.

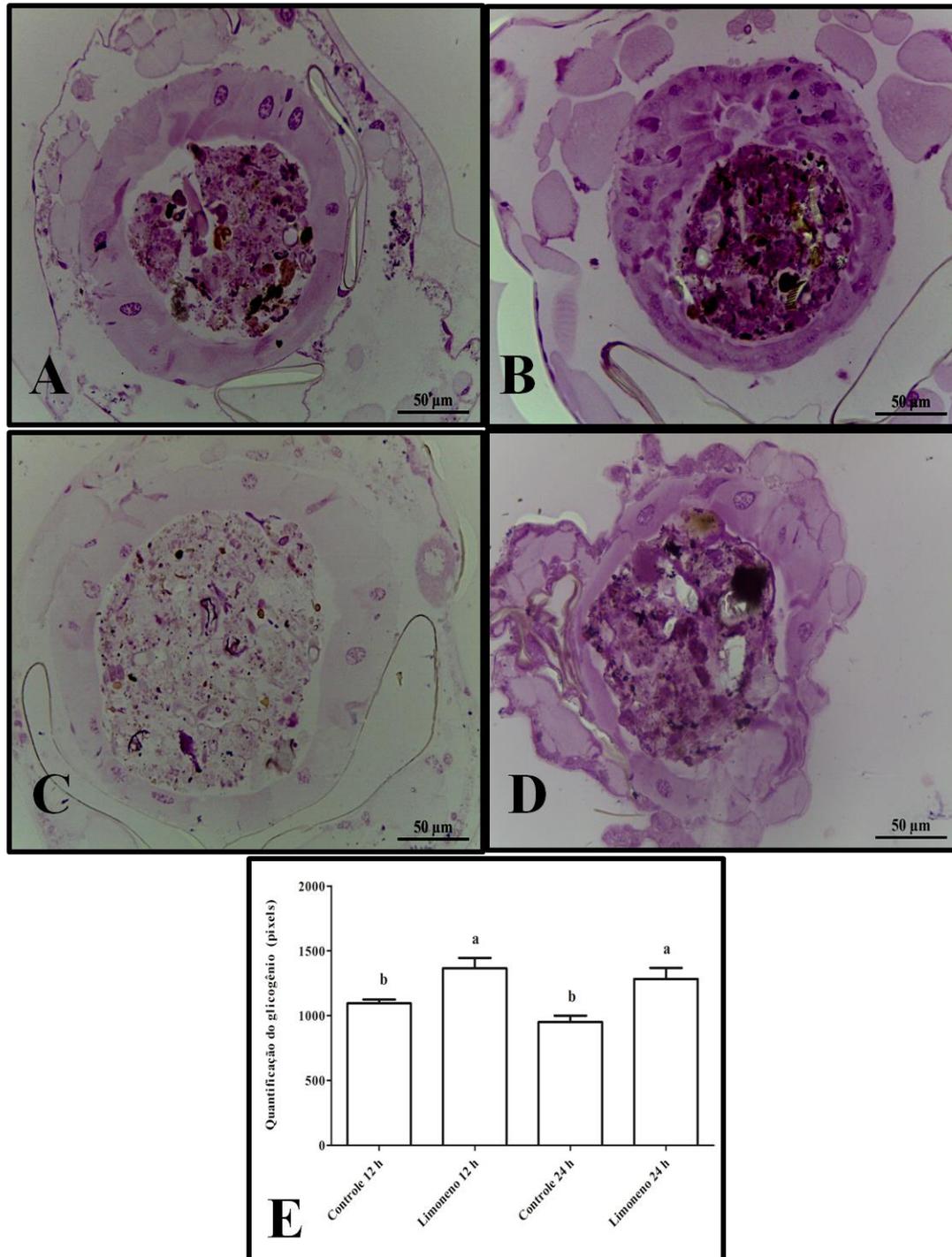


Figura 2: Histoquímica para glicogênio no intestino médio de larvas do 3^o instar de *Aedes Aegypti*. A-C (controle 12 e 24, respectivamente), B (R-limoneno 12h) e D (R-limoneno 24h). Quantificação do glicogênio em pixels (E). Verificar marcação positiva em todos os tratamentos, porém sendo mais intensa nos tratamentos com R-limoneno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). PAS.

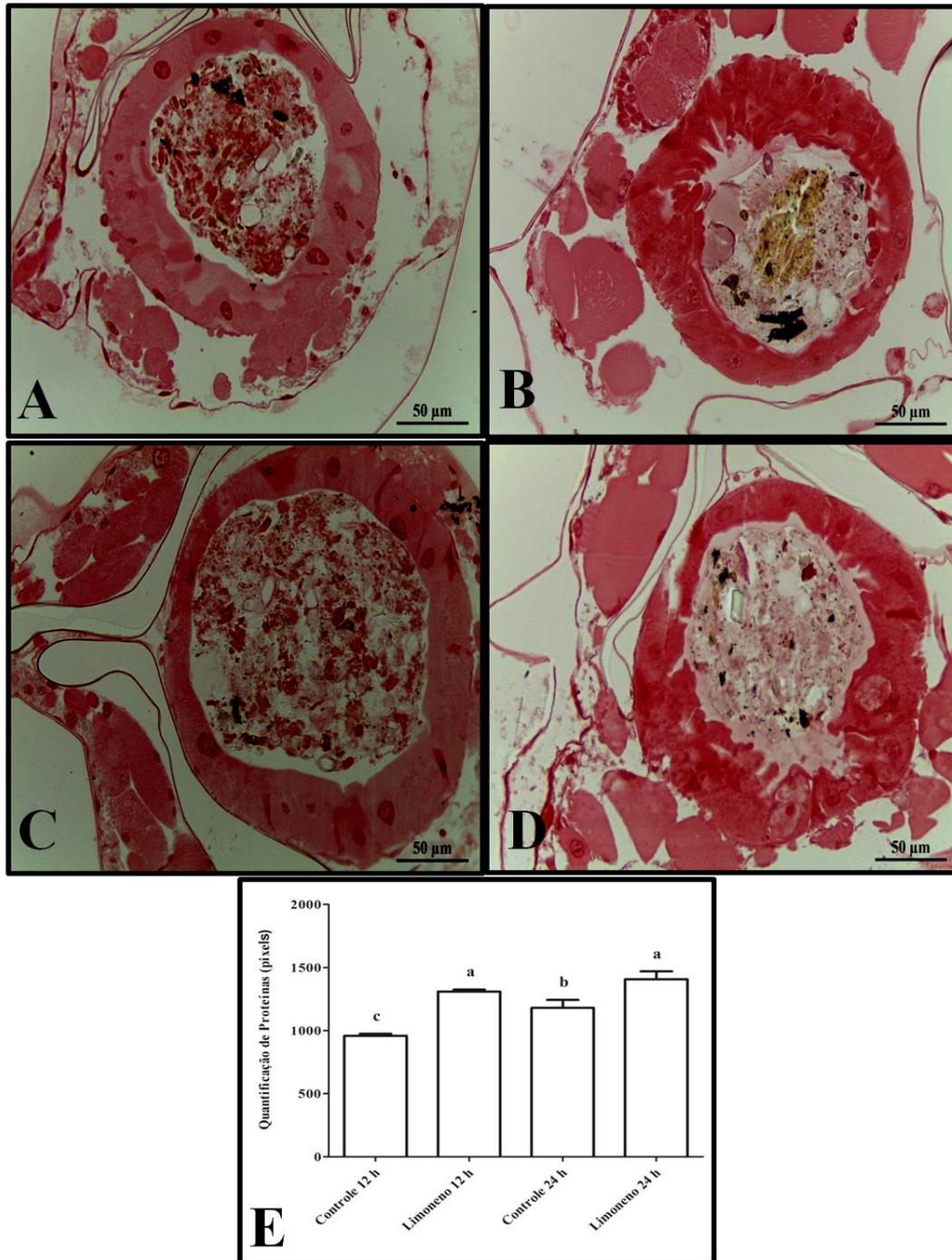


Figura 3: Histoquímica para proteína total no intestino médio de larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. A-C (controle 12 e 24, respectivamente), B (R-limoneno 12h) e D (R-limoneno 24h). Quantificação de proteína total em pixels (E). Verificar marcação positiva em todos os tratamentos, porém sendo mais intensa nos tratamentos com R-limoneno, e menos no controle 12 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). xilidina Ponceau.

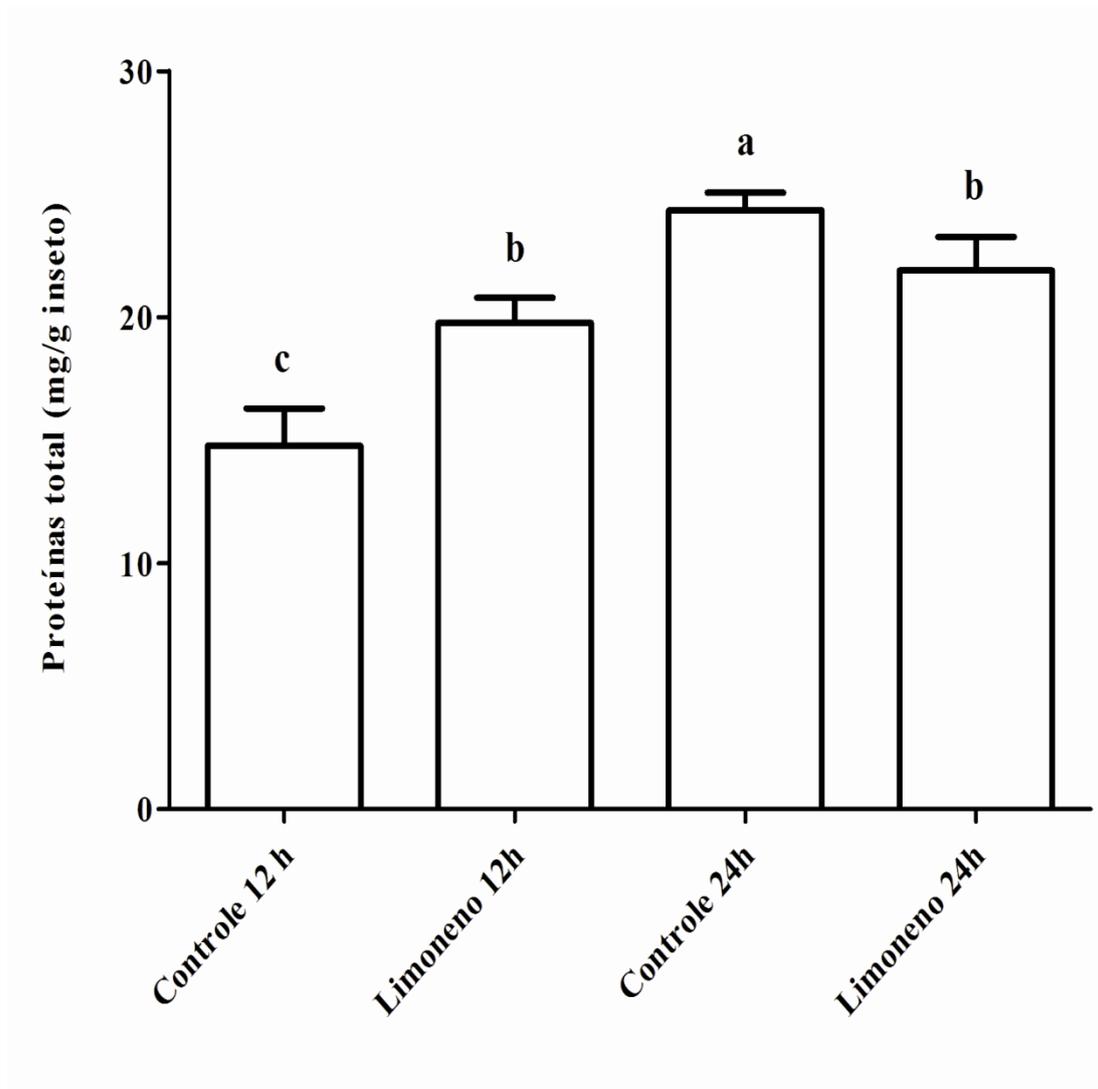


Figura 4: Bioquímica para proteína total em larvas do 3^o instar de *Aedes Aegypti*. Verificar aumento dos níveis de proteína total nas larvas tratadas com R-limoneno em relação ao controle 12 h e redução em relação ao controle 24 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

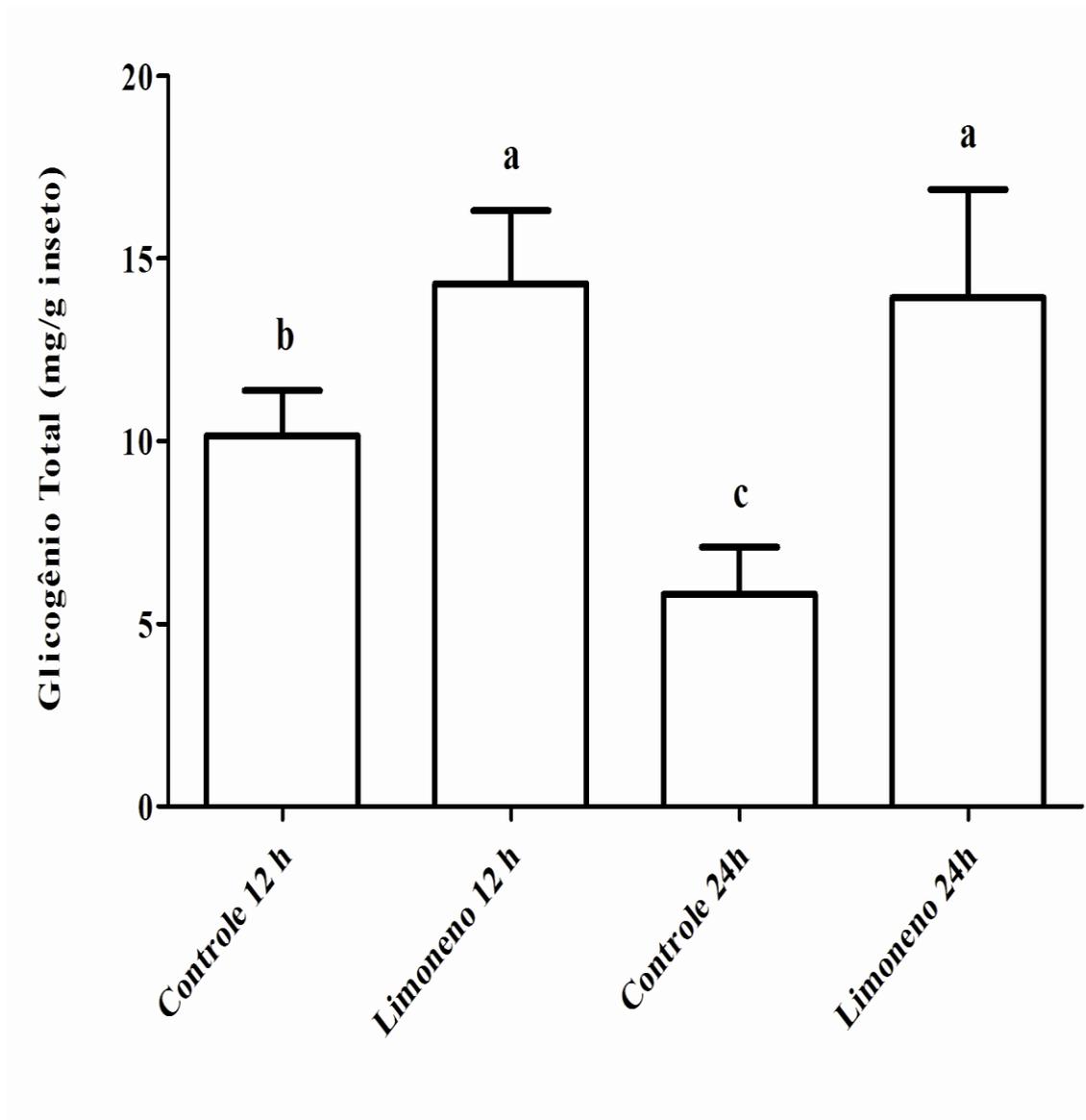


Figura 5: Bioquímica para glicogênio em larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. Verificar aumento dos níveis de glicogênio nas larvas tratadas com R-limoneno em relação aos controles 12 e 24 h. Entre os controle houve redução desse nutriente com 24 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

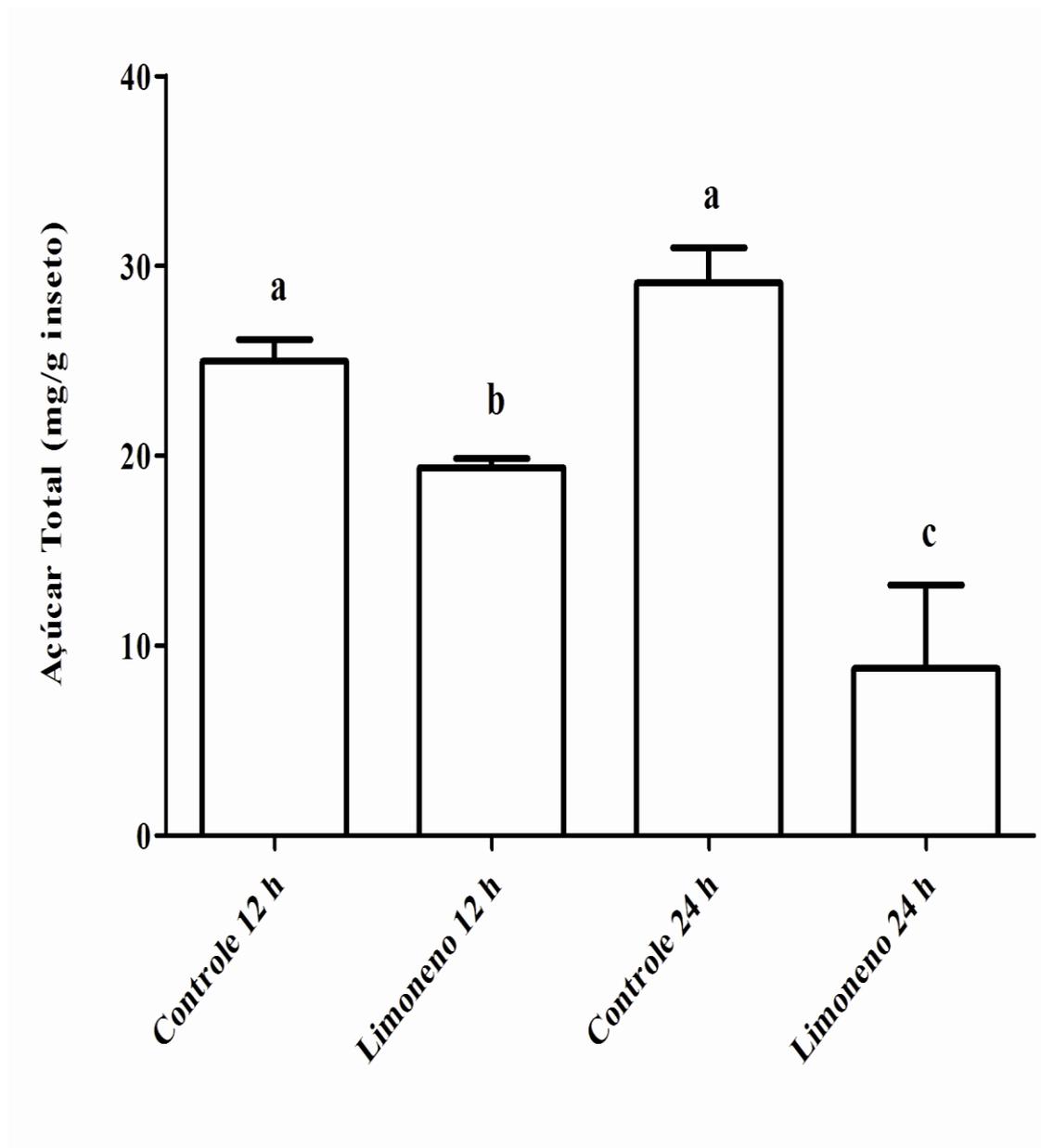


Figura 6: Bioquímica para açúcar total em larvas do 3º instar de *Aedes Aegypti*. Verificar redução significativa dos níveis de açúcar total nas larvas tratadas com R-limoneno em relação aos controles 12 e 24 h, sendo mais efetiva nesse último período. O controle 24 h apresentou o maior nível, porém sem diferir de 12 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).