



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina

Renata Garcia Dusi

Desenvolvimento de protótipos de biopesticidas a partir
do alho para o controle vetorial de *Aedes aegypti*

Brasília
2022

Renata Garcia Dusi

Desenvolvimento de protótipos de biopesticidas a partir
do alho para o controle vetorial de *Aedes aegypti*

Texto apresentado como requisito
para defesa de tese de Doutorado do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a Laila Salmen Espindola

Brasília
2022

Renata Garcia Dusi

Desenvolvimento de protótipos de biopesticidas a partir do alho para o controle vetorial de *Aedes aegypti*

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. LAILA SALMEN ESPINDOLA – Presidente
Universidade de Brasília

Profa. Dra. ELOISA DUTRA CALDAS
Universidade de Brasília

Profa. Dra. NADJAR NITZ SILVA LOCIKS DE ARAUJO
Universidade de Brasília

Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. PAULO CEZAR VIEIRA – Suplente
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Ao Raynner,
com toda minha admiração.

“Na natureza, nada existe sozinho.”

Rachel Carson

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao projeto ArboControl que através do TED 74/2016 e 42/2017 financiou este projeto de pesquisa. À Universidade de Brasília pela estrutura de pesquisa. À University of East Anglia (UEA) que me recebeu brevemente durante o período sanduíche durante o programa CAPES PrInt, à qual também agradeço pela bolsa (processo 88887.468815/2019-00) e auxílio. Ao programa Ciência sem Fronteiras (no qual fui bolsista CNPq na graduação) que permitiu que eu entrasse em contato com a linha de pesquisa que adotei no meu doutorado: trabalhar com o alho.

À Professora Laila Salmen Espindola pelas oportunidades que contribuíram para minha formação e por permitir que eu desenvolvesse minha tese com independência. I wish to thank Dr. Chris J. Hamilton for the outstanding discussions and for introducing me to garlic world and its endless applications.

Ao Professor Marcelo de Oliveira Rodrigues por me apresentar os nanomateriais e a inovação na universidade, e por acreditar no meu trabalho quando eu duvidei.

À Professora Lorena Carneiro Albernaz pela coordenação do insetário para que estivessem disponíveis os insetos para teste e pela ajuda nos testes em Aedes.

Ao Professor João Paulo Souza pelo auxílio nas análises de quantificação por HPLC.

Ao Professor Sebastião Melo pela ajuda na síntese completa do novo composto tiolado.

À todos os pesquisadores, estudantes e estagiários que passaram pelo Laboratório de Farmacognosia sempre cooperando para o desenvolvimento das atividades e crescimento da equipe. À Dra. Haline Alvim que foi essencial na reta final do trabalho para o desenvolvimento das formulações e escalonamento para o teste em campo. À Msc. Laís Morais pela parceria ao longo do trabalho, ajudando com a mão na massa em diversos experimentos ou discutindo uma série de resultados e novas ideias. À Msc. Natália Magalhães pelos testes em mosquitos adultos. À Lecir Nascimento por ter resolvido as questões burocráticas, contratação de serviços e compras necessários para que este projeto fosse realizado. Ao Renato Guedes e Ismael Driano pela manutenção da colônia de mosquitos e por auxiliarem na montagem de incontáveis experimentos. À Dra. Raquel Silva, Msc. Sophia Grossi, Msc. Heidi Schulte e Msc. Paula Correa pela disponibilidade em sempre ajudar. Ao Dr. Thiago Bandeira pela disponibilidade na tentativa de extrair o óleo de alho e por tentar desenvolver um script para agilizar os testes ovicidas. Ao Dr. Daniel Demarque por compartilhar muito conhecimento e incentivar o meu trabalho. À Dra. Patrícia Cortello pelas análises quimiométricas que permitiram a publicação de um artigo em colaboração. Ao Dr. Carlos Eduardo por se responsabilizar pelas vistorias semanais de armadilhas no teste em campo. Ao Dr. Luiz Eduardo Benedito pelos espectros de RMN e pelas análises por CG.

Ao Dr. Diego Moura e ao Prof. César Koppe Grisólia do Instituto de Biologia da UnB pelos testes em peixe zebra. Ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (LTMAC), em especial às estudantes Jéssica, Camila e Luma, por disponibilizar o zetasizer que permitiram a avaliação das formulações. À Dra. Ana Cristina Gomes do Laboratório de Microscopia, no Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa pela disponibilidade em fazer as fotos das larvas em lupa de fluorescência. Ao Mark Bentley da University of East Anglia pela ajuda no processo burocrático na UEA para que pudesse iniciar o período sanduíche na universidade. À Stella Kounadi

e Carine Enjema pelas discussões científicas e por me recepcionarem no laboratório na UEA.

Gostaria de agradecer todo o apoio emocional e afetivo que recebi do meu companheiro de vida Raynner Parente ao longo de toda essa longa jornada. Aos meus pais, Rúbia e Roberto por terem sido minha grande fortaleza nos momentos mais felizes e nos mais desafiadores. Ao meu irmão, Ramon, por termos permanecido juntos quando não tínhamos mais ninguém. À todos os meus familiares, de sangue e do coração, que compõem uma rede de proteção que me permite avançar frente aos infinitos desafios da vida. Aos amigos queridos que encontrei em diferentes momentos da vida que proporcionaram momentos alegres e transformaram essa jornada em algo muito mais leve.

Como diz o provérbio africano: “É preciso uma aldeia inteira para se educar uma criança”, imagina até chegar ao doutorado... Existem muitas pessoas envolvidas em uma tese de doutorado, algumas atuam em bastidores que sequer tenho conhecimento que existem. Agradeço à todas as pessoas que eu não consigo nomear, mas que reconheço que tiveram participação direta ou indireta nesta tese.

Desenvolvimento de protótipos de biopesticidas a partir do alho para o controle vetorial de *Aedes aegypti*

RESUMO

O alho (*Allium sativum* L. - Amaryllidaceae) é um condimento culinário utilizado há séculos por diversas populações. Neste trabalho foi investigado o potencial do uso do alho para o controle do mais importante vetor de arboviroses no Brasil, o mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). O óleo de alho sintético comercial foi caracterizado utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV, 210 nm). O óleo de alho foi testado em ovos, larvas, pupas e mosquitos adultos para determinação da atividade inseticida e repelente. Ensaios pupicida e larvicida em diferentes recipientes e a monitorização na solução teste foram realizados para aferir o efeito da volatilização do óleo de alho na atividade. Os compostos majoritários do óleo de alho foram isolados, testados em larvas e pupas e utilizados para enriquecimento do óleo de alho, que foi avaliados para determinação da melhor composição para atividade larvicida e pupicida. Teste em condições de semi-campo foram realizados para larvas e pupas, e um protocolo de atividade repelente espacial em escala ampliada foi desenvolvido e testado com o óleo de alho. Nanoemulsões de óleo de alho com CDots (nanopartículas de carbono), foram desenvolvidas e avaliadas em diferentes condições de temperatura ao longo de três meses. A nanoemulsão com melhor estabilidade foi escalonada em reator químico piloto e submetida a teste em campo no Instituto Central de Ciências da UnB após avaliação em testes de toxicidade. O óleo de alho utilizado é composto majoritariamente por trissulfeto (63,0%) e dissulfeto (26,7%) de dialila. A CL₅₀ do óleo de alho foi de 1,6 ppm em larvas em 24 h, chegando a menos de 1,0 ppm em 72 h, e de 20,3 ppm em pupas. O tipo de recipiente utilizado nos experimentos altera significativamente a atividade larvicida devido às diferentes taxas de volatilização. A potente atividade larvicida e pupicida se repetiram nos ensaios em condições de semi-campo. O óleo de alho foi capaz de matar e repelir os insetos adultos no teste repelente espacial em condições de campo. Ensaios em peixe-zebra demonstraram que o óleo de alho tem potencial embriotóxico nas concentrações mais altas, com CL₅₀ de 60.7 ppm. O uso de CDots nas nanoemulsões desenvolvidas conferiu homogeneidade à formulação, e permitiram sua solubilidade em água. As nanoemulsões desenvolvidas foram estáveis à temperatura ambiente e em geladeira, e aquelas mais promissoras mantiveram ou incrementaram a atividade ovicida, larvicida e pupicida do óleo de alho. A avaliação toxicológica da formulação sugere um perfil de segurança adequado, de baixa toxicidade oral, dérmica e ocular. No estudo preliminar de campo o produto chegou a causar uma redução pontual de 60% da quantidade de fêmeas de *Ae. aegypti* na área tratada em relação à área não tratada. O potencial da nanoformulação desenvolvida para o controle vetorial do *Ae. aegypti* precisa ser melhor investigado em um estudo mais amplo que inclua também uma avaliação estatística dos resultados.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, controle vetorial, óleo de alho, *Allium sativum*, trissulfeto de dialila, bioinseticida, nanoemulsão, Carbon dots, teste em campo

Garlic-derived biopesticides development for *Aedes aegypti* vector control

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L. - Amaryllidaceae) is a culinary condiment used for centuries by different populations. In this work, the potential of garlic to control the most important vector of arboviruses in Brazil, the *Aedes aegypti* L. mosquito (Diptera: Culicidae) was investigated. A commercial synthetic garlic oil was characterized using gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) and high performance liquid chromatography (HPLC-UV, 210 nm). Garlic oil was then tested on eggs, larvae, pupae and adult mosquitoes to determine insecticidal and repellent activity. Pupicidal and larvicidal assays with garlic oil in different containers and monitoring of the test solutions were performed to assess the effect of garlic oil volatilization on the activity. Garlic oil major compounds were isolated, tested on larvae and pupae and used to enrich garlic oil, which was evaluated to determine the best composition for larvicidal and pupicidal activity. Tests under semi-field conditions were carried out for larvae and pupae, and a large-scale spatial repellent activity protocol was developed for garlic oil testing. Garlic oil nanoemulsions were developed with Carbon dots (CDots) and evaluated during storage under different temperature conditions over three months. The nanoemulsion with the best stability was scaled up in a chemical reactor and subjected to a preliminary field testing at the Instituto Central de Ciências at UnB after toxicological evaluation. The garlic oil used is mainly composed of diallyl trisulfide (63.0%) and disulfide (26.7%). The LC₅₀ of garlic oil was 1.6 ppm in larvae in 24 h, reaching less than 1.0 ppm in 72 h, and 20.3 ppm in pupae. The type of container used in the experiments significantly alters the larvicidal activity due to the different rates of oil volatilization. The potent larvicidal and pupicidal activity were replicated under semi-field conditions. Garlic oil was able to kill and repel adult insects, including under field conditions. Zebrafish toxicological assay showed that garlic oil was embryotoxic only at the highest concentrations, with a LC₅₀ of 60.7 ppm. The use CDots in the nanoemulsions conferred homogeneity and water solubility. Formulations maintained the activity of garlic oil and allowed its solubility in water. The nanoemulsions were stable at room temperature and under refrigeration, and the most promising maintained or increased the ovicidal, larvicidal and pupicidal activity of garlic oil. Toxicological evaluation of the formulation suggests an adequate safety profile of low oral, dermal and ocular toxicity. In the preliminary field study, the product caused a point reduction of 60% in the number of females of *Ae. aegypti* in the treated area relative to the untreated area. The potential of the nanofurmulation developed in this study for the *Ae. Aegypti* vector control needs further studies that should also include a statistical analysis of the results.

Keywords: *Aedes aegypti*, vector control, garlic oil, *Allium sativum*, diallyl trissulfide, bioinsecticide, nanoemulsion, Carbon dots, field trial

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ArboS187 – Óleo de alho sintético
CCD – Cromatografia em camada delgada
CDCl₃– Clorofórmio deuterado
CDot – Carbon dots
CL₅₀ – Concentração letal média
DAS – Sulfeto de dialila
DAS2 – Dissulfeto de dialila
DAS3 – Trissulfeto de dialila
DAS4 - Tetrassulfeto de dialila
DAS5 - Pentassulfeto de dialila
DAS6 – Hexassulfeto de dialila
DAPS – Polissulfetos de dialila
DL₅₀– Dose letal média
DMF– Dimetilformamida
DMSO– Dimetilsufóxido
GC-MS – Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
HITSS - High-Throughput Screening System
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IC₉₅ – Intervalo de Confiança no nível 95%
ICC – Instituto Central de Ciências
IMFA – Índice Médio de Fêmeas Adultas de *Aedes aegypti*
IPM – Índice de Positividade da Mosquitrap
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
PRESP – Percentual Response
SAI – Spatial Activity Index
wSAI – weighted Spatial Activity Index

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i> . Fonte: Arquivo do Laboratório de Farmacognosia/UnB..... | 14 |
| Figura 2. Registro fotográfico da morfologia de pupas do sexo feminino e masculino. | 17 |
| Figura 3. Montagem dos recipientes de teste. Diluição da amostra em balão volumétrico, separação e contagem de larvas e pupas e fechamento dos recipientes com tecido..... | 45 |
| Figura 4. Contagem de ovos nas seções de papéis de oviposição utilizando software ImageJ..... | 48 |
| Figura 5. Desenho esquemático de um high-throughput screening system (HITSS). | 49 |
| Figura 6. Esquema de experimento de repelência espacial em condições de semi-campo. A sala 1, onde encontra-se um difusor com óleo de alho, é conectada à sala 2, em que somente é dispersada água, através de um tubo (em azul) (DUSI et al., 2022)..... | 52 |
| Figura 7. Planta piloto para escalonamento industrial das nanoformulações desenvolvidas..... | 56 |
| Figura 8. Estrutura química dos polissulfetos mais abundantes no óleo de alho. | 61 |
| Figura 9. Alteração da coloração do óleo de alho ArboS187 durante e ao final da reação..... | 63 |
| Figura 10. Cromatograma HPLC-UV a 210 nm do óleo de alho original e modificado mostrando a alteração do perfil cromatográfico, com volume de injeção e concentração constantes..... | 63 |
| Figura 11. Atividade larvicida do óleo de alho ArboS187 (original) e Arbo2A170A (modificado). No gráfico estão representados a média de mortalidade e erro padrão da média para cada tratamento nos diferentes tempos. C Neg: DMSO < 2%; n = 3. | 64 |
| Figura 12. Cromatogramas de HPLC-UV a 210 nm do óleo de alho e respectivos polissulfetos isolados. | 65 |
| Figura 13. A: Espectros de ¹ H NMR do óleo de alho e polissulfetos em CDCl ₃ . A: De cima pra baixo: óleo de alho, dissulfeto de dialila (DAS2); trissulfeto de dialila (DAS3); tetrassulfeto de dialila (DAS4); pentassulfeto de dialila (DAS5). B: Espectros de ¹ H NMR de óleo de alho e polissulfetos na região de 3,30 a 3,70 ppm..... | 66 |
| Figura 14. Espectros sobrepostos de NMR ¹ H (em CDCl ₃) dos compostos de alho isolados com enfoque na região de 3,30 ppm a 3,70 ppm. O sinal em vermelho, com deslocamento de 3,33 ppm é do DAS2; enquanto o verde de deslocamento 3,50 ppm é referente ao DAS3. DAS4 e DAS5 possuem deslocamentos mais próximos, a 3,58 ppm e 3,61 ppm (linhas azul e roxo), respectivamente..... | 67 |
| Figura 15. Espectros sobrepostos de NMR ¹ H (em CDCl ₃) dos compostos de alho isolados com seus respectivos padrões comerciais. | 67 |
| Figura 16. Cromatogramas de HPLC-UV a 210 nm do óleo de alho e dos polissulfetos 2 h após diluição em DMSO à temperatura ambiente..... | 69 |
| Figura 17. Percentual de polissulfetos nas amostras de DAS4 e ArboS187 após diluição em metanol, DMSO e DMSO-d ₆ | 70 |
| Figura 18. Percentual de DAS4 após diluição em 1%, 10%, 25% e 50% de DMSO e em metanol à temperatura ambiente..... | 71 |
| Figura 19. Percentual de DAS4 após diluição em metanol, DMSO 50%, DMF 50% (Sigma-Aldrich) e DMF (JT Baker)..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| Figura 20. Teste de pupas testadas com piriproxifeno de 0,0001 ppb a 200 ppm, após eclosão de todos os mosquitos. | 76 |
| Figura 21. Fotos das alterações observadas nas pupas tratadas com concentrações intermediárias de óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022). | 77 |
| Figura 22. Foto da comparação entre uma pupa sadia do controle (esquerda) e de uma pupa morta após tratamento com óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022).. | 78 |
| Figura 23. Gráficos resultantes da regressão probit da atividade larvicida de ArboS187 nos diferentes recipientes após 24, 48 e 72 h de exposição. Copo20: copo com 20 mL de solução; Copo200: copo com 200 mL de solução; PlacaCT: placa com tampa; PlacaST: placa sem tampa. | 80 |
| Figura 24. Gráficos resultantes da regressão não linear da atividade larvicida de ArboS187 nos diferentes recipientes após 24, 48 e 72 h de exposição. Laranja: copo com 20 mL de solução; Vermelho: copo com 200 mL de solução; Verde claro (quadrado): placa com tampa; Verde escuro (triângulo): placa sem tampa; n = 12... | 81 |
| Figura 25. Mortalidade de larvas tratadas com 2,4 ppm do óleo de alho ArboS187 em diferentes volumes e densidade de larvas (L); n=3..... | 85 |
| Figura 26. Área de pico de DAS3 nos diferentes recipientes após concentração do óleo de alho em cartuchos de SPE C ₁₈ . Diferença estatística expressa em relação ao Copo200: ****: p < 0,0001; *: p < 0,05. PLACACT: Placa com tampa; PLACAST: Placa sem tampa. | 86 |
| Figura 27. Valores da concentração letal média (CL ₅₀) para os polissulfetos isolados, óleo de alho ArboS187 e óleos de alho suplementados com polissulfetos em larvas de <i>Ae. aegypti</i> após 24 h (A), 48 h (B) e pupas (C). Significância estatística (valor de p) relacionados à atividade do óleo de alho ArboS187. *: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01; ***: p ≤ 0.001; ****: p ≤ 0.0001. OA: Óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022) | 89 |
| Figura 28. Percentual da área dos polissulfetos determinados por HPLC-UV a 210 nm em diferentes tempos. A: Polissulfetos isolados; B: Composição dos óleos de alho no tempo 0; C: Composição dos óleos de alho após 72 h. GO – Óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022). | 92 |
| Figura 29. Resultado do teste pupicida em condições de campo com o óleo de alho ArboS187. C Neg: controle negativo DMSO 0,012%. n = 12..... | 93 |
| Figura 30. Resultado do teste larvicida em condições de campo com o óleo de alho ArboS187. C Neg: controle negativo composto por DMSO 0,012% (n=12). | 94 |
| Figura 31. Resposta dos mosquitos (escape e não escape, associado a <i>knockdown</i> (KD) ou sobrevivência) após contato com o óleo de alho ArboS187 por irritação por contato. n=6..... | 100 |
| Figura 32. Gráfico “overview” do teste de embriotoxicidade do óleo de alho ArboS187. CS: controle solvente. | 102 |
| Figura 33. Fotodocumentação de embriões de peixe-zebra “normal” (0 ppm) e um embrião com atraso no desenvolvimento, exposto por 24 h à concentração de 59,2 ppm do óleo de alho ArboS187..... | 103 |
| Figura 34. Fotodocumentação dos embriões de peixe-zebra expostos por 72 h às concentrações de 0 ppm (controle negativo), 30 ppm e 59,2 ppm do óleo de alho ArboS187. a: edema; b: alteração na absorção do saco vitelínico; c: malformação da cauda. | 103 |
| Figura 35. Fotodocumentação dos embriões de peixe-zebra expostos por 96 h às concentrações de 0 ppm (controle negativo) e 30 ppm do óleo de alho ArboS187. a: edema; b: alteração no saco vitelínico; c: curvatura anormal na cauda..... | 104 |

| | |
|--|-----|
| Figura 36. Curva de dose resposta (parâmetro: mortalidade) para o óleo de alho ArboS187. A CL ₅₀ 96 hpf (h pós-fertilização) = 60,7 ppm, Modelo: Sigmoide 4 parâmetros, R ² : 0,99, p < 0,001. | 104 |
| Figura 37. Carbon dot (CDot) em pó, em solução aquosa e em solução aquosa sob luz UV. | 106 |
| Figura 38. Fotomicrografia de fluorescência de larvas de Ae. aegypti tratadas com Cdot. Na esquerda uso do filtro REDx e na direita filtro GFP. As imagens foram sobrepostas usando o software ImageJ. | 107 |
| Figura 39. Copos do teste pupicida em diluição seriada com soluções de óleo de alho ArboS187 e CDot (da segunda ate última fileira de copos) e DMSO (copos na extrema esquerda). | 108 |
| Figura 40. Comparação da curva dose resposta em pupas de Ae. aegypti de ArboS187 com e sem CDot. | 108 |
| Figura 41. Teste de formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot em pó. Esquerda: 1 ^a reação. Direita: 2 ^a reação. | 109 |
| Figura 42. Frasco contendo emulsão de CDot líquido 2 com mudança de coloração ao longo do tempo de reação. | 116 |
| Figura 43. Formulações após diluição em água e repouso. Esquerda: formulação com precipitação. Direita: formulação estável sem precipitação. | 116 |
| Figura 44. Características das formulações escalonadas com CDot líquido 1 após estocagem sob diferentes condições de temperatura. TA Claro: temperatura ambiente em frasco translúcido; TA Âmbar: temperatura ambiente em frasco âmbar. Tamanho em nm; potencial Zeta em mV. | 119 |
| Figura 45. Características das formulações escalonadas com CDot líquido 2 após estocagem sob diferentes condições de temperatura. TA: temperatura ambiente. Tamanho em nm; potencial Zeta em mV. | 120 |
| Figura 46. Espectros de absorção UV/VIS das formulações e de seus reagentes isoladamente. Nanoformulação 1: formulação de óleo de alho com CDot em pó; Nanoformulação 2: formulação de óleo de alho com CDot líquido 1; Nanoformulação 3: formulação de óleo de alho com CDot líquido 2. | 122 |
| Figura 47. Perfil cromatográfico em HPLC-UV a 210 nm do óleo ArboS187 usado na formulação escalonada (superior) e do óleo de alho usado no escalonamento (inferior). | 125 |
| Figura 48. Características da formulação escalonada (ArboS187 e CDot liquido 2) em reator após estocagem sob temperatura ambiente. Tamanho em nm; potencial Zeta em mV. | 126 |
| Figura 49. Mapa do posicionamento de todas as armadilhas instaladas no ICC da Universidade de Brasília. | 131 |
| Figura 50. Pluviosidade e número de fêmeas de Ae. aegypti capturadas nas semanas epidemiológicas 5 (30/01 a 05/02/2022) a 22 (29/05 a 04/06/2022). | 132 |
| Figura 51. Temperatura ambiente mínima e máxima, e número de fêmeas de Ae. aegypti capturadas nas semanas epidemiológicas 5 (30/01 a 05/02/2022) a 22 (29/05 a 04/06/2022). | 133 |
| Figura 52. Variação do Índice Médio de Fêmeas Adultas de Aedes aegypti (IMFA) nas semanas epidemiológicas 5 a 22. A zona vermelha representa IMFA crítico (>0,6), em laranja a zona de alerta, em amarelo a zona de IMFA moderado e em verde a zona satisfatória. Tratamento feito nas semanas de 10 a 13. | 136 |
| Figura 53. Variação do Índice de Positividade da Mosquitrap (IPM) nas semanas epidemiológicas 5 a 20. Tratamento realizado nas semanas de 10 a 13. | 137 |

Figura 54. Variação do Índice de Positividade da Mosquitrap (IPM) e do IMFA nas semanas epidemiológicas 5 a 20. Tratamento realizado nas semanas de 10 a 13. 137

Figura 55. Variação da quantidade de mosquitos capturados durante o estudo de campo. A: todos os mosquitos; B: *Ae. aegypti* machos; C: *Ae. albopictus* fêmeas; D: *Ae. albopictus* machos; E: *Culex* sp. fêmeas; F: *Culex* sp. machos.138

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Parâmetros utilizados para os testes de padronização do método de avaliação de atividade larvicida e pupicida. | 45 |
| Tabela 2. Composição do óleo de alho ArboS187 por GC-MS. | 60 |
| Tabela 3. Composição percentual relativa dos polissulfetos de dialila do óleo de alho ArboS187 determinada por GC-MS e HPLC-UV. | 61 |
| Tabela 4. Proporção dos diferentes polissulfetos DAS2, DAS3 e DAS4 em análise por GC-MS (%) e HPLC-UV (proporção de área sob a curva). | 64 |
| Tabela 5. Atividade larvicida do óleo de alho ArboS187 nos diferentes recipientes determinada por regressão probit no R Studio. | 79 |
| Tabela 6. Atividade larvicida de ArboS187 em diferentes recipientes por análise de regressão não linear no GraphPad Prism. | 80 |
| Tabela 7. Atividade larvicida de temefós em diferentes recipientes. | 83 |
| Tabela 8. Atividade pupicida do óleo de alho ArboS187 nos diferentes recipientes determinada por regressão probit no R Studio. | 83 |
| Tabela 9. Percentual dos polissulfetos nos diferentes recipientes em relação à área de pico inicial (HPLC-UV, 210 nm). | 87 |
| Tabela 10. Percentual da área de pico dos polissulfetos de dialila (DAPS) determinados por HPLC-UV a 210 nm no óleo de alho original e nos óleos de alho suplementados com polissulfetos. | 88 |
| Tabela 11. Parâmetros para preparação das formulações 1 a 13 ArboS187 e CDot em agitador Ultra Turrax a 10.000 rpm. Sistema tensoativo: CDot e polissorbato... | 111 |
| Tabela 12. Parâmetros para a produção das formulações de CDot e óleo de alho ArboS187 14 a 50. | 112 |
| Tabela 13. Parâmetros para preparação das formulações de ArboS187 e CDot líquido 1. | 114 |
| Tabela 14. Parâmetros para preparo das formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot líquido 2. | 115 |
| Tabela 15. Parâmetros usados para o escalonamento de bancada das formulações com de alho de óleo ArboS187 e CDot líquido 1 e 2. | 117 |
| Tabela 16. Atividade larvicida das formulações escalonadas. | 123 |
| Tabela 17. Atividade ovicida das formulações escalonadas. | 124 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 9 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| AEDES AEGYPTI | 11 |
| CICLO DE VIDA | 13 |
| DISTRIBUIÇÃO | 18 |
| ARBOVIROSES | 19 |
| DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES POR MOSQUITOS | 20 |
| DENGUE | 22 |
| ZIKA | 25 |
| CHIKUNGUNYA | 27 |
| FEBRE AMARELA | 28 |
| CONTROLE VETORIAL | 29 |
| CONTROLE QUÍMICO | 30 |
| Inseticida microbiológico: <i>Bacillus thuringiensis</i> | 31 |
| Inseticidas botânicos | 31 |
| RESISTÊNCIA A INSETICIDAS | 32 |
| CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS PARA UM NOVO INSETICIDA PARA CONTROLE VETORIAL .. | 33 |
| ALHO | 35 |
| CARBON DOTS (CDOTS) | 38 |
| OBJETIVOS | 39 |
| OBJETIVO GERAL | 39 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 39 |
| MÉTODOS | 40 |
| SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS E ANÁLISE INSTRUMENTAL | 40 |
| MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE <i>Ae. AEGYPTI</i> ROCKEFELLER | 40 |
| MODIFICAÇÃO DO ÓLEO DE ALHO (SEMI-SÍNTESE) | 41 |
| ISOLAMENTO DOS POLISSULFETOS | 41 |
| AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SOLVENTE NOS POLISSULFETOS ISOLADOS | 42 |
| ATIVIDADE LARVICIDA E PUPICIDA | 43 |
| Efeito do recipiente na atividade larvicida e pupicida | 44 |
| Atividade dos polissulfetos isolados e óleos de alho modificados | 46 |
| Atividade larvicida e pupicida em condições de semi-campo | 47 |
| ATIVIDADE OVICIDA | 47 |
| ATIVIDADE EM ADULTOS | 48 |
| Repelência espacial | 50 |
| Irritação por contato | 51 |
| Toxicidade de mosquitos adultos | 51 |
| Atividade de repelência espacial em condições de semi-campo | 52 |
| AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO ÓLEO DE ALHO ÁRBOS187 – EMBRIOTOXICIDADE DE PEIXE-ZEBRA (<i>DANIO RERIO</i>) | 53 |
| NANOEMULSÕES COM CDOT | 54 |
| Escalonamento em bancada e escala piloto | 55 |
| Estudo de estabilidade das formulações | 56 |

| | |
|---|------------|
| AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA NANOFORMULAÇÃO DE ÓLEO DE ALHO | 57 |
| ENSAIO PRELIMINAR EM CAMPO | 58 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 60 |
| PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO DE ALHO ARBOS187..... | 60 |
| Modificação química do óleo de alho ArboS187 | 62 |
| Isolamento dos compostos do óleo de alho modificado (Arbo2A170A) | 64 |
| EFEITO DE SOLVENTES NOS ESTABILIDADE DE POLISSULFETOS | 68 |
| ATIVIDADE LARVICIDA E PUPICIDA DO ÓLEO DE ALHO ARBOS187 | 73 |
| Efeito dos recipientes na determinação da atividade larvicida e pupicida de ArboS187 | 78 |
| ATIVIDADE LARVICIDA E PUPICIDA DOS POLISSULFETOS ISOLADOS E DOS ÓLEOS DE ALHO ENRIQUECIDOS | 88 |
| TESTES EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO | 93 |
| ATIVIDADE OVICIDA..... | 94 |
| ATIVIDADE DO ÓLEO DE ALHO ARBOS187 EM <i>AE. AEGYPTI</i> ADULTOS | 96 |
| Toxicidade..... | 96 |
| Repelência espacial e irritação por contato..... | 96 |
| ESTUDO DE ECOTOXICIDADE ÓLEO DE ALHO ARBOS187 EM EMBRIÕES PEIXE-ZEBRA (<i>DANIO RERIO</i>) | 102 |
| FORMULAÇÕES DE ÓLEO DE ALHO COM CDOT..... | 106 |
| Nanoemulsões de óleo ArboS187 com CDot em pó..... | 108 |
| Formulações com CDot líquido 1 | 113 |
| Formulações com CDot líquido 2 | 114 |
| Testes de escalonamento em bancada..... | 117 |
| Escalonamento piloto em reator..... | 124 |
| ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM A NANOEMULSÃO DE ÓLEO DE ALHO ARBOS187 COM CDOT LIQUIDO 2 | 127 |
| ENSAIO PRELIMINAR DE CAMPO COM A NANOFORMULAÇÃO DE ÓLEO DE ALHO | 129 |
| CONCLUSÃO | 141 |
| LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO | 143 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 144 |
| ANEXO | 158 |

INTRODUÇÃO

O território brasileiro está infestado pelas duas espécies de *Aedes* de maior importância clínica, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Esses mosquitos, principalmente o *Ae. aegypti*, são vetores das arboviroses dengue, Zika e chikungunya, e colocam todo o país sob risco de infecção, uma vez que, juntos, esses mosquitos ocupam 99% do território brasileiro (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016). A grande infestação por esses mosquitos é responsável por manter surtos regulares de dengue que chegam, com frequência, a mais de 1 milhão de casos por ano no Brasil. 2019 foi o ano com o maior surto de dengue nas Américas, superando 3 milhões de casos, sendo mais de 2 milhões no Brasil (WHO, 2022). O comportamento cíclico dos surtos de dengue já é conhecido e demanda ações da vigilância para detecção dos casos e controle vetorial de mosquitos.

A principal ferramenta para redução do número de casos das arboviroses é o controle vetorial, cujo maior objetivo é reduzir as populações de *Aedes*. Melhorias sócio sanitárias são essenciais para o controle vetorial no Brasil. De acordo com as Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue, Normas e Manuais técnicos, informação, educação e comunicação social são os componentes chave do programa de controle do vetor da dengue no Brasil (BRASIL, 2009). No entanto, o uso de inseticidas tem sido uma estratégia fundamental no combate ao mosquito, tanto do ponto de vista de gestão pública quanto da população (SATOTO et al., 2019; WHO, 2012).

O controle químico hoje utilizado é rotineiramente desafiado pelo desenvolvimento de resistência aos inseticidas utilizados, além do impacto que podem causar em todo o ecossistema (GARCIA et al., 2018; LIU, 2015; SATOTO et al., 2019). Há, portanto, a necessidade urgente de pesquisa e inovação de novos produtos inseticidas eficazes, seguros e sustentáveis que possam atuar em todas as fases de desenvolvimento do mosquito (ovos, larvas, pupas e adultos).

Nos anos de 2015 e 2016, foi detectada a relação entre o Zika vírus e a microcefalia congênita fetal no Nordeste brasileiro (DE OLIVEIRA et al., 2017). Esse fato a OMS a declarar uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional em 2016 (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). Nesse cenário de preocupação mundial, o Ministério da Saúde realizou uma demanda à Universidade de Brasília de

avaliação química e biológica de potenciais produtos inseticidas recebidos pelo órgão. Após a execução de experimentos, produção de relatórios técnicos e reuniões, o governo decidiu não adotar esses produtos, mas subsidiar o desenvolvimento de novas tecnologias para o controle vetorial.

Os produtos naturais são reconhecidos como fonte de novos compostos bioativos com características desejáveis para o desenvolvimento de produtos bioinseticidas. Aliada aos produtos naturais, a nanotecnologia auxilia a superação da principal limitação dos produtos naturais: baixa solubilidade em água. Esta tese de doutorado foi desenvolvida no âmbito do projeto ArboControl, visando o desenvolvimento de biopesticidas nanotecnológicos produzidos a partir de óleo de alho para controle das formas imaturas e adultas de *Ae aegypti*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aedes aegypti

A ordem Diptera (do grego di = duas, pteron = asas), composta principalmente por mosquitos e moscas, tem como característica marcante a presença de asas posteriores modificadas na forma de halteres que funcionam apenas como estabilizadores de voo. Possuem apenas um par de asas funcional, característica que levou ao nome da ordem. No mundo estima-se que existam mais de 150 mil espécies distribuídas em 160 mil famílias. No Brasil foram catalogadas quase 9 mil espécies, mas estima-se que no país habitem mais de 60 mil diferentes espécies desta Ordem (CARVALHO et al., 2012).

Os dípteros são holometábolos, o que significa que passam por metamorfose completa durante seu ciclo de vida. Estão distribuídos em diversos habitats e possuem diversos hábitos alimentares podendo ser hematófagos, predadores, parasitas ou se alimentarem de partes ou substâncias de origem vegetal. Diversas espécies representam motivos de preocupação para a saúde pública por serem vetores de doenças, algumas apresentam relevância econômica por serem polinizadores ou pragas agrícolas, outras detêm importância acadêmica como a *Drosophila melanogaster* por ser um modelo de estudo amplamente empregado por cientistas (CARVALHO et al., 2012).

Esta Ordem é dividida em dois grupos: os dípteros inferiores que contém, dentre outras, as famílias Culicidae (mosquitos) e Psychodidae (flebotomíneos), e o grupo dos Neodiptera que contém as moscas como, por exemplo, a *D. melanogaster* (WIEGMANN et al., 2011).

A família Culicidae está dividida em três subfamílias: Toxorhynchitinae, Anophelinae e Culicinae, das quais as duas últimas tem mosquitos que se tornaram um grande problema de saúde pública. Culicinae, engloba vetores dos seguintes gêneros: *Aedes* (dengue, Zika, chikungunya, febre amarela, dentre outros), *Culex* (filariose e febre do Nilo), *Mansonia* (encefalite Saint Louis), *Haemagogus* (febre amarela silvestre) e *Sabethes* (febre amarela silvestre). A capacidade de vários membros dessa família de se tornarem vetores se dá ao hábito hematófago de fêmeas para maturação de seus ovos. Durante o repasto sanguíneo, pode haver inoculação de vírus, parasitos ou outros patógenos caso a fêmea esteja infectada. O estudo de

mosquitos tomou atenção da área científica somente após a confirmação, no fim do século XIX, de que estes participavam do ciclo de transmissão de algumas doenças (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Sistemáticamente, o *Aedes aegypti* é classificado na Ordem Diptera, família Culicidae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e espécie *Aedes aegypti*.

O mosquito *Aedes aegypti* foi identificado pela primeira vez pelo naturalista Fredrik Hasselqvist, discípulo do renomado Carl Linnaeus, durante expedição no Egito, que inspirou o nome da espécie. A palavra *Aedes* deriva do grego antigo que significa desagradável, odioso (POWELL; TABACHNICK, 2013). O ancestral do *Ae. aegypti* domesticado vivia na África, aproveitando a água acumulada em ocos nos troncos de árvore como habitat para as larvas e utilizando animais silvestres para o repasto sanguíneo. Essa forma ancestral ainda existe em seu habitat natural na África e é reconhecida como a subespécie *formosus*. Além do diferente comportamento, essa subespécie tem a coloração mais escura do que se reconhece no *Ae. aegypti* domesticado, conhecida como a subespécie *Ae. aegypti aegypti* (POWELL; TABACHNICK, 2013).

Sabe-se que as linhagens que hoje colonizam as Américas partiram da África em navios durante as Grandes navegações e chegaram às Américas quase concomitantemente aos europeus. As longas viagens exigiam o transporte de grande quantidade de água doce, que criavam o perfeito habitat para o mosquito. Não se sabe, porém, se a domesticação do mosquito ocorreu por conta das longas expedições marítimas que selecionaram os mosquitos adaptados aos seres humanos ou se essas linhagens já haviam sido domesticadas. Seguindo a segunda hipótese, a pressão ambiental durante a formação do deserto do Saara teria alterado a disponibilidade de água obrigando o *Ae. aegypti* a se estabelecer próximo aos assentamentos humanos na África (POWELL; TABACHNICK, 2013).

Segundo dados de sequenciamento genético, a espécie encontrada nas Américas deriva diretamente da África, enquanto os mosquitos hoje encontrados na Ásia e no Pacífico derivam das linhagens americanas. É interessante notar, porém, que as linhagens fora da África são monofiléticas, o que significa que todas derivam de um evento de domesticação de uma linhagem única que se espalhou por todo o mundo. A domesticação pode ter alterado a competência vetorial uma vez que populações da subespécie *formosus* tem menor capacidade de transmissão tanto de dengue quanto de febre amarela. O comportamento de oviposição das fêmeas, porém, ainda segue adaptado a condições naturais uma vez que os ovos são

posicionados acima da linha d'água e permanecem quiescentes até sua completa submersão. Esse comportamento está adaptado a uma imprevisível disponibilidade de água nos ambientes naturais, permitindo que os ovos só se desenvolvam em um cenário de abundância hídrica (POWELL; TABACHNICK, 2013).

Ciclo de vida do Ae. aegypti

O mosquito *Ae. aegypti* é holometábolo, o que significa que sofre metamorfose completa durante seu ciclo de vida, que dura em torno de 10 a 15 dias a depender de condições ambientais. O ciclo de vida é dividido em quatro estágios: ovo, quatro instar larvais, pupa e adulto (Figura 1). Os estádios imaturos são todos aquáticos, fazendo que grande parte do seu ciclo de vida seja embaixo d'água e que sua disseminação seja maior em períodos de chuva. Os ovos são individualmente depositados próximos a superfície da água e, após completarem seu desenvolvimento embrionário, eclodem quando completamente submersos, gerando o primeiro dos quatro estádios larvários. As larvas se alimentam de matéria orgânica e microorganismos presentes na água e os quatro estádios duram em torno de 5 a 7 dias. As pupas, por sua vez, não se alimentam e completam o desenvolvimento do mosquito em 2 a 4 dias. A emergência dos adultos é normalmente crepuscular e os jovens adultos demandam 24 h para completa maturação sexual e endurecimento de seu exoesqueleto. Após 2 a 3 dias da completa formação dos adultos, ocorre a cópula. Machos e fêmeas adultos se alimentam de seiva, mas a fêmea requer o repasto sanguíneo para maturação dos ovos, já que as proteínas obtidas do sangue fornecem aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas para os ovos. O repasto sanguíneo é o evento de grande importância para a saúde pública, uma vez que é nesse momento que a fêmea é capaz de se infectar ou infectar o hospedeiro com os arbovírus (CHAPMAN, 1998; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Após copular, a fêmea armazena o esperma permanentemente em estruturas denominadas espermatecas. O esperma estocado é suficiente para fertilizar todos os ovos que a fêmea produza durante sua vida, sendo necessária somente uma copulação durante sua vida. O macho é atraído pelo som do batimento das asas das fêmeas, que provavelmente estará próxima de um hospedeiro vertebrado. Após a cópula, a fêmea faz o repasto sanguíneo, se tornando mais pesada, o que altera a frequência do batimento de suas asas, que passa a não ser mais atrativa para os

machos. Desta forma, uma fêmea raramente irá copular com mais de um macho. Uma vez que a ovogênese se completa (após o repasto sanguíneo), a fêmea sai em busca de criadouros para oviposição. Os ovócitos maduros só são fertilizados quando são transportados através do oviduto central que é conectado à espermateca. Imediatamente antes da postura, os espermatozoides armazenados penetram nos ovócitos através de uma estrutura denominada micrópila. Os ovos requerem ainda 77 h (a 25 °C) após a oviposição para completar seu desenvolvimento embrionário nos criadouros e dar origem a larvas L1. A oviposição desse mosquito, assim como o repasto sanguíneo, é diurna e bimodal, com picos entre 6 e 8 h da manhã e entre às 16 e 18 h da tarde. A oviposição se intensifica no período chuvoso, quando há maior disponibilidade de criadouros e maior população de mosquitos (CHAPMAN, 1998).

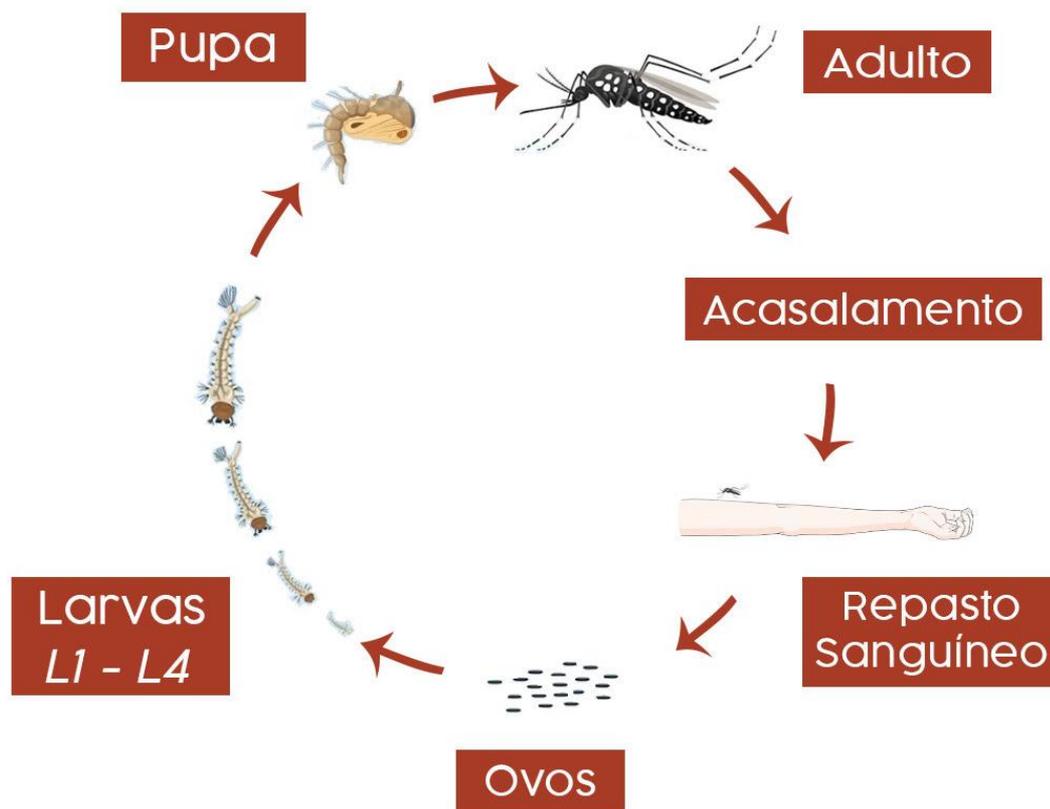


Figura 1. Ciclo de vida do *Ae. aegypti*. Fonte: Arquivo do Laboratório de Farmacognosia/UnB.

Como se trata de uma espécie já domesticada, vários tipos diferentes de criadouros são utilizados. É interessante notar que as fêmeas preferem locais que já tenham larvas de *Ae. aegypti*, uma vez que ali os ovos conseguiram se manter viáveis

e eclodir. Os ovos são assincrônicos, ou seja, eclodem em momentos diferentes, sendo mais uma estratégia para manutenção da espécie (SILVA; SILVA, 1999; WONG et al., 2011).

Os ovos de *Ae. aegypti* são potencialmente a maior razão do sucesso dessa espécie e do fracasso de ações de controle vetorial. Após o desenvolvimento embrionário, podem entrar em diapausa e sobreviver por mais de um ano (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A temperatura para viabilidade dos ovos vai de 16 °C a 31 °C com umidade relativa maior que 80%. Apesar de aceitarem uma grande faixa de temperatura, os ovos tem maior velocidade de desenvolvimento em temperaturas mais elevadas (SILVA; SILVA, 1999).

Os ovos recém postos são brancos, flexíveis e permeáveis, mas se tornam escuros, rígidos e impermeáveis durante seu desenvolvimento. Nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário os ovos são revestidos somente pelo córion, produzido ainda no ovário. O córion se divide em duas estruturas, o endocóron – rígido e homogêneo; e o exocóron – heterogêneo e mais flexível. O enrijecimento e escurecimento dos ovos estão relacionados à melanização e esclerotização do endocóron, que ocorre 3 a 4 h após a postura. O que protege o embrião da dessecação e o mantém viável por longos períodos é a formação da cutícula serosa, uma matriz extracelular produzida pela membrana serosa (que é uma camada celular mais interior de proteção direta ao embrião). A quitina presente na cutícula serosa e a melanização do córion são os fatores mais importantes de proteção dos ovos à dessecação. Após oviposição, término do desenvolvimento embrionário e estímulo para eclosão (temperatura favorável e presença de água), as larvas L1 rompem os ovos através da “espícula rompedora”, uma estrutura presente na cabeça da larva (KAUFFMAN et al., 2017; VARGAS et al., 2014).

O estágio larval é estritamente aquático e dura de 5 a 7 dias, terminando com o desenvolvimento de pupas. São quatro estágios larvários, denominados L1, L2, L3 e L4. A cada muda, é liberado um exoesqueleto de quitina permitindo seu crescimento. As larvas se alimentam de matéria orgânica e microorganismos dispersos na água. Seu aparelho bucal mastigador-raspador também permite que trituram partículas depositadas no fundo e paredes dos reservatórios. As escovas orais à frente da cabeça promovem correntes hídricas que trazem para a boca da larva as partículas que serão mastigadas. Possuem mandíbula e maxila robustas, dotadas de dentes e cerdas fortes para auxiliar na trituração dos alimentos. A filtração é a principal forma

de ingestão e cada larva chega a filtrar até 2 litros de água por dia. A ingestão não seletiva de partículas por parte das larvas facilita o uso de larvicidas que tenham atividade após ingressar pelo aparelho bucal. A cabeça é provida por um par de antenas, olhos formados por ocelos acompanhados de uma mácula que se transformará nos olhos compostos dos insetos adultos (CHAPMAN, 1998; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; KAUFFMAN et al., 2017).

No primeiro instar larval, medem somente 1 mm e chegam até 8 mm no quarto estágio. O tamanho e taxa de crescimento variam de acordo com a temperatura, disponibilidade de nutrientes e densidade de larvas no mesmo reservatório. O posicionamento em relação à lâmina d'água é um dos critérios que separam as larvas de *Aedes* de outros mosquitos: as de *Aedes* ficam na superfície de maneira quase perpendicular, enquanto as larvas de *Anopheles* ficam paralelas e as de *Culex* ficam em posição angulada (CHAPMAN, 1998; RUEDA, 2004).

Seu corpo é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome, o qual possui nove segmentos. Possuem cerca de 222 pares de cerdas que tem função sensorial e auxiliam na flutuação. O segmento anal possui um sifão para respiração e quatro estruturas chamadas papilas anais, para regulação osmótica (RUEDA, 2004).

A pupa é o último estágio aquático do desenvolvimento, e dura entre 2 a 4 dias. Esse estágio é móvel, porém não se alimenta e por isso tende a ficar imóvel na superfície da água como estratégia de conservação de energia. Tem aspecto de vírgula e é a primeira fase em que é possível definir o sexo do animal. Inicialmente tem coloração clara, que vai escurecendo à medida que se aproxima o momento da emergência do adulto. Divide-se em duas porções: cefalotórax (cabeça + tórax) e abdome com 8 segmentos. No cefalotórax há duas estruturas tubulares denominadas trompas respiratórias, que chegam a superfície permitindo a respiração. No fim do abdome há um par de paletas que auxiliam na locomoção e sua disposição é um dos critérios de diferenciação entre machos e fêmeas. Nas fêmeas, as paletas são maiores e sobrepostas, enquanto nos machos são menores e espaçadas (Figura 2). O lobo genital das fêmeas é pequeno, enquanto o dos machos é bilobulado e volumoso. Normalmente as pupas fêmeas são consideravelmente maiores que as pupas machos, fator que pode ser alterado pela temperatura e outras condições de criação (CHAPMAN, 1998; KAUFFMAN et al., 2017; RUEDA, 2004).



Figura 2. Registro fotográfico da morfologia de pupas do sexo feminino e masculino.

A fase adulta do *Aedes* é o mosquito propriamente dito, que possui cabeça, tórax e abdome. As fêmeas e machos são parecidos, com diferenças principalmente quanto ao tamanho e forma da antena, que no macho é plumosa. A probóscide do macho é mais longa que a da fêmea, porém não é adaptada para penetrar na pele para o repasto sanguíneo. No tórax de cor preta estão inseridos os três pares de patas, um par de asas e um par de halteres. Uma das características mais marcantes deste mosquito é a presença de escamas claras conferindo o padrão de listras brancas tanto no abdome quanto em suas patas. A principal característica que diferencia *Ae. aegypti* de *Ae. albopictus* é o desenho em forma de lira no tórax em vista dorsal da primeira espécie. Os mosquitos procuram superfícies escuras e imóveis para o repouso. A posição de repouso do *Aedes* é paralela à superfície, em oposição aos *Anopheles* que tem postura mais verticalizada, característica que facilita a distinção entre os gêneros (CHAPMAN, 1998; RUEDA, 2004).

O metabolismo energético dos mosquitos depende da ingestão de carboidratos proveniente de alguma matriz vegetal. As fêmeas necessitam também de repasto sanguíneo para maturação dos ovos e são capazes de estocar os carboidratos de sua alimentação no divertículo central, mantendo o estômago vazio para receber o sangue quando do repasto. Na ausência de uma fonte de carboidratos, as fêmeas utilizam lipídeos do sangue como fonte de energia para os voos (BARREDO; DEGENNARO, 2020).

A emergência do adulto é geralmente crepuscular. Após 2 a 3 dias da emergência, há o acasalamento e repasto sanguíneo da fêmea. Estímulos visuais, térmicos e olfatórios são importantes durante a busca pelo hospedeiro, sendo o último o fator mais predominante para a escolha. A busca pelo hospedeiro termina quando há suficiente distensão abdominal pela ingestão de sangue. *Ae. aegypti* se utiliza quase exclusivamente de sangue humano para o repasto (CHAPMAN, 1998; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A expectativa de vida dos mosquitos varia de 10 a 35 dias, sendo que as fêmeas sobrevivem por mais tempo. Acredita-se que o repasto sanguíneo forneça nutrientes que permitem maior sobrevivência das fêmeas. Outra hipótese é que o ejaculado do macho contenha proteínas e outros compostos que aumentem significativamente o *fitness* das fêmeas (VILLARREAL et al., 2018).

A distância de voo dos adultos é normalmente inferior a 200 m, sendo incapazes de viajar longas distâncias. A presença de mosquitos no ambiente doméstico é devida, portanto, à disponibilidade de criadouros na própria residência e na vizinhança próxima. A aglomeração urbana é um fator de grande importância para a propagação viral, uma vez que fêmeas infectadas seriam capazes de realizar repasto em vários domicílios de uma mesma vizinhança (HARRINGTON et al., 2005; HEMME et al., 2010; RUSSELL et al., 2005)

Distribuição do Ae. aegypti

O mosquito *Ae. aegypti* está estabelecido nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (KRAEMER et al., 2015). Toleram ambientes com temperaturas de 15 °C a 30 °C, sendo possível encontrá-los em ambientes com temperaturas mais elevadas (BRADY et al., 2013, 2014). Temperaturas inferiores a 15 °C impedem a movimentação e desenvolvimento dos mosquitos e limitam o estabelecimento da espécie nesses locais (BRADY et al., 2014; YANG et al., 2009).

Uma vez que possui todo o ciclo de vida imaturo em ambientes aquáticos, o estabelecimento da espécie depende da quantidade e frequência de precipitações. A inconstância do fornecimento urbano de água faz com que a população estoque água em recipientes que fornecem as condições adequadas para o desenvolvimento do mosquito. Portanto, a sazonalidade dos surtos de arboviroses, geralmente

concentrados nos períodos chuvosos, pode ser alterada devido ao racionamento de água (KROKOVSKY et al., 2022).

Arboviroses

As arboviroses são doenças virais causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos a hospedeiros vertebrados. Já são conhecidas mais de 545 espécies de arbovírus, sendo que cerca de 150 causam doenças em humanos, e a maioria zoonótica. Grande parte dos arbovírus são vírus de RNA. Acredita-se que o RNA tenha maior plasticidade e taxa de mutação, o que facilitaria sua replicação tanto em hospedeiros vertebrados quanto invertebrados (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). Para alguns arbovírus, como os vírus da dengue, Zika, chikungunya e febre amarela, os seres humanos são reservatórios e alvos de surtos em áreas urbanas sem demandar um reservatório animal intermediário. Por outro lado, para a maior parte dos arbovírus, os seres humanos são hospedeiros acidentais, infectados em eventos de “spill over”, que não desenvolvem viremia suficiente para continuar o ciclo de transmissão (CLETON et al., 2012).

As mudanças climáticas e a invasão de regiões com biodiversidade desconhecida, favorecem a transposição da barreira entre espécies, causando novas doenças em seres humanos. O desequilíbrio ambiental e mudanças climáticas, aliados às dinâmicas de crescimento populacional desordenado favorece o desenvolvimento dos artrópodes transmissores das arboviroses. Espécies de mosquitos antes restritas ao ambiente tropical, hoje já estão se estabelecendo em regiões temperadas do mundo, colocando países desenvolvidos em risco de estabelecimento de surtos autóctones (BRADY et al., 2012, 2014; GOULD et al., 2017; KRAEMER et al., 2015).

Os arbovírus de importância sanitária no Brasil estão concentrados em 3 famílias: Flaviviridae, Togaviridae e Bunyaviridae. A família Flaviviridae é composta por 3 gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* engloba 39 diferentes espécies de arbovírus que causam encefalites ou febre hemorrágica. Os principais agentes deste gênero são os vírus da dengue (DENV), Zika (ZKV), oeste do nilo (WNV), febre amarela (YFV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV). O termo flavivírus deriva do latim “flavus”, que significa amarelo, em referência à icterícia causada pela febre amarela. Os flavivírus são taxonomicamente divididos em 3 grupos

baseados no vetor: transmitido por carrapato; transmitido por mosquito e vírus sem vetor conhecido. Dentre os flavivírus transmitidos por mosquitos, são ainda subclassificados de acordo com o principal vetor comumente utilizado na transmissão, *Aedes* sp. ou *Culex* sp. (CLETON et al., 2012; GOULD et al., 2017; HIGUERA; RAMÍREZ, 2019; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; VASILAKIS; WEAVER, 2008).

A família Togaviridae possui os gêneros *Alphavirus* que inclui cerca de 40 vírus e *Rubivirus* que é composto somente pelo vírus da rubéola. Dentre os *Alphavirus*, os de maior importância entomológica e sanitária no Brasil são os chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) e o vírus da encefalite equina do leste (EEEV). A família Bunyaviridae produz doenças menos prevalentes no país e é constituída por 4 gêneros que infectam animais (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus*), e um gênero que infecta plantas (*Tospovirus*). Os hantavírus são transmitidos por aerossóis de excremento de roedores, mas os outros Bunyaviridae são transmitidos por, principalmente mosquitos e carrapatos (CLETON et al., 2012; GOULD et al., 2017; HIGUERA; RAMÍREZ, 2019; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Os artrópodes são os principais transmissores das arboviroses, e os responsáveis pela circulação viral sustentada. Por outro lado, outras formas de transmissão já foram documentadas e são alvo de vigilância para evitar o estabelecimento de surtos. Os bancos de sangue fazem testes sorológicos de amostras para evitar a transmissão por transfusão de sangue em áreas endêmicas de arbovírus. Já foi documentada também transmissão por via sexual, por via materno-infantil durante o parto e através do transplante de órgãos (CARDONA-OSPINA et al., 2018; CONTOPOULOS-IOANNIDIS et al., 2018; PETERSEN; BUSCH, 2010).

Dinâmica de transmissão de arboviroses por mosquitos

O repasto sanguíneo é o evento de grande importância para a saúde pública, uma vez que é nesse momento que a fêmea é capaz de se infectar ou infectar o hospedeiro com os arbovírus. Para completar o ciclo de transmissão, as fêmeas devem ter finalizado a maturação sexual, fazer repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado após o período de incubação intrínseco do vírus e ainda picar outro hospedeiro após o período de incubação extrínseco. O período de incubação intrínseco ocorre no hospedeiro vertebrado, e a infecção do mosquito só ocorre se o

repasto ocorrer durante o período de viremia do hospedeiro, que é quando há vírus no sangue. Para dengue, o período virêmico ocorre 1 dia após aparecimento de sintomas e vai até o sexto dia de doença. O período de incubação extrínseco se passa no mosquito e dura de 9 a 13 dias. Dessa maneira, as fêmeas passam a ser efetivamente infectantes após o repasto sanguíneo e o período de incubação extrínseco, ou seja, aproximadamente aos 13 dias de vida e permanecem infectantes até o fim de sua vida (6 a 8 semanas) (WHO, 2022). Alguns estudos mostram, porém, que o período de incubação extrínseco varia de acordo com a temperatura ambiente e pela quantidade de vírus ingerido durante o repasto. Esses dados são essenciais para prever e estimar adequadamente a escala dos surtos das arboviroses (TJADEN et al., 2013).

O potencial de uma população de mosquitos efetivamente causar surtos de arboviroses está intimamente relacionada à Taxa de Sobrevivência Diária (*Daily Survival Rate* – DSR). Através da aplicação de modelos matemáticos em dados de estudos de recaptura de mosquitos, é possível estimar a proporção de sobrevivência diária dessas fêmeas. Uma DSR de 0,9 significa que aproximadamente 90% das fêmeas sobrevive a cada dia, fazendo com que menos de 40% da população inicial de fêmeas infectadas esteja disponível para transmissão, que ocorre após os 13 primeiros dias de vida (JOHNSON et al., 2020). Um estudo no Rio de Janeiro encontrou DSR de aproximadamente 0,7, fazendo com que a população de fêmeas aptas para a transmissão sejam inferiores a 10% da sua população inicial (DAVID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FREITAS, 2009).

A transmissão transovariana já foi reportada tanto para os vírus Zika, chikungunya e os quatro sorotipos de dengue (DZUL-MANZANILLA et al., 2016; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; FERREIRA-DE-LIMA; LIMA-CAMARA, 2018). Nesse caso, a fêmea já está apta para transmissão dos arbovírus no primeiro repasto sanguíneo. Tanto em estudos controlados em laboratório quanto em coletas do campo, pesquisadores foram capazes de detectar larvas e adultos machos com os vírus, confirmando que a transmissão ocorreu através da progenitora infectada (DA COSTA et al., 2017). Alguns estudos, porém, demonstram a baixa taxa de transmissão transovariana e questionam a sua real importância na dinâmica dos surtos virais (DZUL-MANZANILLA et al., 2016; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; FERREIRA-DE-LIMA; LIMA-CAMARA, 2018; ROSEN et al., 1983). Por outro lado, a transmissão transovariana de DENV foi relatada sucessivamente até a sétima geração

de mosquitos, fortalecendo a hipótese de que os mosquitos são possíveis reservatórios virais durante períodos interepidêmicos (JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002).

Dengue

O vírus da dengue (DENV) é um vírus de RNA positivo com 10-11 kpb pertencente à família Flaviviridae. O DENV está dividido em 4 sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) que afetam os seres humanos e possuem 30-35% de diversidade em aminoácidos entre si. Em cada sorotipo estão inseridos uma gama de genótipos que variam aproximadamente em 3% em nível de aminoácidos. Já foram reconhecidos três genótipos de DENV-1, seis de DENV-2 e quatro de DENV-3 e DENV-4 (WHO, 2012). A sequência genética de uma amostra de DENV proveniente de uma infecção silvática foi diferente de todos os sorotipos humanos e silváticos conhecidos até o momento. Chegou-se a especular de que seria o quinto sorotipo de DENV, mas como não foram detectados mais casos com esse sorotipo, o evento foi considerado um *spillover* que não chegou a entrar no ciclo epidêmico humano (POLLETT et al., 2018).

Os eventos de *spillover* que deram origem aos sorotipos humanos epidêmicos de DENV1-4 ocorreram no final do século XIX e início do século XX. Nessa época se iniciaram os processos de urbanização e crescimento populacional suficiente para iniciar o ciclo urbano epidêmico de dengue (WEAVER, 2013). Por volta de 1800, antes da primeira revolução industrial, somente 3% da população mundial encontrava-se na área urbana. Já após a segunda revolução industrial, na metade do século XIX, cerca de 15% da população já estava urbanizada.

Através de estudos genéticos, estima-se que o encontro entre esses vírus e os seres humanos se deu a mais de 1600 anos atrás. Esse dado é compatível com o relato de uma síndrome com os mesmos sintomas de dengue na China no século III. Por se tratar de uma doença que ocorria perto de criadouros aquáticos dos mosquitos, era chamada de “veneno da água”. Só foram registrados relatos de síndrome semelhante muitos séculos depois, em diferentes regiões do mundo, sugerindo uma epidemia em 1788. O aumento do comércio e navegações coincidiu com o espalhamento da doença no mundo. Uma segunda pandemia de dengue se estendeu de 1823 a 1916 ao redor do mundo, com início na África e se espalhando para Índia,

Oceania e Américas. Provavelmente o vírus se espalhou através do comércio de produtos e do tráfico de escravos, e se aproveitou do estabelecimento do vetor *Ae. aegypti* para transformar a dengue epidêmica em endêmica nesses locais (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Após o fim da segunda guerra mundial, o mundo sofreu grandes transformações, com desenvolvimento tecnológico, relações ecológicas desbalanceadas e um grande crescimento populacional. Essas mudanças permitiram o estabelecimento e dispersão dos vetores em diversas regiões. A iniciativa da Organização Panamericana de Saúde de erradicar o mosquito permitiu um período de 20 anos de baixa taxa de infecção. Com o abandono do programa nos anos 1970 iniciou-se o aumento gradual da população do vetor até os níveis de hoje. A circulação viral dos anos 1960 e 1970 era composta de um único sorotipo. Com o aumento do número de casos e circulação viral, hoje todos os sorotipos ocorrem concomitantemente no mundo (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

O espectro de manifestações de infecções por DENV é muito variável, desde infecções assintomáticas até estabelecimento de febre hemorrágica grave. Apesar de muito dinâmica, a taxa de infectados assintomáticos para sintomáticos é 4 para 1. Acredita-se que os assintomáticos desempenham um importante papel nas epidemias de dengue e manutenção dos ciclos de transmissão. É reconhecida a proteção homotípica permanente ao sorotipo ao qual o paciente foi exposto e proteção heterotípica transitória de aproximadamente 3 anos aos outros sorotipos. Acredita-se, porém, que uma infecção secundária por DENV tem potencial de maior gravidade, uma vez que algumas proteínas do envelope viral são conservadas entre os sorotipos. Dessa forma, os anticorpos formados durante a primeira infecção possuem reatividade cruzada reconhecendo o novo vírus (MIDGLEY et al., 2012). Inclusive, a reatividade cruzada com ZIKV, outro flavivírus, foi demonstrada e pode levar ao desenvolvimento de infecções mais graves (DEJNIRATTISAI et al., 2016).

A severidade das infecções secundárias se dá por um processo chamado de potenciação dependente de anticorpos (*Antibody-dependent enhancement*) (DEJNIRATTISAI et al., 2010). Os anticorpos de uma infecção anterior por flavivírus são capazes de reconhecer, mas não neutralizar os vírus da nova infecção. Pelo contrário, os anticorpos facilitam a entrada dos vírus nas células favorecendo uma replicação viral em maior escala. Infecções pós secundárias, ou seja, a partir da terceira infecção por DENV são menos frequentes e mais brandas (OLKOWSKI et al.,

2013). Além da infecção secundária, a carga virêmica, o sorotipo 2 (DENV2), idade do paciente e ordem da infecção pelos sorotipos estão relacionados com infecções mais graves (POLLETT et al., 2018; VAUGHN et al., 2000).

Todo esse conhecimento é importante para o desenvolvimento de vacinas que sejam seguras. Atualmente, a Dengvaxia (Sanofi Pasteur) é a única vacina liberada para venda no Brasil, indicada para pacientes de 9 a 45 anos que já tiveram a doença. Só é indicada para pacientes que tenham tido contato anterior com DENV, pois há o risco de ocorrência de infecção mais grave em uma possível infecção já que a vacina somente oferece uma proteção parcial (POLLETT et al., 2018). Um estudo de base populacional foi realizado no Paraná para avaliar a efetividade da vacina Dengvaxia (CYD-TDV) contra dengue. O estudo caso-controle foi realizado nos cinco municípios mais populosos do estado. A efetividade da vacina contra qualquer sorotipo foi de 11,1% (95% IC: -19,0% a 33,6%). A efetividade da vacina chegou a 93,3% (95% IC: 47,7% a 99,2%) para DENV-4. O estudo concluiu que a vacina foi efetiva para a prevenção de casos de dengue somente pelo DENV-4 (DE MORAES et al., 2022). A TK-003 é outra vacina em estágio avançado de desenvolvimento para proteção contra dengue. A vacina vem sendo estudada para uso tanto em pacientes que já tiveram contato com o vírus como em pacientes soronegativos. Essa vacina tem se mostrado eficaz e segura para os dois grupos. A proteção contra formas sintomáticas de dengue cai após três anos da imunização, porém a proteção contra hospitalizações por dengue segue inalterada nesse período. O esquema vacinal com possível administração de mais uma dose é sugerido (RIVERA et al., 2021).

Já foi demonstrada a capacidade vetorial de *Ae. aegypti* de carrear mais de um sorotipo de DENV ao mesmo tempo (ANGEL; ANGEL; JOSHI, 2015). Além disso, já foram também verificados indivíduos infectados tanto com DENV quanto ZIKV (CHAVES et al., 2018; LANGERAK et al., 2019; OLAWOYIN; KRIBS, 2020). A distribuição do principal vetor, *Ae. aegypti* em escala global, coloca metade da população mundial em risco de transmissão das arboviroses. Mais de 100 milhões de infecções assintomáticas e aproximadamente 10.000 mortes são causadas por dengue em mais de 125 países todos os anos. Por conta desses números, dengue é considerada a arbovirose de maior impacto e proporção no mundo. As projeções estimam que, com as mudanças climáticas, dengue será mais intensa nas áreas endêmicas com amplificação viral acelerada, aumento da sobrevivência e reprodução do vetor, e com aumento das temporadas de transmissão. Em combinação, esses

fatores levarão a um aumento de número de casos, que serão também mais severos. Ainda, esse cenário favorece a propagação da doença para áreas hoje livres ou consideradas de baixo risco para transmissão de arboviroses (BHATT et al., 2013; BRADY et al., 2014; KRAEMER et al., 2015; MESSINA et al., 2019).

Zika

O Zika vírus é outro flavivírus de RNA fita simples. O mecanismo exato da replicação ainda não é conhecido, mas sabe-se que o ZIKV tem a capacidade de se replicar nas células intestinais e nas glândulas salivares dos mosquitos. Nas células de mamíferos o vírus possui neurotropismo, se replicando nas células dendríticas, neurônios e células da glia. A capacidade desses vírus de infectar diferentes hospedeiros permite a manutenção do ciclo urbano entre humanos e o ciclo enzoótico entre primatas não humanos (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

A maior parte das infecções por ZIKV são assintomáticas em humanos, mas os sintomas dos casos sintomáticos incluem febre, dor articular, rash e conjuntivite. Esse vírus ganhou maior atenção durante a epidemia de ZIKV no Nordeste brasileiro, ao final de 2015 – início de 2016, quando foi detectada a relação entre o vírus e a microcefalia congênita fetal durante o período gestacional. Essa relação causal com as microcefalias levou a OMS a declarar uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional em 2016 (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

O ZIKV foi isolado a primeira vez de macacos rhesus na floresta de Zika, em Uganda. Inicialmente, casos esporádicos de infecção eram reportados em partes da África e Ásia. Em 2007, 73% da população da Micronésia foi infectada por ZIKV, que começou a se espalhar pelas ilhas do Pacífico. No ano de 2013, 28.000 casos suspeitos ocorreram nessas ilhas, correspondendo naquela época ao segundo maior surto já documentado. O vírus chegou ao Chile em 2014 e no Brasil em 2015 com mais de 1.300.000 casos suspeitos (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). Até a metade de 2019, 87 países já registraram transmissão autóctone de ZIKV em 4 das 6 regiões delimitadas pela OMS (África, Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Oeste) (WHO, 2019).

O surto no Brasil em 2015 e 2016 teve mais de 40.000 casos notificados de infecção em gestantes com 1950 casos confirmados de microcefalia por ZIKV. A ocorrência de microcefalia fetal teve um pico mensal de 49,9 casos por 10.000

nascidos vivos durante a primeira onda de infecção que ocorreu no Nordeste brasileiro. A segunda onda foi mais branda, com picos que variaram de 3,2 a 15 entre 10.000 nascidos vivos (DE OLIVEIRA et al., 2017). Após o surto no Brasil outros países também registraram casos de malformações congênitas associadas à infecção por ZIKV (HILL et al., 2019; KUADKITKAN et al., 2020; MOI et al., 2017). Apesar da diminuição expressiva do número de casos, a vigilância é constante devido à gravidade das repercussões de uma nova epidemia (WHO, 2019).

São reconhecidas duas diferentes linhagens para ZIKV: Africana (sublinhagens Leste e Oeste) e Asiática (sublinhagens Sudoeste Asiática, Pacífico e Ilhas Americanas). As linhagens da América do Sul e do Pacífico derivam da Ásia. Algumas alterações de aminoácidos na linhagem da América do Sul podem estar relacionadas ao aumento de patogenicidade e o sucesso de reprodução viral. As infecções de ZIKV tendem a conferir imunidade permanente do hospedeiro ao vírus (SCHRAUF et al., 2020).

A análise de sequenciamento de linhagens de ZIKV mostraram alta identidade com DENV-2, provavelmente pelo alto nível de conservação dos elementos necessários para replicação. O diagnóstico de infecções por ZIKV ainda é um desafio uma vez que mutações podem alterar a efetividade dos testes e primers utilizados para amplificar sequências de ZIKV também amplificam sequências de DENV (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). Os testes sorológicos também carecem de especificidade, fazendo com que o diagnóstico laboratorial seja um desafio em regiões de co-circulação viral (KERKHOF et al., 2020). Por esse motivo, casos de co-infecções de ZIKV e DENV são difíceis de serem corretamente diagnosticados.

Além da transmissão vetorial por *Aedes* sp. foi observada transmissão sexual de ZIKV, principalmente de um homem para uma mulher. A OMS reconhece, porém, que em locais com transmissão endêmica e presença de mosquitos, a transmissão primária e mais importante é através do vetor. Diante da alta proporção de neonatos afetados por ZIKV (42% dos bebês nascidos de mães que tiveram *rash* cutâneo durante a gravidez no Brasil), a OMS lançou um protocolo para prevenção da transmissão sexual de ZIKV (WHO, 2020). A recomendação é mais importante para viajantes de ou para áreas com transmissão e aconselha o uso de preservativos ou abstinência sexual por 3 meses após o deslocamento. Esse tempo foi estimado de acordo com o período em que ZIKV é encontrado no sêmen que, na maioria dos casos, não passa de 50 dias. Há ainda recomendação de uso de método de barreira

ou abstinência sexual para mulheres grávidas ou em planejamento gestacional durante todo o período de gravidez em áreas de transmissão de ZIKV (WHO, 2020).

Chikungunya

Chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA de fita simples pertencente ao gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*). A transmissão desse vírus se dá principalmente por vetores artrópodes, mas pode também haver transmissão horizontal especialmente se a infecção ocorre em data próxima ao parto (CONTOPOULOS-IOANNIDIS et al., 2018). Durante períodos epidêmicos, os seres humanos são os principais reservatórios do vírus. Em períodos interepidêmicos, primatas, roedores e pássaros são os principais reservatórios (MONTERO, 2016).

O nome do vírus surgiu após o primeiro surto conhecido, na Tanzânia em 1952, e se traduz como “a doença que dobra as articulações”. A infecção pode se manifestar em uma forma aguda, subaguda ou crônica. A maior parte dos infectados desenvolve sintomas, que são geralmente mais severos do que para ZIKV e DENV. A febre alta de início repentino é geralmente acompanhada de uma forte artralgia. Na doença aguda 70% a 100% dos pacientes tem acometimento de múltiplas articulações, principalmente das mãos e dos pés. Parte dos pacientes sintomáticos se recupera após 10 dias, mas de 43% a 70% desenvolvem a forma subaguda, que pode durar até 3 meses. Uma parcela importante desses pacientes evolui para a doença crônica, que tende a se resolver com o tempo. De qualquer forma, 47% dos doentes crônicos ainda permanecem com a doença após 2 anos. A letalidade da infecção por CHIKV é baixa, mas suas manifestações com dores articulares severas afetam a qualidade de vida dos pacientes e a produtividade da população durante uma epidemia (MONTERO, 2016).

Surtos isolados foram identificados na África e Ásia até 2004 ano em que houve uma grande epidemia com 1,3 milhões de casos humanos reportados na Índia, Itália e França (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019; MONTERO, 2016). Uma mutação no vírus é apontada como responsável pela adaptação ao mosquito *Ae. albopictus* e aumento da competência de *Ae. aegypti*, permitindo a transmissão do vírus para novas regiões do mundo com maior impacto (MALJKOVIC BERRY et al., 2019). Assim como visto para ZIKV e DENV, a infecção com recuperação do paciente, parece levar à imunidade permanente para esse vírus (AUERSWALD et al., 2018; SCHRAUF et al.,

2020). Da mesma maneira observada para os flavivírus ZIKV e DENV, há possibilidade de coinfeção dos mosquitos com os dois alfavírus CHIKV e o vírus Mayaro (MAYV) (KANTOR et al., 2019).

Febre amarela

O vírus da febre amarela (YFV) é um flavivírus de RNA de fita simples positiva. Esse vírus é mantido no ciclo silvático pelos *Aedes* spp. na África e pelos mosquitos *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. nas Américas. Por outro lado, a transmissão urbana, ocorre principalmente através do *Ae. aegypti*, tornando esse mosquito crucial na maioria das epidemias até hoje (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

O termo febre amarela vem da icterícia causada pelo acometimento hepático de alguns casos. A infecção por YFV pode ser subclínica, não específica ou pode chegar à uma severidade que leve o paciente ao óbito. Sabe-se que a linhagem selvagem do vírus é viscerotrópica, causando maiores danos ao fígado, rins, baço, linfonodos e coração. Alguns dados mostram que múltiplos ciclos de transmissão vetor-homem aumenta a virulência do YFV (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Na América do Sul, a incidência de febre amarela é de 5 casos para cada 100.000 habitantes e é dez vezes maior no oeste africano. Por outro lado, a taxa de mortalidade é maior na América do que na África, possivelmente por uma diferente interação entre o vírus e a população local (VASILAKIS; WEAVER, 2008). A incidência nas Américas, especialmente no Brasil, é menor por conta da disponibilidade de imunização contra o YFV. Por outro lado, uma vez que a cobertura vacinal no país é de cerca de 80%, ocasionalmente ocorrem surtos silváticos da doença. Recentemente, em 2016, o Brasil teve seu pior surto de febre amarela dos últimos 80 anos, com casos principalmente na região Sudeste. Em menos de 18 meses, foram confirmados 1833 casos com 578 mortes. O último grande surto de febre amarela no Brasil havia ocorrido entre 1934 a 1940 com 1079 mortes confirmadas por histopatologia. A grande preocupação em termos de saúde pública é o estabelecimento do YFV nos ciclos de transmissão urbanos causados por *Ae. aegypti* (POSSAS et al., 2018).

Controle vetorial

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o controle vetorial é essencial para o controle da dengue e outras arboviroses. O órgão promove uma estratégia denominada “Controle Vetorial Integrado”, que defende o uso racional de estratégias para otimização dos recursos para controle vetorial. Ainda, o controle vetorial deve atingir todas as formas do mosquito, tanto as imaturas quanto a adulta nas casas e locais com circulação de pessoas. A estratégia mais eficaz para controlar as populações de mosquito combinam controle químico, biológico e manejo ambiental (WHO, [s.d.]).

O manejo ambiental consiste em promover alterações do ambiente como forma de eliminar as condições para o desenvolvimento dos mosquitos e para evitar o contato com humanos. Engloba alterações físicas permanentes do meio ambiente que acabem com criadouros, manejo adequado do lixo, melhora de condições sócio-sanitárias com encanamento de água e esgoto, atenção com plantas que acumulem água, dentre outros. Ainda também faz parte do manejo ambiental a instalação de telas mosquiteiras em janelas e ao redor das camas para evitar o contato com os mosquitos (WHO, [s.d.]).

O controle biológico é o mais difícil de ser implantado já que requer o cultivo de predadores do mosquito, especialmente das larvas. Essa estratégia envolve introdução de peixes e crustáceos nos reservatórios de água para que possam preda as larvas do mosquito. Adicionalmente podem ser utilizadas bactérias como as do gênero *Wolbachia* sp. que são patogênicas para os mosquitos e inviabilizam o estabelecimento de suas populações (WHO, [s.d.]).

O controle químico é realizado através do uso de inseticidas. O uso de agentes larvicidas deve ser complementar ao controle ambiental, e só deverá ser utilizado nos criadouros que não puderem ser removidos. O uso de adulticidas deve ser feito através de tratamento residual de superfícies ou uso espacial. O tratamento residual é feito em superfícies para matar os mosquitos que possam pousar. O uso espacial é usado em casos específicos onde há transmissão local, para que possa diminuir a população de mosquitos, e portanto, a circulação viral, mesmo que momentaneamente (WHO, [s.d.]).

Modelos são estudados a fim de avaliar o impacto da percepção de risco da população sobre o resultado de medidas de controle químico. A excessiva

preocupação ambiental acerca do uso do controle químico pode ser um fator que atrapalhe na logística do controle vetorial. Por outro lado, também fornece elementos para demandar avaliação de risco da exposição da população a esses agentes. A informação e educação se mostram os melhores aliados para melhor avaliação de risco da população acerca da sua exposição tanto aos patógenos quanto aos pesticidas (SUAREZ et al., 2020).

Controle químico

Existem quatro classes principais dos inseticidas clássicos: organoclorados, organofosforados, piretroides e carbamatos. Todos agem no sistema nervoso central, fazendo com que sejam pesticidas de ação rápida. Tanto os carbamatos quanto os organofosforados inibem a enzima acetilcolinesterase, responsável por cessar o impulso nervoso através da quebra do neurotransmissor acetilcolina. Já os piretroides e organoclorados modulam canais de sódio, fazendo um *knockdown* (estado imóvel que pode evoluir para morte) instantâneo dos mosquitos. Desta forma, os inseticidas clássicos possuem apenas dois mecanismos de ação, resultando em maiores chances de desenvolvimento de resistência (REZENDE-TEIXEIRA et al., 2022).

Os inibidores do crescimento são uma classe mais moderna de inseticidas que tem se mostrado como alternativas promissoras no controle vetorial. O principal exemplo dessa classe é o piriproxifeno, um análogo de hormônio juvenoide que impede o desenvolvimento completo do mosquito. É um inseticida de ação tardia, atuando principalmente na fase de pupa, quando impede a completa formação do mosquito adulto e provoca mortalidade no estágio pupal (HUSTEDT et al., 2020).

O potencial tóxico do piriproxifeno em organismos aquáticos já foi extensamente avaliado. Aproximadamente uma a cada 4 espécies aquáticas já avaliadas foi afetada por piriproxifeno em doses inferiores à concentração recomendada de uso. Foram especialmente considerados os organismos em risco: os crustáceos *Daphnia magna*, *Eurytemora affinis* e *Leander tenuicornis* e o peixe de água doce *Xiphophorus maculatus*. O peixe-zebra (*Danio rerio*), um dos modelos de ecotoxicidade mais utilizados, foi relativamente resistente a piriproxifeno, com DL₅₀ de 5,2 µM (1,67 µg/mL), mais do que 160 vezes superior à concentração usada para controle de larvas de *Ae. aegypti*. A partir da concentração de 6,4 µM (2,056 µg/mL)

efeitos subletais significativos foram observados (MOURA; SOUZA-SANTOS, 2020; TRUONG et al., 2016).

Inseticida microbiológico: Bacillus thuringiensis

A bactéria *Bacillus thuringiensis* tem sido amplamente estudada para uso em controle vetorial por conta de sua especificidade e baixo impacto no meio ambiente. A ação inseticida dessa bactéria se dá pela produção de cristais de proteínas (BRAVO et al., 2011; STALINSKI et al., 2016). A subespécie *B. thuringiensis israelensis* (*Bti*) produz as proteínas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10, Cry11Aa e Cyt1Aa que demonstraram atividade tóxica em mosquitos. As proteínas Cry agem se ligando a receptores e criando poros na membrana levando à mortalidade celular pelo desequilíbrio osmótico (BERRY et al., 2002; BRAVO et al., 2011). O uso dessa biotecnologia tem vantagens como facilidade do escalonamento de produção dos microorganismos, replicação das bactérias evitando reaplicação nos criadouros e baixa impacto ambiental. Dentre as principais desvantagens é sua fotossensibilidade fazendo com que rapidamente se degrade em criadouros expostos ao sol. A baixa possibilidade de desenvolvimento de resistência também é apontada como uma vantagem do uso de *Bti*. Estudos, porém, já identificaram possíveis mecanismos de resistência que podem ser desenvolvidos. Aparentemente o mecanismo já reconhecido age pela ação de galectinas (substâncias envolvidas no reconhecimento de patógenos e defesa dos insetos) que competem pelos sítios de ligação prevenindo a interação das proteínas Cry com seus alvos moleculares. Para se proteger, larvas de *Ae. aegypti* demonstraram aumento na expressão de galectinas no seu sistema digestivo após tratamento com *Bti* (HU et al., 2020). Cabe ressaltar que esse mecanismo de possível resistência pode não ter relevância uma vez que *Bti* produz uma série de proteínas Cry tóxicas que podem atuar sinergicamente para superar o desenvolvimento de resistência (BRAVO et al., 2011).

Inseticidas botânicos

Azadirachta indica (Meliaceae), popularmente conhecida por nim é a espécie vegetal de maior relevância em relação à produtos inseticidas atualmente. De suas sementes é extraída a azadiractina, um dos 300 compostos já identificados, um dos limonóides responsável pela atividade inseticida da planta. Revisões da literatura

tratam acerca dos diversos usos em potencial dessa espécie (BENELLI et al., 2017; CHAUDHARY et al., 2017; KILANI-MORAKCHI; MORAKCHI-GOUDJIL; SIFI, 2021).

Da espécie *Tanacetum cinerariifolium* são extraídas as piretrinas, terpenos inseticidas que serviram de inspiração para o desenvolvimento de compostos sintéticos mais ativos (LYBRAND et al., 2020). Da mesma maneira, a nicotina, um alcalóide natural do tabaco (*Nicotiana tabacum*) serviu de inspiração para o desenvolvimento de uma classe inseticidas denominada de neonicotinoides (SOUTO et al., 2021).

Durante o projeto ArboControl, uma série de plantas foram testadas quanto ao seu potencial como inseticida. Quinonas naturais de *Conarus suberosus* e seus derivados sintéticos demonstraram bom potencial larvicida com atividade residual interessante (SILVA et al., 2020a). O bilobol extraído de *Schinus terebinthifolia* teve uma potente atividade larvicida com interessante perfil de degradação (SCHULTE et al., 2021). De *Vismia gracilis* foram obtidas benzofenonas e antraquinonas com potencial larvicida (MAGALHAES et al., 2022). Óleos essenciais comerciais e de plantas do Cerrado demonstraram potencial como larvicidas e repelentes (PILON et al., 2022; SILVA et al., 2022). Ainda, acetogeninas, diterpenos e fenilpropanoides foram identificadas como as substâncias responsáveis pela atividade inseticida de espécies da família Annonaceae (DE SOUSA et al., 2020; DEMARQUE et al., 2020).

Resistência a Inseticidas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a resistência a inseticidas é definida como a habilidade de um inseto sobreviver aos efeitos tóxicos de inseticidas através de mutações genéticas ou seleção natural (WHO, 2012). O uso abundante de inseticidas com diversas finalidades (agricultura, controle vetorial sanitário, uso domiciliar) é capaz de promover resistência cruzada e cria pressão seletiva para populações resistentes. Diferentes inseticidas de uma mesma classe química, que compartilham os mesmos mecanismos de ação, normalmente não são efetivos nas populações resistentes àquela classe de compostos. A resistência de uma população de mosquitos, por exemplo, a um organofosforado, provavelmente confere resistência a toda classe de compostos organofosforados (GJULLEN; PETERS, 1952; LIU, 2015). A resistência de mosquitos a pesticidas começou a ser reportada nos anos 50 e continua a ser descrita com grande frequência atualmente (REZENDE-TEIXEIRA et

al., 2022). O uso de inseticidas para o controle deve ser bem aplicado e o desenvolvimento de resistência das populações de vetores deve ser rotineiramente avaliada (WHO, 2005, 2012).

Características desejáveis para um novo inseticida para controle vetorial

O desenvolvimento de um produto inseticida tem algumas semelhanças, mas principalmente muitas diferenças em relação às características de um medicamento para uso humano. Em consonância, um inseticida idealmente deve ser capaz de penetrar rapidamente a cutícula dos insetos ou o epitélio digestivo e promover sua ação tóxica. A biodisponibilidade é, portanto, comum no desenvolvimento dos dois tipos de produto. A vantagem do desenvolvimento de inseticidas é a oportunidade de avaliação de sua atividade *in vivo*, diretamente nos organismos alvo, em todas as fases de desenvolvimento do produto. Por outro lado, o desenvolvimento de inseticidas encontra exigências que não são tão cruciais no desenvolvimento de medicamentos. O custo do inseticida formulado deve necessariamente ser baixo, uma vez que será aplicado em grandes áreas. A forma de obtenção dos ativos, seja por síntese, extração ou isolamento devem ser simplificadas. As estratégias de *drug delivery* para inseticidas é mais complexa, uma vez que as substâncias tóxicas devem entrar em contato com insetos que estão dispersos e em movimento no ambiente. Para medicamentos, o tipo de formulação e a via de administração fazem com que a dose administrada seja mais precisa. A estabilidade da formulação, principalmente frente à radiação solar, é um fator importante também. Por fim, o impacto ambiental dos pesticidas com sua atividade em organismos não-alvo é extremamente importante e um dos fatores que mais dificultam o registro de novos produtos (SWALE, 2019).

Em 30 anos a participação dos pesticidas botânicos na literatura científica cresceu de menos de 2% nos anos 80 para 21% em 2011. A crescente preocupação sobre o impacto ambiental das atividades humanas tem pressionado o desenvolvimento e uso de estratégias mais “verdes”. A conscientização acerca dos malefícios dos pesticidas para a saúde humana e dos ecossistemas tem impulsionado cada vez mais a produção orgânica no campo. Aliada ao relativo sucesso da azadiractina, uma substância isolada da planta *Azadirachta indica*, e de diversos produtos biológicos para o controle de pragas agrícolas, a consciência ambiental tem impulsionado a pesquisa de novos biopesticidas. Acompanhando a onda de novos

biopesticidas, os requerimentos regulatórios para registro no mundo estão cada vez mais rígidos, o que desacelera o desenvolvimento desses novos produtos (ISMAN, 2015, 2020; ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

O uso de matrizes naturais já utilizadas para consumo humano, como o alho, faz com que as barreiras regulatórias sejam menores. Aliado a isso e aos benefícios ambientais, há uma aceitação maior do mercado, uma vez que a população já está, há séculos, acostumada ao uso desses produtos. A função alimentícia faz com que essas fontes vegetais estejam disponíveis em grande escala no mundo.

A efetividade das plantas e seus derivados em insetos não ocorre por acaso, mas é resultado da interação desses seres vivos ao longo de milhares de anos. Como proteção, as plantas desenvolveram um sofisticado arsenal de compostos para limitar o ataque de patógenos e herbívoros. A produção dos metabólitos secundários é dependente de diversos fatores ambientais, que modulam tanto a quantidade quanto a diversidade de substâncias. A pesquisa de biopesticidas deve iniciar na caracterização completa da amostra para que os dados possam ser reprodutíveis e os resultados associados à diferente composição da matriz. O uso de fontes vegetais alimentícias demanda uma análise rigorosa de pesticidas residuais que possam ser o responsáveis pela atividade biológica observada (ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

Alguns autores sugerem que além da análise química, a falta de uso de controle positivo nos experimentos reduz a credibilidade dos resultados reportados (ISMAN; GRIENEISEN, 2014). Por outro lado, algumas vertentes sugerem que o uso de controle positivo é essencial na etapa de validação dos métodos, mas desnecessária na rotina diária de testagem. Afinal de contas, uma linhagem suscetível a organofosforados irá morrer com uma quantidade adequada de temefós. A atividade de compostos altamente tóxicos como os pesticidas das primeiras gerações é muito superior aos biopesticidas menos agressivos. Essa comparação muitas vezes é desnecessária e pouco informativa. Esses pesticidas foram registrados sob regras mais brandas e muitos deles não passariam hoje nos critérios de toxicidade utilizados no desenvolvimento de novos produtos. Por esse motivo, a comparação da atividade desses agentes com os biopesticidas de menor impacto ambiental e potencial tóxico não deve ser o único critério avaliado. Como forma de padronizar os resultados, o uso de protocolos de avaliação da atividade, como o sugerido pela OMS para larvicidas, deve ser seguido no processo de desenvolvimento dos pesticidas (WHO, 2005).

A disponibilidade dos insetos para estudos *in vivo* em todas as fases do desenvolvimento do produto permite uma avaliação mais acurada acerca das propriedades da amostra. Por outro lado, a maior parte das pesquisas não passa dos estudos no cenário laboratorial com condições de cultivo e testagem controladas. A avaliação das amostras em situações de campo traria maior confiabilidade acerca do potencial real de desenvolvimento de um biopesticida a partir da amostra estudada. São também escassas as avaliações na literatura acerca do potencial tóxico em humanos e em organismos não-alvo são geralmente escassos, possivelmente pelo uso medicinal histórico e reconhecida baixa toxicidade de vários produtos botânicos (ISMAN, 2020; ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

A correta identificação vegetal com depósito de exsicata e avaliação de botânicos especialistas parece ser outro fator que coloca em cheque a credibilidade dos estudos. As fontes vegetais cultivadas na agricultura convencional podem estar contaminadas com pesticidas utilizada no controle de pragas no campo. A caracterização química de amostras produzidas a partir desses vegetais é essencial, uma vez que os pesticidas podem ser extraídos junto aos metabólitos secundários e afetar a atividade biológica da amostra (ISMAN, 2020; ISMAN; GRIENEISEN, 2014).

Por fim, o desenvolvimento de biopesticidas para uso agrícola no Brasil além de todas as qualificações técnicas, precisa passar por um processo de registro feito conjuntamente em três órgãos: MAPA, ANVISA e IBAMA. Por outro lado, o uso de inseticidas para ações em saúde pública se enquadram na legislação de saneantes e domissanitários da ANVISA, sendo necessário o registro somente nesse órgão segundo a RDC Nº 59, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010 (ANVISA, 2010).

O alho como potencial inseticida para controle vetorial

A importância do controle vetorial devido à alta prevalência de arbovirose no país aliado à ineficiência dos programas hoje utilizados expõem a necessidade do desenvolvimento de alternativas eficazes de controle (GARCIA et al., 2018; MACIEL-DE-FREITAS; VALLE, 2014). A atividade pesticida do alho já foi demonstrada em trabalhos anteriores, mas seu potencial para o desenvolvimento de um produto comercializável ainda não foi explorado para o controle vetorial de mosquitos (AMONKAR; BANERJI, 1971; AMONKAR; REEVES, 1970; CAMPBELL et al., 2011a, 2011b; JARIAL, 2001; JUNNILA et al., 2015; RAJAN et al., 2005).

O alho, o bulbo da espécie *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), é um alimento utilizado e cultivado em todo planeta a mais de 4.000 anos. Também fazem parte da mesma família a cebola, cebolinha e o alho-poró, todos com alto teor de compostos organosulfurados que conferem odor e sabor característicos. Em 2018, foram produzidas 28.494.130 toneladas de alho no mundo em uma área cultivada de 1.546.741 hectares. A produção de alho vem crescendo a cada ano, sendo a produção mundial em 2018, seis vezes maior do que no ano de 1961. Atualmente o maior produtor de alho no mundo é a China, responsável por quase 80% da produção mundial (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018). Diante da ancestralidade de uso do alho e as diversas aplicações exploradas, esta espécie vegetal está contemplada em várias monografias de agências regulatórias de vários países (ANVISA, 2015, 2019; EMA, 2016; HEALTH CANADA, 2018; OECD, 2017).

O óleo de alho, obtido através da hidrodestilação de seus bulbos processados (cortados, amassados, espremidos), também é comestível apesar de não ser considerado palatável. Aproximadamente 70% do bulbo fresco é constituído por água e somente 0,1 a 0,4% de óleo. O alho ainda é composto por proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas, minerais, carboidratos e saponinas (BAKER; GRANT, 2018). Vários fatores podem alterar a composição do alho, conseqüentemente mudando a sua atividade biológica. Especialmente, as condições de crescimento da planta e seu processamento podem alterar tanto a quantidade quanto a variedade de compostos (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016).

Quase a totalidade dos metabólitos secundários do óleo de alho são derivados de enxofre, sendo o dissulfeto de dialila e o trissulfeto de dialila os majoritários. Esses compostos são produzidos quando a enzima alinase, estocada em vesículas nas células, é liberada durante o processamento do alho, convertendo a aliina em alicina. Em temperatura ambiente, a alicina se decompõe em uma mistura complexa, mas mais estável, de compostos organosulfurados como os polissulfetos, ajoenos e vinil ditiinas (ANWAR et al., 2017). Essa estratégia é uma maneira sofisticada da planta não sofrer com a toxicidade da alicina e seus derivados, uma vez que só serão produzidos no local da lesão da planta. Esses compostos, produzidos após o processamento do alho, são responsáveis pelo seu odor característico (ANWAR et al., 2014). Por conta da etapa enzimática, o óleo de alho não é considerado como um

óleo essencial clássico, como os óleos de plantas aromáticas como lavanda, cravo e alecrim.

Quando avaliados isoladamente, os polissulfetos parecem ter maior atividade com o aumento da cadeia de enxofre. Além do aumento da atividade, as cadeias de enxofre mais longas trazem também maior instabilidade. Essa instabilidade faz com que seja difícil o isolamento e o uso de polissulfetos com mais de 5 átomos de enxofre. Por outro lado, a mistura desses compostos, como encontrado no óleo de alho, traz relativa estabilidade ao sistema mesmo à temperatura ambiente (ANWAR et al., 2014).

Apesar da estrutura química simples, esses compostos possuem diversificados mecanismos de ação que alteram o balanço redox intracelular, causando estresse oxidativo que danifica enzimas, proteínas, lipídeos e o DNA de bactérias e nematóides. Ainda possuem a capacidade de coordenação com íons metálicos, o que leva a um desequilíbrio iônico intracelular. O caráter lipofílico dos polissulfetos ainda permite sua interação com estruturas da membrana. Acredita-se que diante da diversidade dos processos e estruturas intracelulares nos quais o alho atua fazem com que seja limitada a capacidade de desenvolvimento de resistência (ANWAR et al., 2017; ARBACH et al., 2019).

O primeiro pesticida com o óleo de alho como único ativo registrado na EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) foi em 1991. Até 2017, haviam 30 produtos registrados com óleo de alho na EPA (BAKER; GRANT, 2018). O número de produtos é relativamente pequeno visto a ampla atividade do alho em diversos organismos, sua segurança e o conhecimento milenar acerca de várias de suas propriedades (ANWAR et al., 2017). Um software de estimativa do destino de compostos baseado em suas características físicas e químicas foi desenvolvido pela EPA. Nesse software foi estimada que a meia vida do óleo de alho foi de 2,8 h no ar, 720 h no solo e 360 h na água (BAKER; GRANT, 2018).

Atualmente existem 9 biopesticidas registrados na EPA (Estados Unidos) que contam com o alho como um dos princípios ativos, sob os seguintes nomes comerciais: Allityn Insect Repellent; Anti-Pest-O Original Concentrate; Anti-Pest-O RTU; BacStop; Captiva Prime; Deer-Off Deer Repellant Concentrate; Feather Duster; Mildew Cure; No Moss (EPA, 2020). Esses produtos são utilizados primariamente para controle de pragas agrícolas na agricultura convencional e orgânica. O principal efeito é a repelência de artrópodes, pássaros e mamíferos como veados, coelhos e esquilos

das áreas de plantação, estufas, gramados, aterro sanitários, marinas, edifícios, galpões. Os produtos variam na composição, desde formulações apenas com óleo de alho ou suco de alho como princípio ativo, até mistura com outros óleos essenciais, capsaicina e azadiractina. No Brasil, há somente um pesticida produzido a partir de alho registrado. O produto, à base de extrato aquoso de alho, cujos princípios ativos são os mesmos presentes no óleo do alho, foi registrado como nematicida sob o nome comercial de Vigga pela empresa Omex (ANVISA, 2020).

Apesar do óleo de alho reunir características desejáveis para o desenvolvimento de novos produtos, algumas limitações devem ser superadas. A principal limitação diz respeito à baixa solubilidade em água e alta volatilidade. A fim de superar essas limitações, uma estratégia é a utilização de nanopartículas.

Carbon Dots (CDots)

Os Carbon dots, ou CDots, são nanoestruturas sólidas de carbono produzidas a partir de qualquer fonte orgânica através, principalmente, da queima controlada sob pressão. São estruturas quase esféricas constituídas por carbono e grupos funcionais baseados em nitrogênio e oxigênio como ácido carboxílico, amina e álcool (CHOI et al., 2018). Esses materiais são atraentes para uma gama de aplicações por possuírem luminescência, inércia química, biocompatibilidade, solubilidade em água, baixa toxicidade e ainda possuírem baixo custo de produção (TUERHONG; XU; YIN, 2017). Dentre as várias aplicações já reportadas, os CDots demonstraram potencial de serem usados como co-estabilizadores de emulsões (REN et al., 2019; TAN et al., 2015). Os CDots tem baixo custo de produção e podem ser utilizadas na formulação de uma infinidade de produtos (CHOI et al., 2018; LI et al., 2020). Possuem ainda fluorescência, permitindo que sejam facilmente localizadas no interior dos insetos e, portanto, que sejam identificados os prováveis locais de atuação dos componentes por eles carregados (TAN et al., 2015; TUERHONG; XU; YIN, 2017; ZHAO et al., 2015).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver formulações bioinseticidas a partir do alho para o controle vetorial de *Aedes aegypti*.

Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o óleo de alho ArboS187;
- Avaliar a atividade ovicida, larvicida, pupicida, repelente e adulticida do óleo de alho quimicamente caracterizado em *Ae. aegypti*;
- Avaliar a atividade larvicida e pupicida dos compostos isolados do óleo de alho e óleos de alho suplementados com diferentes proporções desses compostos;
- Estimar a atividade larvicida e pupicida do óleo de alho em diferentes tipos de recipientes;
- Avaliar a atividade larvicida, pupicida e repelente espacial do óleo de alho em testes em semi-campo;
- Avaliar o potencial ecotoxicológico do óleo de alho;
- Desenvolver nanoemulsões a partir do óleo de alho e Carbon dots;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões de óleo de alho em diferentes temperaturas de estocagem por 12 semanas;
- Avaliar a atividade da nanoemulsões de óleo de alho em ovos, larvas e pupas de *Ae. aegypti*;
- Escalonar as formulações em bancada;
- Escalonar em planta piloto a nanoemulsão mais promissora;
- Avaliar o potencial toxicológico da nanoemulsão de óleo de alho
- Avaliar a efetividade da nanoemulsão de óleo de alho em ensaio preliminar em campo.

MÉTODOS

Substâncias químicas e análise instrumental

O padrão do inseticida organofosforado temefós, o piriproxifeno, o óleo de alho sintético (ArboS187) e os compostos dissulfeto de dialila (DAS2) e trissulfeto de dialila (DAS3) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Suíça). Todos os solventes utilizados nos processos de extração e isolamento foram grau HPLC adquiridos da Sigma Aldrich ou JT Baker.

Os Carbon dots utilizados foram produzidos no Laboratório de Inorgânica e Materiais do Instituto de Química da Universidade de Brasília. A tecnologia de uso do CDot desenvolvida consta na patente “Nanoformulações biopesticidas baseadas em metabólitos secundários e micronutrientes, seu processo de obtenção e seu uso no controle de patógenos e pragas”, depositada junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o nº BR 10 2020 002179 6 em 31/01/2020, de titularidade da Fundação Universidade de Brasília (FUB) e da KrillTech Soluções Sustentáveis em Engenharia LTDA (KrillTech).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) foram adquiridos em espectrômetro Bruker Ascend II 600 MHz na Central Analítica do Instituto de Química da UnB (IQ/UnB). O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno. HPLC-UV Varian foi utilizado para cromatografia preparativa e HPLC-UV Waters foi utilizado nas análises analíticas, ambos do Laboratório de Farmacognosia/UnB.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/RP. As amostras foram solubilizadas em hexano para concentração final de 1,0 mg/mL e 1,0 µL de amostra foi injetado com Split de 4 na coluna DB-5MS (30 m x 25 mm x 25 µm). O gás de arraste foi o hélio, com fluxo de 1,3 mL/min e fluxo de purga de 3,0 mL/min. O gradiente de aquecimento foi de 3 °C/min de 60 °C a 120 °C e de 15 °C /min até 200 °C. A temperatura do injetor foi de 220 °C e a temperatura do detector de 250 °C na fonte de íons e 280 °C na interface. A aquisição foi iniciada com 2,0 min e a faixa de m/z foi de 35 a 400 m/z.

Manutenção da colônia de *Ae. aegypti* Rockefeller

As colônias de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller, são mantidas no Insetário

ArboControl (Laboratório José Elias de Paula/ Anexo do Laboratório de Farmacognosia /UnB) sem exposição a nenhum inseticida. Os mosquitos são mantidos a 28 ± 2 °C e $70 \pm 10\%$ Umidade Relativa (UR) em um fotoperíodo de 12 h. As larvas são criadas em água da torneira e alimentadas com ração de peixe. A alimentação dos insetos adultos é realizada com solução de açúcar a 10% impregnada em papel de filtro duas vezes por semana. Para alimentação das fêmeas, também é utilizado sangue equino três vezes por semana. Após repasto sanguíneo são inseridos papéis de filtro em recipientes com água nas gaiolas para que as fêmeas possam fazer oviposição. Os papéis com ovos são secos e escovados e os ovos são mantidos em ambiente com umidade controlada. Para eclosão, os ovos são pesados e inseridos em potes com água. Para sincronizar a eclosão, os recipientes são colocados em câmara de pressão reduzida. Em seguida, os ovos são transferidos para bandejas, onde dão origem às larvas, que são alimentadas com ração de peixes até o estágio de pupas. Para montagem das gaiolas são inseridas 1500 fêmeas para 500 machos. As larvas usadas nos testes são do 3º estágio, e as pupas com idade entre 2 h a 24 h.

Modificação do óleo de alho (semi-síntese)

O óleo ArboS187 foi modificado através da reação com enxofre elementar. A reação foi realizada com 509 mg de S_8 aquecido em balão até a fusão (aproximadamente 120 °C), seguido da adição de 3 mL de ArboS187. A reação foi mantida a 120 °C por aproximadamente 2 h. Esse procedimento foi baseado em síntese de polissulfetos já reportada (WANG et al., 2013). O novo óleo obtido foi analisado por GC-MS e HPLC-UV para comparar a diferença do teor dos polissulfetos em relação ao óleo original.

Isolamento dos polissulfetos

Trissulfeto de dialila (DAS3), tetrassulfeto de dialila (DAS4) e pentassulfeto de dialila (DAS5) foram isolados a partir do óleo de alho semissintético Arbo2A170A através de HPLC/UV (210 nm) preparativo utilizando equipamento Varian ProStar. Uma coluna Phenomenex Luna C18(2) (5 μ m, 150 x 21.2 mm) foi utilizada com fase móvel isocrática de 90% metanol por 30 min a 10 mL/min, monitorada a 210 nm. Para o procedimento, 1,0 mL do óleo de alho modificado Arbo2A170A foi solubilizado em

9,0 mL de etanol. Para cada corrida, foram injetados 500 µL desta solução. Foram coletados os picos em 7'; 9'; 10,3'; 13,3'; 17,7'e 23,8'. A cada corrida as frações coletadas eram estocadas em freezer e protegidas com papel alumínio. Os picos coletados foram injetados em coluna analítica SunFire C18 5µm 4,6 x 250 mm (90% metanol, 1 mL/min, 15 min, 210 nm) para avaliação do perfil. Os picos com bom perfil de separação foram extraídos de 3 a 4 vezes com 50 mL de hexano em funil de separação. A porção orgânica (superior) foi coletada e sulfato de sódio anidro utilizado para retirada de água residual. Após filtração, as amostras foram concentradas em rotaevaporador, transferidas para frascos pré-pesados e o solvente residual evaporado por N₂. Em seguida, uma alíquota das amostras foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e analisada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (NMR ¹H). Os dados de NMR foram comparados com a literatura para confirmação da estrutura molecular (Wang et al., 2013).

Avaliação do efeito do solvente nos polissulfetos isolados

Os polissulfetos (DAS2-DAS5) foram diluídos em DMSO para testes biológicos e analisados por HPLC. A análise das soluções recém-preparadas mostrou que DAS4 e DAS5 se tratavam de uma mistura de polissulfetos. Portanto, foi realizado experimento para avaliar o efeito do DMSO na estabilidade dos polissulfetos de dialila.

O DAS4 se mostrou instável na diluição com DMSO e foi selecionado para estudos mais aprofundados. Para as análises, soluções de DAS4 em metanol, em 50% de DMSO e 50% de DMSO-d₆ foram analisadas assim que preparadas e ao longo do tempo para avaliação do efeito de instabilidade. A seguir, novas soluções de DAS4 em 50% de DMSO, 25% DMSO, 10% DMSO e 1% DMSO foram preparadas e avaliadas ao longo do tempo. Da mesma maneira, o efeito da dissolução em 50% de DMF (dimetilformamida) também foi avaliado. Em seguida, soluções de DAS2, DAS3, DAS5 e óleo de alho ArboS187 em metanol e 50% de DMSO também foram avaliadas ao longo do tempo.

As avaliações em HPLC foram realizados em coluna SunFire C18 (5 µm 4.6 x 250 mm) com sistema eluente isocrático de 90% metanol por 15 min a 1 mL/min e detecção de picos a 210 nm. A área de pico dos polissulfetos foi comparada entre os diferentes tratamentos e tempos. A % de área de pico foi expressa em relação à área de pico inicial de cada composto.

Atividade larvicida e pupicida

Os ensaios de *screening* larvicida e pupicida são realizados em placas de 12 poços contendo 10 larvas L3 ou 5 pupas e 3 mL de água por poço. Em seguida, as amostras promissoras são testadas em copos plásticos contendo 10 larvas L3 ou 10 pupas com 20 mL de água por copo ou em copos plásticos com 200 mL de água e 25 larvas L3 ou 25 pupas, para determinação da concentração letal média (CL₅₀). A quantidade de amostra adequada é solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido < 2%) que é também utilizado como controle negativo de todos os experimentos. A temperatura do ambiente é controlada (25 °C a 28 °C) e com fotoperíodo de 12 h. A atividade larvicida é observada a cada 24 h, até 72 h. A atividade pupicida/ inibição de emergência de adultos é observada após a completa eclosão de adultos em todas as réplicas do controle negativo. Temefós foi utilizado como controle positivo para ensaios larvicidas. As larvas, pupas e mosquitos que não reagem a estímulos mecânicos e luminosos são considerados mortos.

Em todos os ensaios larvicidas, o teste é invalidado caso 20% das larvas passem para o estágio de pupa. Se a mortalidade do controle estiver entre 5 e 20%, a mortalidade é corrigida de acordo com a fórmula de Abbott. As porcentagens da mortalidade de larvas e pupas de cada uma das replicatas foram inseridas no software GraphPad Prism 7 para cálculo da CL₅₀ e CL₉₀ em um intervalo de confiança (IC) de 95%. Para determinação da atividade larvicida e pupicida de cada amostra, foram realizadas três réplicas usando diferentes lotes em diferentes períodos e os resultados foram calculados considerando-se todos os dados obtidos por concentração.

De acordo com o guia da OMS, os testes que apresentarem mortalidade > 5% no controle negativo devem ser corrigidos pela fórmula de Abbott e os testes que apresentarem mortalidade > 20% devem ser descartados.

Fórmula de Abbott:

$$\text{Mortalidade corrigida \%} = \frac{(X-Y)}{X} \times 100$$

em que X = % de sobrevivência no controle negativo e Y = % de sobrevivência nas amostras testadas.

Nos experimentos em que houve variação de concentrações e diferentes amostras foi realizada análise de variância (ANOVA) bidirecional com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. No caso em que não houve variação de

concentração, foi utilizada ANOVA unidirecional. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados que variaram com nível de significância inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Efeito do recipiente na atividade larvicida e pupicida

Em todos os experimentos foram utilizadas larvas L3 e pupas com até 24 h de vida de *Ae. aegypti* Rockefeller. Todos os testes foram realizados em laboratório com fotoperíodo de 12 h, temperatura e umidade controlados. Tanto para larvas quanto para pupas, foram testadas placas de 12 poços com e sem tampa, copos pequenos com 20 mL de solução e copos grandes com 200 mL de solução. Os testes foram realizados em quadruplicata e repetidos com três diferentes lotes de larvas e pupas. Os volumes de água e quantidade de insetos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Para padronizar as concentrações utilizadas entre todos os recipientes testados, a solução original do óleo de alho ArboS187 em DMSO (< 2%) foi diluída na água do teste em balões volumétricos e os diferentes volumes transferidos para os recipientes conforme Tabela 1. Os testes com os diferentes recipientes foram todos realizados no mesmo dia com o mesmo lote de larvas, e repetido com 3 diferentes lotes (Figura 3). Estudos preliminares foram desenvolvidos para determinação do intervalo de concentrações usadas para os ensaios larvicidas e pupicidas padronizados. Foram testadas seis concentrações para larvas (4,8 ppm; 2,4 ppm; 1,8 ppm; 1,2 ppm; 0,8 ppm e 0,4 ppm) e cinco concentrações para pupa (60,0 ppm; 50,0 ppm; 40,0 ppm; 30,0 ppm e 5,0 ppm). Para larvas, foi observada mortalidade após 24 h, 48 h e 72 h. Para pupas foi observada a mortalidade de pupas e mosquitos, assim como o número de mosquitos adultos viáveis somente após eclosão de todos os adultos no controle.

Os dados de mortalidade obtidos foram analisados por regressão não-linear no Graph Prism e por probit no software R com o script desenvolvido por grupo de pesquisa francês (MILESÍ; POCQUET; LABBÉ, 2013). Para comparação da atividade entre os diferentes recipientes, foi realizada análise de variância (ANOVA) bidirecional com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados que variaram com nível de significância inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros utilizados para os testes de padronização do método de avaliação de atividade larvicida e pupicida.

| Recipiente | Volume de água | Nº de larvas/ pupas por replicata*** | Nº total de larvas/ pupas testados*** |
|-----------------|----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Placa com tampa | 3 mL | 10/ 5 * | 120/ 60 ** |
| Placa sem tampa | 3 mL | 10/ 5 * | 120/ 60 ** |
| Copo pequeno | 20 mL | 10 | 120 |
| Copo grande | 200 mL | 25 | 300 |

*Para pupas também foram testadas 5 pupas por replicata, tanto nas placas abertas quanto nas fechadas. **Para placas com 5 pupas foram testados no total 60 pupas por concentração. *** Número de indivíduos testados por concentração.



Figura 3. Montagem dos recipientes de teste. Diluição da amostra em balão volumétrico, separação e contagem de larvas e pupas e fechamento dos recipientes com tecido.

Para detecção do óleo de alho na água do teste, uma solução única de ArboS187 foi preparada e transferida para os diferentes recipientes estudados. Para o procedimento, 20 mg de óleo ArboS187 foi pesado, solubilizado em 4 mL de DMSO e em seguida diluído em 4 litros de água em dois balões volumétricos de 2 L cada. A solução foi transferida para os diferentes recipientes com os seguintes volumes: 200 mL de solução em copo grande, 120 mL de solução em copo grande, 20 mL de solução em copo pequeno, 3 mL de solução por poço em placa de 12 poços com ou sem tampa. Foram montados os recipientes em triplicata para cada tempo de exposição avaliado. Imediatamente após a transferência dos volumes, uma alíquota de 20 mL de cada recipiente foi retirada e mantida em frasco de vidro tampado em geladeira até o processamento. Para a placa de 12 poços, todo o conteúdo da placa

foi transferido para outro recipiente do qual foram coletados 20 mL de solução. O mesmo procedimento foi realizado após 4 h e 24 h de montagem dos recipientes.

Para concentração do óleo, os 20 mL de solução foram eluídos em cartuchos de SPE (do inglês *Solid Phase Extraction*) C₁₈, que foram em seguida eluídos com 2 mL de metanol. A solução metanólica recuperada foi então filtrada em filtro de seringa de politetrafluoroetileno (PTFE) hidrofóbico 0,22 µm e avaliado por HPLC. Para a análise, foi utilizada coluna Phenomenex Kinetex 2,6 µm EVO C18 250 x 4,6 mm utilizando gradiente : 80-100% metanol (0-8 min), 100% (8-10 min), 100-80% (10-12 min), 80% (12-15 min) com detecção a 215 nm. O volume de injeção de todas as amostras foi de 10 µL. A área de pico de DAS3, eluição a aproximadamente 5,1 min, foi utilizada para comparação entre os diferentes tempos e recipientes. A análise de variância (ANOVA) com pós-teste Tukey foi utilizada para comparação das áreas de pico dos recipientes ao longo do tempo.

Atividade dos polissulfetos isolados e óleos de alho modificados

Os polissulfetos foram diluídos em etanol (<2,0% em água) e testados em placas de 12 poços contendo 3 mL de solução e 10 larvas ou 5 pupas. Para determinação da CL₅₀ os compostos foram testados a 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,63 e 0,31 ppm para larvas e 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,13 e 1,56 ppm para pupas. Um total de 240 larvas e 120 pupas foram expostas aos tratamentos, em quadruplicata. O óleo de alho ArboS187 foi suplementado com DAS2, DAS3, DAS4 e DAS5 (50% p/p) individualmente e testado em larvas e pupas nas mesmas concentrações que os compostos isolados. Etanol foi utilizado para solubilizar os óleos na água e também foi usado como controle negativo (<2,0% de etanol em água). As CL₅₀ foram calculadas para cada amostra utilizando GraphPad Prism 8. As curvas dose-resposta foram comparadas utilizando o teste de análise de variância seguido de teste Dunnett para comparar a atividade das amostras com a atividade do óleo de alho original.

Soluções estoque em etanol dos polissulfetos isolados, do óleo de alho original (ArboS187) e dos óleos de alho suplementados foram monitoradas por HPLC durante todo o experimento com larvas e pupas. Uma coluna SunFire C18 (5 µm 4.6 x 250 mm) foi utilizada com sistema eluente isocrático de 90% metanol por 15 min a 1 mL/min e detecção de picos a 210 nm.

Atividade larvicida e pupicida em condições de semi-campo

As concentrações referentes à concentração letal para 80% dos indivíduos (CL₈₀), à concentração letal para 90% dos indivíduos (CL₉₀) e a menor concentração que causou 100% de mortalidade de larvas ou pupas foram testadas em condições de semi-campo. Para os testes, 50 larvas L3 ou 50 pupas com menos de 24 h foram contadas e adicionadas em baldes plásticos contendo 8 litros de água da torneira. Os animais foram mantidos nos baldes por 2 h para aclimatação antes da adição das amostras. O óleo de alho ArboS187 foi pesado e solubilizado em DMSO (< 2%), e 10 mL dessa solução foi pipetada em cada balde a fim de obter a concentração final desejada. Os baldes foram mantidos na área externa do Insetário do Laboratório de Farmacognosia, área com cobertura, cobertos com tela e dispostos de maneira aleatória. Um termo higrômetro foi mantido em um dos baldes controle (0,125% de DMSO) para acompanhamento da temperatura e umidade durante cada experimento. A leitura da atividade larvicida foi realizada após 24 h, 48 h e 72 h. Já para a atividade pupicida, os baldes foram monitorados até que todas as pupas virassem adultos ou morressem, quando era realizada a leitura final. Foi realizado controle positivo para larvas com temefós a 0,013 ppm.

Atividade ovicida

Para os ensaios da atividade ovicida foram utilizadas diferentes seções de papel de oviposição contendo aproximadamente 100-200 ovos de *Ae. aegypti* estocados de 1 a 2 meses. As seções de papéis foram fotografadas antes do início do experimento para posterior contagem dos ovos utilizando o software ImageJ (Figura 4). Os papéis foram submersos nas soluções de teste de óleo de alho ArboS187 em DMSO a 100 ppm, óleo de alho ArboS187 em CDot a 100 ppm, controle negativo de DMSO (concentração < 1%) e solução aquosa de CDot. Os papéis com os ovos permaneceram nessas soluções por 48 h e foram transferidos para solução de água limpa para estímulo de eclosão. Para a eclosão forçada, os recipientes foram inseridos em um dessecador a baixa pressão por 30 min. As larvas recém eclodidas foram alimentadas com ração de peixe e contadas após 48 h. Tanto as larvas eclodidas espontaneamente quanto as larvas advindas de eclosão forçada foram contabilizadas. O número total de larvas vivas e a quantidade inicial de ovos contados através do

ImageJ foram utilizados para calcular a taxa de mortalidade corrigida utilizando a fórmula de Herderson-Tilton (HENDERSON; TILTON, 1955):

$$mort = \left(1 - \frac{n \text{ inicial no Co} * n \text{ final no T}}{n \text{ final no Co} * n \text{ inicial no T}} \right) * 100$$

em que mort = mortalidade corrigida; n inicial no Co = número de ovos no controle; n final no Co = número de larvas vivas no controle ao final do experimento; n inicial no T = número de ovos no tratamento, n final no T = número de larvas vivas no tratamento ao final do experimento .

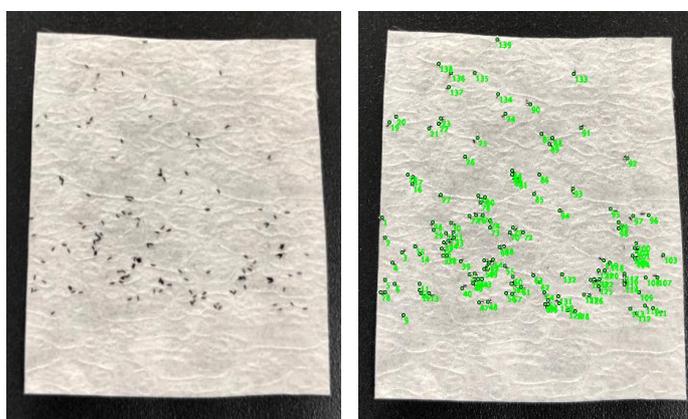


Figura 4. Contagem de ovos nas seções de papéis de oviposição utilizando software ImageJ.

Atividade em adultos

Ensaio preliminares da atividade repelente e adulticida do alho foram realizados no Laboratório de Farmacognosia e sinalizaram atividade interessante. Portanto, o óleo de alho ArboS187 foi testado pela mestrandia Natália Mendes Gomes durante período de capacitação na *University of Notre Dame*, Estados Unidos, em 2019, no âmbito do projeto CAPES PrInt.

Os testes foram realizados com fêmeas de *Ae. aegypti* (Liverpool), com colônia estabelecida na *University of Notre Dame*, em Laboratório coordenado por Dra. Nicole Achee e Dr. John Grieco (South Bend, Indiana, Estados Unidos). Os mosquitos foram mantidos a 27 °C, 80% UR, com fotoperíodo de 12 h. Grupos de fêmeas de 4 a 7 dias de vida foram separados em recipientes e alimentadas com solução açucarada 10% até o dia anterior ao teste. Para o teste de Irritação por Contato (IC), foram utilizados

10 ± 2 mosquitos para cada replicata; para Repelência Espacial (RE), 20 ± 2 mosquitos; e para toxicidade 25 mosquitos por replicata.

Para os testes no HITSS (*High-throughput screening system*), as soluções a 1% (v/v) com ArboS187 (1,5 mL) foram aplicadas de maneira uniforme em redes de 275 cm² com auxílio de uma micropipeta (Figura 5). Esta concentração foi baseada em estudos anteriores com repelentes (GRIECO et al., 2007; JOHN P. GRIECO et al., 2005; NICOLE L. ACHEE et al., 2009) e testes pilotos realizados no Laboratório de Farmacognosia da UnB. A rede controle foi tratada com 1,5 mL de etanol, solvente em que foi diluída a amostra. A rede foi seca por 20 min antes de ser inserida no cilindro de metal interno do HITSS. Novas redes foram tratadas antes da quinta replicata para RE; e uma nova rede antes do teste de IC. A temperatura da sala de teste teve uma média de 24 °C e 37% de umidade relativa do ar. Os testes foram repetidos no mesmo aparato no Laboratório de Farmacognosia da UnB com a linhagem Rockefeller utilizando as concentrações de 7,5% (v/v), 5,0 (v/v), 2,5% (v/v) e 1,5% (v/v). As concentrações foram determinadas seguindo estudos preliminares para observação da atividade repelente.

O aparato foi lavado ao final de cada dia de teste. As partes que tiveram contato direto com as redes tratadas foram lavadas com acetona e as demais com detergente (Liqui-Nox, Alconox, New York, NY; Extran). Todos os componentes foram secos à temperatura ambiente *overnight*.

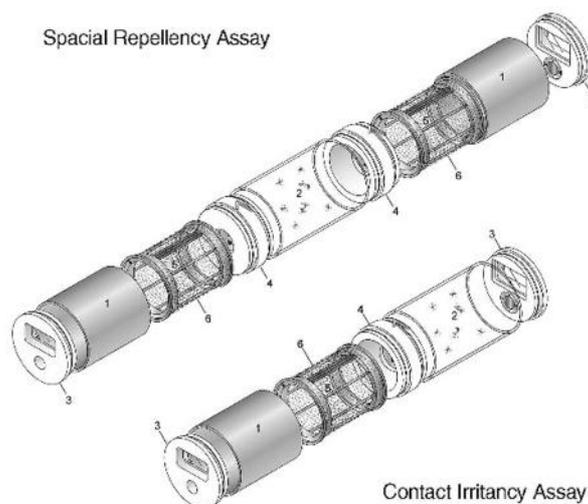


Figura 5. Desenho esquemático de um high-throughput screening system (HITSS). Configurações para repelência espacial (acima), e irritação por contato (abaixo). Componentes: 1) cilindro de tratamento; 2) cilindro transparente; 3) tampa lateral; 4) conectores; 5) cilindro de metal interno; 6) rede de tratamento (GRIECO et al., 2007).

Repelência espacial

O cilindro transparente (Figura 5, aparato superior) foi conectado lateralmente a dois cilindros de metal, através dos conectores, que facilitam a movimentação dos mosquitos em direção às extremidades do aparato. Grupos de 20 mosquitos foram introduzidos no cilindro transparente, com as válvulas dos conectores fechadas, e repousaram por 30 segundos. Em seguida, as válvulas foram abertas por 10 min. Após esse tempo, as válvulas foram fechadas e contou-se o número de mosquitos em cada cilindro metálico. O número de mosquitos que apresentaram *knockdown* (KD) nos três cilindros foi observado. Mosquitos foram considerados KD quando posicionados lateralmente e incapazes de se levantar quando o aparato era movimentado. Foram realizadas nove replicatas para cada solução. PMD (p-mentano-3,8-diol), um biopesticida derivado de eucalipto foi utilizado a 20% (v/v) como controle positivo.

A repelência espacial foi expressa pelo índice de repelência espacial (SAI, *spatial activity index*). O SAI é calculado a partir da fórmula $SAI = (N_c - N_t) / (N_c + N_t)$, sendo N_c o número de fêmeas no cilindro controle; e N_t , no cilindro com o tratamento. Este índice representa a proporção de fêmeas que não entraram no cilindro com tratamento em relação ao número total de mosquitos que transitaram livremente durante o experimento. Essa razão varia de -1 a 1. Zero indica que não houve resposta; -1 indica que todos os mosquitos entraram no cilindro com tratamento, ou seja, houve um efeito atrativo; e 1 indica que todos os mosquitos ficaram no cilindro controle, resultando em atividade repelente espacial.

Calculou-se ainda o índice de atividade espacial ponderada (wSAI, *weighted spatial activity index*), que é obtido multiplicando-se o percentual de mosquitos que apresentam alguma resposta (PRESP) pelo SAI ($wSAI = PRESP * SAI$). O percentual de resposta (PRESP) é calculado por: $((N_c + N_t) / N) * 100$, sendo N o número de mosquitos inserido no cilindro central no início do experimento. O wSAI, representa a magnitude do efeito repelente ou atrativo, enquanto o SAI diz respeito à existência ou não de um movimento direcional.

Os dados foram analisados por um teste não paramétrico de postos com sinais (signed-rank) (PROC UNIVARIATE, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 2012-2018) para determinar se a média do SAI e do wSAI de cada tratamento foi diferente de zero.

Irritação por contato

Um cilindro transparente foi conectado a um cilindro de metal com tratamento utilizando-se um conector, para se obter uma unidade de teste (Figura 5, aparato inferior). Grupos de 10 mosquitos foram introduzidos na porção metálica, onde repousaram por 30 segundos. A válvula borboleta do conector foi aberta por 10 min, e então fechada. O número de mosquitos em cada porção do aparato foi anotado, bem como o número de indivíduos KD. Foram realizadas 6 replicatas para cada tipo de tratamento, utilizando-se a mesma rede tratada para o teste de repelência espacial. Um controle somente com veículo foi realizado ao mesmo tempo para cada experimento. PMD a 20% (v/v) foi utilizado como controle positivo.

Os dados foram analisados usando o teste Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 2012-2018) para avaliar a diferença entre o número de mosquitos que escapam dos cilindros controle e teste. Obteve-se o percentual médio de escape no tratamento, corrigido pelo escape no controle e KD no cilindro metálico de tratamento.

Toxicidade de mosquitos adultos

O efeito adúlticida da amostra foi investigado de acordo com a diretriz para avaliar a resistência a inseticida em vetores usando o bioensaio com garrafa (CDC, 2010). Foram utilizadas garrafas Wheaton 250 mL tampadas com papel alumínio. As garrafas e o papel alumínio, utilizado como tampa, foram impregnados com 1 mL de solução 1% (v/v) do óleo de alho em etanol, e guardadas ao abrigo de luz *overnight* em uma capela de fluxo laminar vertical. Grupos de 25 fêmeas foram inseridas nas garrafas, em quadruplicata (n=100) e o número de mosquitos KD (*knockdown*) foi observado a cada 5 min na primeira hora de experimento e a cada 15 min na segunda hora. Após observar-se que todos os mosquitos estavam KD, estes foram transferidos para frascos, com auxílio de um aspirador mecânico, onde receberam solução açucarada por 24 h. Ao fim deste período, observou-se a taxa de mortalidade. Com o experimento, obteve-se o tempo e a dose diagnóstica (CDC, 2010). Reporta-se a taxa de KD em 30 min de experimento e a taxa de mortalidade após 24 h.

Atividade de repelência espacial em condições de semi-campo

Um ensaio de repelência espacial escalonado foi conduzido em condições de semi-campo. O desenho experimental se assemelha ao aparato HITSS utilizado nos testes de repelência espacial (Figura 5). No experimento, duas salas de 10 m³ localizadas no Insetário do Laboratório de Farmacognosia foram conectadas por um tubo que permite o fluxo de mosquitos durante o experimento (Figura 6). Dentro das salas, o tubo é englobado por uma gaiola de cada um dos lados, evitando que os mosquitos voem livremente pela sala. Em uma das salas de teste, foi posicionado um difusor ultrassônico de óleos essenciais contendo 300 mL de água e 150 µL de óleo de alho. Na outra sala controle foi adicionado um humidificador de ambiente contendo apenas água. As salas possuíam suas respectivas portas e ainda eram separadas por um corredor de 1,3 metros. Grupos de 20 ± 8 fêmeas foram utilizadas para cada uma das 9 replicatas. A solução teste foi renovada antes da execução da sétima replicata. Fêmeas com 5 dias de vida foram inseridas no tubo central que conecta as duas salas. Após aclimatação de 30 segundos, os mosquitos foram liberados do tubo central para se movimentarem ao longo do aparato e das salas. Após 15 min, o número de mosquitos vivos e *knockdown* foram contados ao longo das seções do aparato (sala controle, sala tratada e tubo central). Assim como o teste de repelência no HITSS, os valores de SAI, wSAI e PRESF foram determinados.

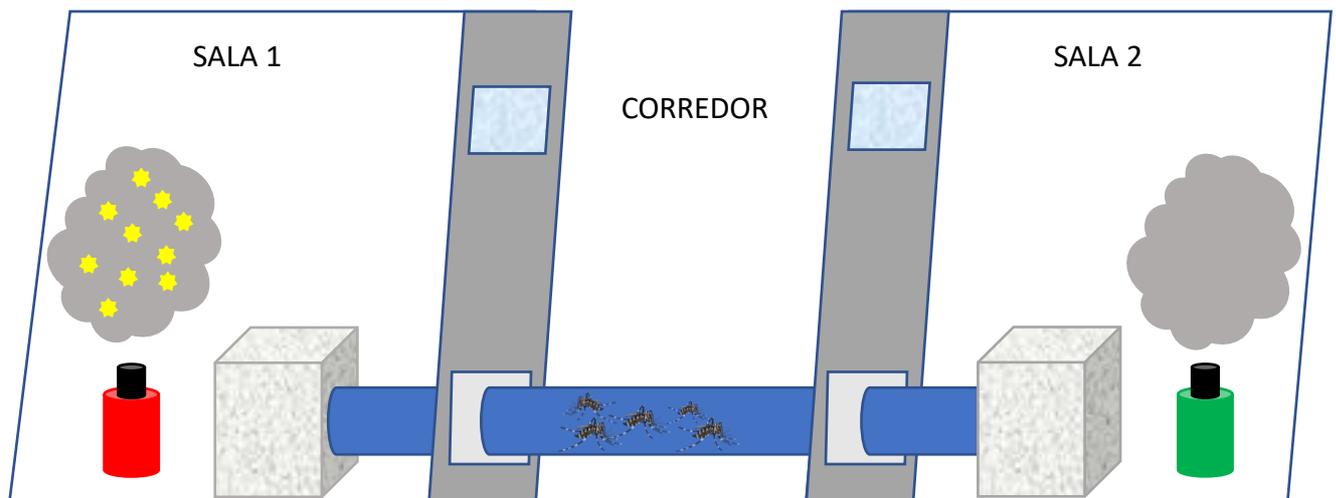


Figura 6. Esquema de experimento de repelência espacial em condições de semi-campo. A sala 1, onde encontra-se um difusor com óleo de alho, é conectada à sala 2, em que somente é dispersada água, através de um tubo (em azul) (DUSI et al., 2022).

Avaliação ecotoxicológica do óleo de alho ArboS187 – embriotoxicidade de peixe-zebra (*Danio rerio*)

Esse estudo foi conduzido no Laboratório de Genética Toxicológica (G-Tox) da Universidade de Brasília - UnB, onde os peixes adultos são mantidos em um sistema recirculante de água automatizado, abastecido com água filtrada por carvão ativado e aerada para eliminação de cloro (ZebTec, Tecniplast, Itália). As características físicas e químicas do sistema são mantidas em: pH 7,2 - 7,6; dureza 6.7 °dH; temperatura de 26 ± 1 °C; condutividade 728 μ S. A sala de aquários dispõe de um fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os peixes são alimentados de duas a três vezes ao dia com a ração comercial (SERAVipan©; Tetramin©) e náuplios (larvas) de *Artemia salina*.

Para a obtenção de embriões, grupos de peixes machos e fêmeas, na proporção de 2:1, respectivamente, foram colocados em um aquário de reprodução (iSpawn-Tecniplast, Itália), no dia anterior ao teste, separados por uma barreira. O fundo do aquário de desova é equipado com uma rede para evitar a predação dos embriões pelos adultos. No dia posterior à preparação do aquário de reprodução a barreira foi retirada pela manhã cinco min antes das luzes da sala de cultivo acenderem, permitindo, assim, o contato entre os peixes machos e fêmeas e, conseqüentemente, a desova. Foi respeitado o intervalo de desova entre 30 - 120 min e posteriormente os peixes adultos foram recolhidos e devolvidos para o sistema de cultivo. A água dos aquários foi filtrada por uma peneira para a separação dos ovos, os quais foram lavados para remoção de restos de fezes e alimento. Posteriormente foi feita uma primeira triagem dos ovos viáveis a olho nu, seguida de uma seleção criteriosa dos ovos fertilizados ao estereomicroscópio (Sterioscopic STEMI 2000 - Zeiss). Por fim, esses foram distribuídos, um ovo por poço, em microplacas de 96 poços, contendo as diferentes soluções teste do óleo de alho ArboS187.

Os ensaios com embriões foram baseados no protocolo para avaliação de toxicidade da OCDE: *Fish Embryo Toxicity – FET test* – (OECD nº 236, 2013). Após o recolhimento dos ovos dos aquários de acasalamento, os mesmos foram lavados e distribuídos imediatamente em microplacas com soluções de óleo de alho ArboS187 para garantir o início da exposição nos estágios iniciais. Soluções de ArboS187 nas concentrações de 1; 2; 3,9; 7,7; 15,2; 30; 59,2 e 100 ppm foram utilizadas. A exposição foi realizada em microplacas de 96 poços com 250 μ L de cada concentração. Os testes foram condicionados em uma câmara climática com condições idênticas a sala

de cultivo. As soluções de óleo de alho em DMSO e dos controles negativos foram preparadas com a água de cultivo de peixe-zebra. Todos os testes foram feitos em triplicata com um total de 60 organismos por concentração. A duração dos testes foi de 96 h.

Na fase de embrião foi avaliada a mortalidade antes e após a eclosão (coagulação dos ovos e morte de embriões). Ademais, foram avaliadas alterações em parâmetros de desenvolvimento embrionário como: formação do otólito, pigmentação do corpo e olhos, formação dos somitos, presença de batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelino, edema, acúmulo de hemácias, líquido amniótico, absorção do saco vitelino, formação do telencéfalo e eclosão. Após a eclosão foram avaliados: pigmentação do corpo e olhos, batimento cardíaco, edema, acúmulo de hemácias, absorção do saco vitelino, inflação da bexiga natatória, malformações da cauda, resposta ao estímulo mecânico (equilíbrio, definido como o embrião deitado lateralmente no fundo do poço da microplaca).

O pacote estatístico Sigma Plot 12.5 foi utilizado para análises estatísticas. As concentrações efetivas (CE_{50}) foram calculadas usando uma função de decaimento alostérico não linear em uma planilha construída sobre o Microsoft Excel. A ANOVA unidirecional foi utilizada para detectar as diferenças entre os grupos para os conjuntos de dados normalmente distribuídos. O teste de *Dunnett* ou *Dunn* (para testes paramétricos ou não paramétricos, respectivamente) foi utilizado para detectar diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle ($p < 0,05$).

Nanoemulsões com CDot

CDots produzidos pelo Laboratório de Inorgânica e Materiais (LIMA) do Instituto de Química da UnB foram utilizados. O óleo de alho ArboS187 foi adsorvido no CDot em pó e em seguida foi diretamente solubilizado em água, sem necessidade de uso de DMSO ou qualquer outro solvente. Para o procedimento, 50 mg de CDot com quantidades variadas de óleo de alho foram diluídos em 1 L de água. Foi realizado experimento larvicida e pupicida com a mistura de CDot para comparação da atividade com o óleo solubilizado em DMSO. Larvas tratadas com soluções de CDot foram observadas em microscópio óptico com luz ultravioleta no Laboratório de Microscopia, no Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa.

As nanoemulsões foram produzidas utilizando dispersores Ultra Turrax IKA T25 disponibilizados pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos do Instituto de Química da UnB. Para o desenvolvimento e otimização das emulsões, diferentes parâmetros foram avaliados. Dentre os parâmetros estudados estão as condições experimentais como: temperatura, tempo, tipo e velocidade de agitação. Quanto aos materiais de partida, foram estudados a ordem de adição dos componentes, sua proporção na formulação, escolha de solvente e do sistema tensoativo.

Escalonamento em bancada e escala piloto

Testes de escalonamento em bancada foram realizados para duas nanoformulações. Ambas reações foram escalonadas para volume final de 200 mL, aproximadamente 15 vezes o volume obtido no desenvolvimento das formulações. Nos testes de escala piloto, o mesmo agitador Ultra Turrax IKA T25 da etapa anterior foi utilizado. Para a formulação 87, foi realizado um sistema em triplicata, sendo incorporado o CDot líquido 1 no sistema tensoativo, enquanto o CDot líquido 2 foi utilizado em três diferentes nanoemulsões (formulações 125, 126 e 127) com pequenas alterações na quantidade de solvente presente. Os CDot líquido 1 e 2 são preparações líquidas das nanoestruturas de carbono cujas diferenças residem em sua síntese, protegida por patente e segredo industrial da *spin-off* Krilltech e do grupo de pesquisa do LIMA. Após o escalonamento de bancada, testes de escalonamento no reator foram realizados utilizando os melhores parâmetros observados em bancada. Para tal, foi montado uma planta piloto, e todo o sistema foi montado a partir do reator de 40 L, como visto na Figura 7. O primeiro teste foi desenvolvido usando óleo de soja (apenas para observar alguns parâmetros reacionais) e o segundo teste foi realizado com o óleo de alho. Ambas reações foram realizadas com sistema tensoativo com CDot líquido 2 para obtenção de 19 litros de formulação, 450 vezes o volume trabalhado inicialmente. A fim de se obter produto para os testes em campo, que serão descritos em próxima sessão, foi realizado escalonamento com sistema tensoativo com CDot líquido 1, com obtenção total de 150 litros de formulação.



Figura 7. Planta piloto para escalonamento industrial das nanoformulações desenvolvidas.

Estudo de estabilidade das formulações

As emulsões óleo em água produzidas foram caracterizadas utilizando analisador de tamanho de partículas Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), equipado com laser He-Ne 633 nm de 4 mW e um detector de fotodiodo de avalanche. As avaliações de estabilidade foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB. Os dados de dispersão foram coletados a 25 °C e processados usando software incorporado a fim de se obter a faixa de tamanho das gotas dispersas na emulsão, bem como sua distribuição de tamanho. O preparo de amostra para essas análises consistiu na diluição de 10 µL da emulsão para 10 mL de água para determinação do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão. Para aferição do potencial zeta, o mesmo fator de diluição foi utilizado para dispersão em solução 1 mM de NaCl.

A estabilidade das formulações foi avaliada por meio de monitoramento do tamanho e distribuição de tamanho das partículas em função do tempo. As análises foram realizadas 24 h após sua produção e após 1, 2, 4 e 12 semanas estocadas a temperatura ambiente, sob resfriamento em geladeira e sob aquecimento em estufa a 55 °C. Amostras estocadas por 4 semanas ao ar livre sob incidência solar intensa também foram estudadas.

Para avaliação cromatográfica, foi realizado estudo para padronização do método de análise. Para isso, foram avaliados parâmetros para dissolução das

amostras como solvente, volume de diluição, tipo de filtro, coluna cromatográfica, seleção de comprimento de onda de análise e gradiente de eluição.

Outro parâmetro de observação da estabilidade das formulações consistiu na avaliação da atividade larvicida e pupicida das mesmas após estocagem. A avaliação da atividade biológica seguiu os critérios estabelecidos pela OMS já descritos anteriormente. As formulações foram solubilizadas em água em balão volumétrico, sendo preparadas diluições seriadas que foram transferidas para os recipientes para testagem. Formulações recém preparadas e estocadas a temperatura ambiente foram submetidas à ensaios para determinação da CL₅₀.

Avaliações toxicológicas da nanoformulação de óleo de alho

Ensaio toxicológico da nanoformulação de óleo de alho desenvolvida neste trabalho e aplicada nos ensaios de campo foram realizados pela empresa Ecolyzer, pertencente à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas). O produto foi submetido à determinação de toxicidade aguda oral e toxicidade aguda dermal em ratos albinos (*Rattus norvegicus*) segundo protocolos OECD 420:2002 e 402:2017. Os ratos recebem, por via oral ou dermal em dose única, uma das seguintes doses: 5, 50, 300 e 2.000 mg/kg de peso vivo. São observados diariamente quanto à letalidade, alterações comportamentais, sinais clínicos e achados anatomopatológicos macroscópicos ao final do experimento.

O teste de curta duração para danos oculares foi realizado *in vitro*, utilizando células Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC) segundo protocolo OECD 491. As células são cultivadas em microplacas de 96 poços e expostas ao produto por cinco min. A citotoxicidade é então avaliada utilizando o ensaio de MTT. Para o teste o produto foi diluído na proporção de 0,5 mL/L em água e aplicado nas concentrações de 5% e 0,05% em solução a 0,9% de NaCl. Os testes foram realizados em triplicata em três repetições independentes.

No ensaio de sensibilização dérmica foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem CBA/J segundo protocolo OECD 442B. O protocolo consiste na aplicação tópica do produto da seguinte forma: dia 1 a 3 - aplicação de 25 µL de produto no dorso de cada orelha; dia 4 - sem aplicação; dia 5 – aplicação de 0,5 mL da solução de BrdU por via intraperitoneal; dia 6 – pesagem, avaliação clínica, eutanásia e retirada dos linfonodos auriculares. Os linfonodos são processados para

obtenção de uma suspensão celular que é avaliada em placas de 96 poços em leitor de ELISA com comprimento de onda de emissão de 370 nm e 492 nm de referência. O BrdU é um análogo da timidina incorporado ao DNA das células em proliferação. Para a leitura, é utilizado um anticorpo específico para BrdU marcado com peroxidase.

Os testes de irritação e corrosão dérmica foram realizados *in vitro* segundo protocolo OECD 439 e 431, respectivamente, utilizando um tecido artificial de epiderme humano reconstruída (Reconstructed Human Epidermis - RHE). Para irritação dérmica os tecidos foram expostos topicamente ao produto diluído na proporção de 0,5 mL/L, enxaguados 25 vezes com 1 mL de PBS estéril e incubados por 42 h para posterior avaliação de viabilidade celular.

Ensaio preliminar em campo

Um ensaio preliminar de campo com a nanoformulação escalonada de óleo de alho com CDot foi realizado no Instituto Central de Ciências da Universidade de Brasília. No estudo, o monitoramento da presença dos vetores foi realizado antes e após o início de aplicação do produto desenvolvido nesta tese. O prédio foi dividido em três seções (Ala Norte, Ala Central e Ala Sul) que também foram comparadas ao longo de todo experimento. A pesquisa teve autorização pelos setores responsáveis pelo edifício, que foram orientados a proceder com o controle vetorial convencional em todo o prédio. Ainda, foi solicitado registro e disponibilização dos dados de todas as ações com uso de pesticida no prédio durante o período da pesquisa. A Ala Norte foi selecionada para receber, adicionalmente, o produto desenvolvido nesta tese.

O monitoramento vetorial foi realizado utilizando tecnologia da empresa Ecovec utilizando armadilha MosquiTrap® para captura de mosquitos adultos. As armadilhas são compostas por um recipiente preto onde é adicionada água e um funil plástico preto que direciona o vôo dos mosquitos em direção a uma cartela adesiva. Foi inserida na armadilha um tubo plástico com um atrativo para mosquitos fêmea que são atraídas para oviposição. Ao todo, 147 armadilhas foram instaladas ao longo do ICC, divididas ao longo dos 3 andares do prédio. Uma vez por semana as armadilhas foram vistoriadas quanto à presença dos mosquitos. O sistema permite identificar mosquitos da espécie *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Culex sp.*, diferenciados entre fêmeas e machos. O número de mosquitos capturados servem de base para o cálculo dos indicadores IMFA e IPM. O IMFA, Índice Médio de Fêmeas Adultas de *Aedes*

aegypti, é a razão entre o número de fêmeas capturadas e a quantidade de armadilhas vistoriadas na região.

O IPM, Índice de Positividade da MosquiTRAP, é a representação do percentual de armadilhas positivas na semana. É calculado pela divisão do número de armadilhas positivas pelo número total de armadilhas vistoriadas na semana. Por armadilha positiva entende-se aquela que capturou uma ou mais fêmeas de *Aedes aegypti*.

O tratamento dos reservatórios identificados no prédio foi realizado através da diluição do produto em água seguido de pulverização costal. Uma equipe de profissionais contratada pela prefeitura do *campus* Darcy Ribeiro foi orientada e acompanhada durante a aplicação do produto. O tratamento foi realizado uma vez por semana, por 5 semanas consecutivas. O tratamento foi iniciado após monitoramento das armadilhas por 5 semanas sem intervenção. A equipe responsável pela vistoria das armadilhas não foi informada sobre a área do prédio que seria tratada, para evitar bias na avaliação dos resultados. Ainda, a equipe de aplicação do inseticida não participou das vistorias das armadilhas.

Para determinação da concentração do produto a ser aplicada através da bomba de pulverização costal, 10 baldes contendo 4 litros de água, 75 larvas e 10 pupas da linhagem Rockefeller foram montados na parte externa do insetário. O produto escalonado foi diluído em série e pulverizado nos baldes. Foi observado que 2 segundos de acionamento da válvula de dispersão dos líquidos com um bico específico ejetam aproximadamente 80 mL de solução. Desta forma, as soluções foram preparadas para concentração final teórica de 10.000 ppm; 5.000 ppm; 2.500 ppm; 1.250 ppm e 625 ppm de produto para teste em dois baldes por concentração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns resultados deste trabalho foram publicados em artigo científico e são referenciados no texto (Dusi et al., 2022): Renata Garcia Dusí, Lais da Silva Morais, Natália Mendes Gomes Magalhães, Lorena Carneiro Albernaz, Chris J. Hamilton, Laila Salmen Espindola, Potential of garlic oil as a biopesticide against all *Aedes aegypti* life stages, Industrial Crops and Products, 181, 2022, 114780.

Perfil químico do óleo de alho ArboS187

O óleo de alho sintético ArboS187 foi caracterizado por GC-MS e por HPLC-UV. A análise por GC-MS resultou na anotação de 8 picos, todos com ao menos um átomo de enxofre na estrutura (Figura 8). Os compostos majoritários são sulfeto de dialila (DAS, 4,62%), dissulfeto de dialila (DAS2, 26,67%), trissulfeto de dialila (DAS3 63,06%) e tetrassulfeto de dialila (DAS4, 4,34%) (Tabela 2). Juntos, esses polissulfetos de dialila (DAPS) somam mais de 97% da área de pico identificada por GC-MS.

Tabela 2. Composição do óleo de alho ArboS187 por GC-MS.

| IR ^a | Composto | Massa molar | Área de pico(%) |
|-----------------|--|-------------|-----------------|
| 840 | 1,2-dithiolane | 106 | 0,63 |
| 896 | sulfeto de dialila (DAS) | 114 | 4,62 |
| 1078 | dissulfeto de dialila (DAS2) | 146 | 26,67 |
| 1212 | 2-vinyl-4H-1,3-dithiin | 144 | 0,30 |
| 1300 | trissulfeto de dialila (DAS3) | 178 | 63,06 |
| 1537 | tetrassulfeto de dialila (DAS4) | 210 | 4,23 |
| 1808 | 4,5,9-trithia-1,11-dodeca-diene | 220 | 0,32 |
| - | 6-methyl-4,5,8,9,10-penta-thio-trideca-1 | 284 | 0,16 |
| | Total identificado | | 100,0 |

^aIR = Índice de retenção determinado a partir de uma série homóloga de n-alcenos em coluna DB-5 MS.

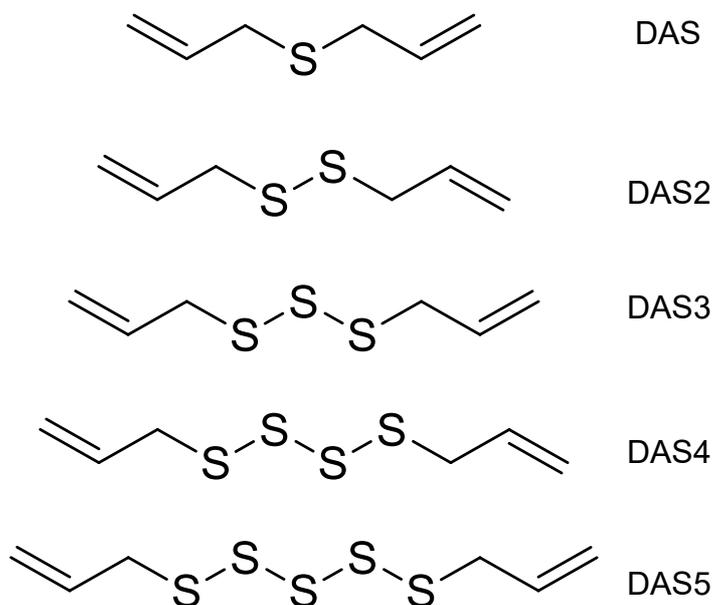


Figura 8. Estrutura química dos polissulfetos mais abundantes no óleo de alho.

A Tabela 3 compara a composição relativa dos polissulfetos do óleo de alho ArboS187 pelos dois métodos cromatográficos. DAS3 também foi o composto mais abundante correspondendo por HPLC-UV, correspondendo a 53,9% da composição total, mas, ao contrário do GC-MS, DAS4 foi proporcionalmente mais abundante que DAS2 por HPLC-UV. A detecção da proporção dos polissulfetos varia de acordo com a técnica empregada, por conta da diferença entre os detectores. O coeficiente de extinção molar dos polissulfetos varia na luz UV, fazendo com que não haja uma relação direta entre área de pico e concentração dos diferentes compostos (LAWSON; WANG; HUGHES, 1991).

Tabela 3. Composição percentual relativa dos polissulfetos de dialila do óleo de alho ArboS187 determinada por GC-MS e HPLC-UV.

| Método | DAS | DAS2 | DAS3 | DAS4 | DAS5 | DAS6 | DAPS* |
|---------|-----|------|------|------|------|------|-------|
| GC-MS | 4,6 | 26,7 | 63,1 | 4,2 | ND | ND | 98,6 |
| HPLC-UV | 1,7 | 16,6 | 53,9 | 19,6 | 4,2 | 1,9 | 97,9 |

*DAPS: polissulfetos de dialila. ND: Não Detectado.

Modificação química do óleo de alho ArboS187

A estratégia de modificação do óleo de alho utilizada nesse trabalho foi baseada na síntese completa do óleo de alho já publicada anteriormente (WANG et al., 2013). A simplicidade da reação e seus reagentes faz com que a síntese completa da mistura dos componentes ativos do óleo de alho seja compatível com a escala industrial. Desta forma, em caso de falta de bulbos de alho no mercado, o óleo sintético pode facilmente ser produzido para substituir o óleo de alho natural.

A modificação do óleo de alho ArboS187 (original), alterou a coloração do óleo, de amarelo pálido para alaranjado (Figura 9). Ao final da reação, 3,6 g do óleo modificado (Arbo2A170A) foram recuperados. Em análise por GC-MS e HPLC-UV foi possível observar que a reação aumentou a proporção de polissulfetos de cadeia mais longa (Tabela 4 e Figura 10), principalmente DAS4 e DAS5, e redução de DAS3. A proporção de DAS2 no óleo se manteve praticamente inalterada. Os dois óleos (original e modificado) foram testados a 4 ppm em larvas em placas de 12 poços com 10 larvas L3 em triplicata (Figura 11). A mortalidade causada pelo óleo original foi estatisticamente maior (p valor de 0,009) segundo teste ANOVA seguido de pós teste Tukey. Por outro lado, nenhuma etapa de purificação foi realizada no óleo modificado Arbo2A170A, e é possível que subprodutos da reação sem atividade larvicida possam ter sido formados e diminuem a concentração dos polissulfetos ativos no óleo. É possível também que alguma quantidade de enxofre elementar não tenha reagido e tenha se mantido solubilizado no óleo. Por ter maior proporção dos polissulfetos de cadeia mais longa, o óleo Arbo2A170A foi utilizado para isolamento dos polissulfetos para as etapas seguintes do trabalho.

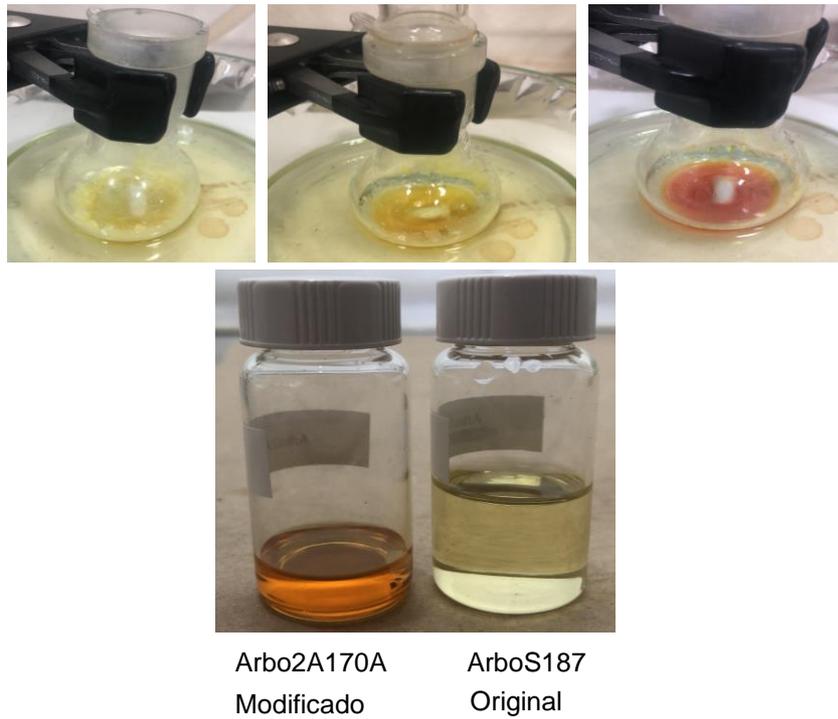


Figura 9. Alteração da coloração do óleo de alho ArboS187 durante e ao final da reação.

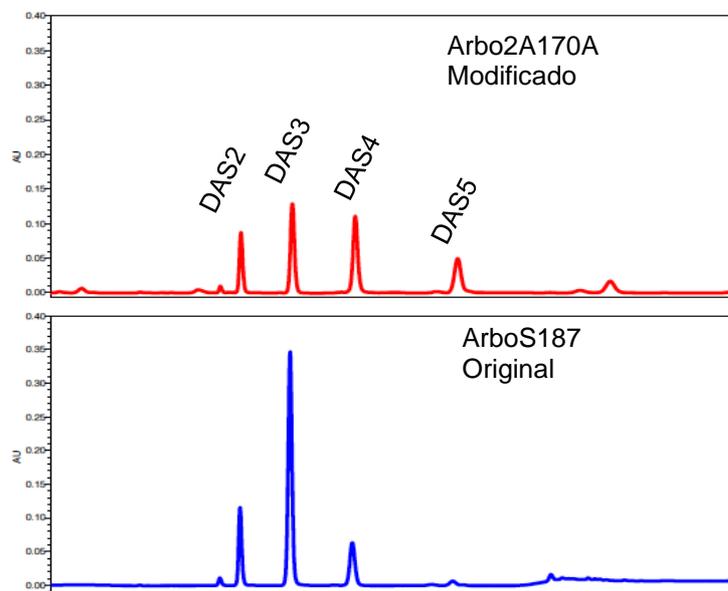


Figura 10. Cromatograma HPLC-UV a 210 nm do óleo de alho original e modificado mostrando a alteração do perfil cromatográfico, com volume de injeção e concentração constantes.

Tabela 4. Proporção dos diferentes polissulfetos DAS2, DAS3 e DAS4 em análise por GC-MS (%) e HPLC-UV (proporção de área sob a curva).

| | Proporção GC-MS | | | Proporção HPLC-UV | | |
|------------|-----------------|------|------|-------------------|------|------|
| | DAS2 | DAS3 | DAS4 | DAS2 | DAS3 | DAS4 |
| Original | 27% | 63% | 5% | 1,1 | 3,8 | 1 |
| Modificado | 30% | 31% | 34% | 1 | 1,8 | 1,8 |

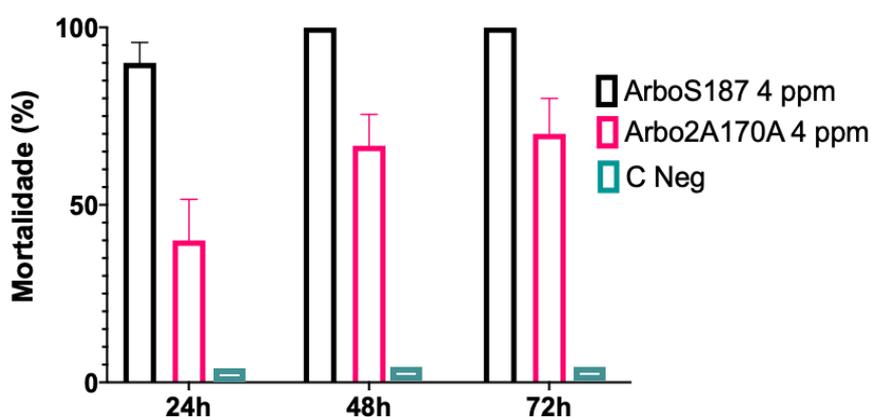


Figura 11. Atividade larvicida do óleo de alho ArboS187 (original) e Arbo2A170A (modificado). No gráfico estão representados a média de mortalidade e erro padrão da média para cada tratamento nos diferentes tempos. C Neg: DMSO < 2%; n = 3.

Isolamento dos compostos do óleo de alho modificado (Arbo2A170A)

Para obter quantidades suficientes de compostos puros de alho para teste, o óleo de alho modificado (Arbo2A170A) foi purificado em HPLC preparativo. Ao final foram isolados 5,2 mg de DAS2; 82,9 mg de DAS3; 94,0 mg de DAS4 e 62,7 mg de DAS5, cujas estruturas foram individualmente confirmadas pela comparação dos espectros de ^1H NMR com dados da literatura (WANG et al., 2013). Após a confirmação da estrutura por ^1H NMR, os compostos foram injetados individualmente em HPLC para observação dos diferentes tempos de retenção (Figura 12 e 13).

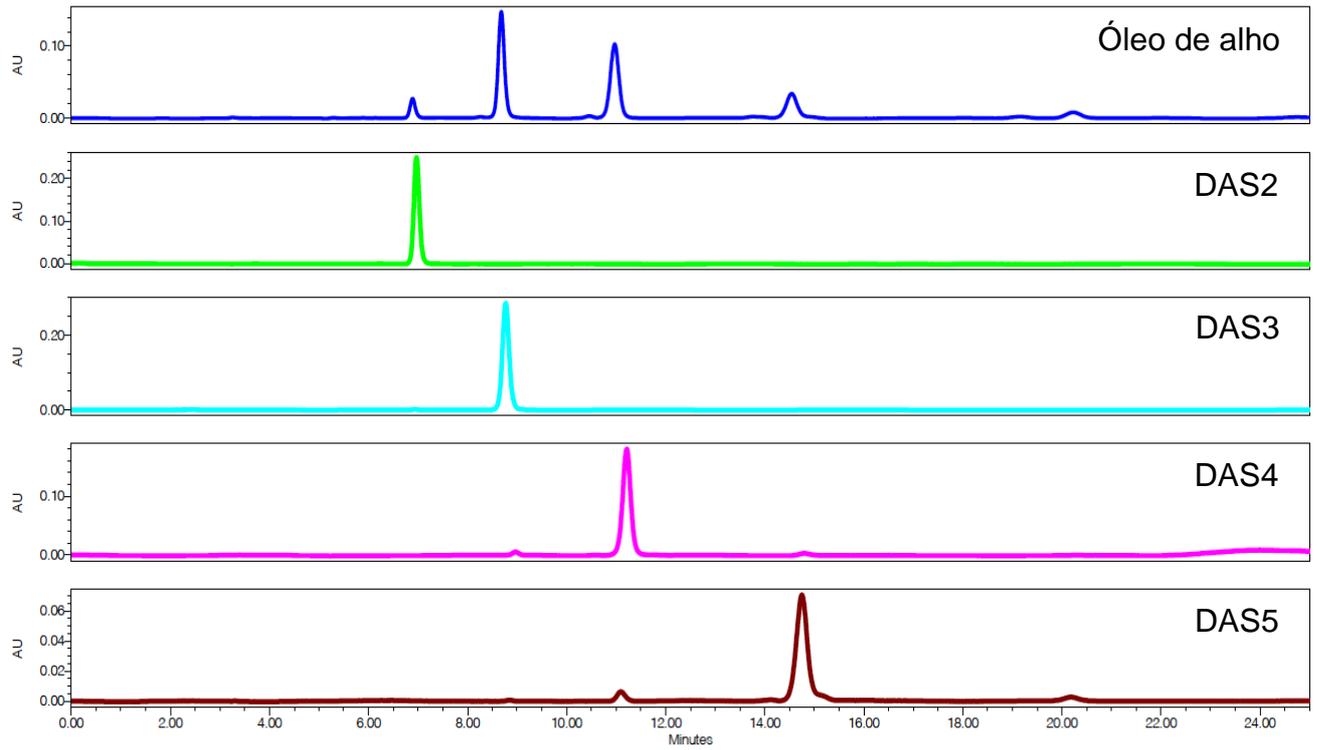
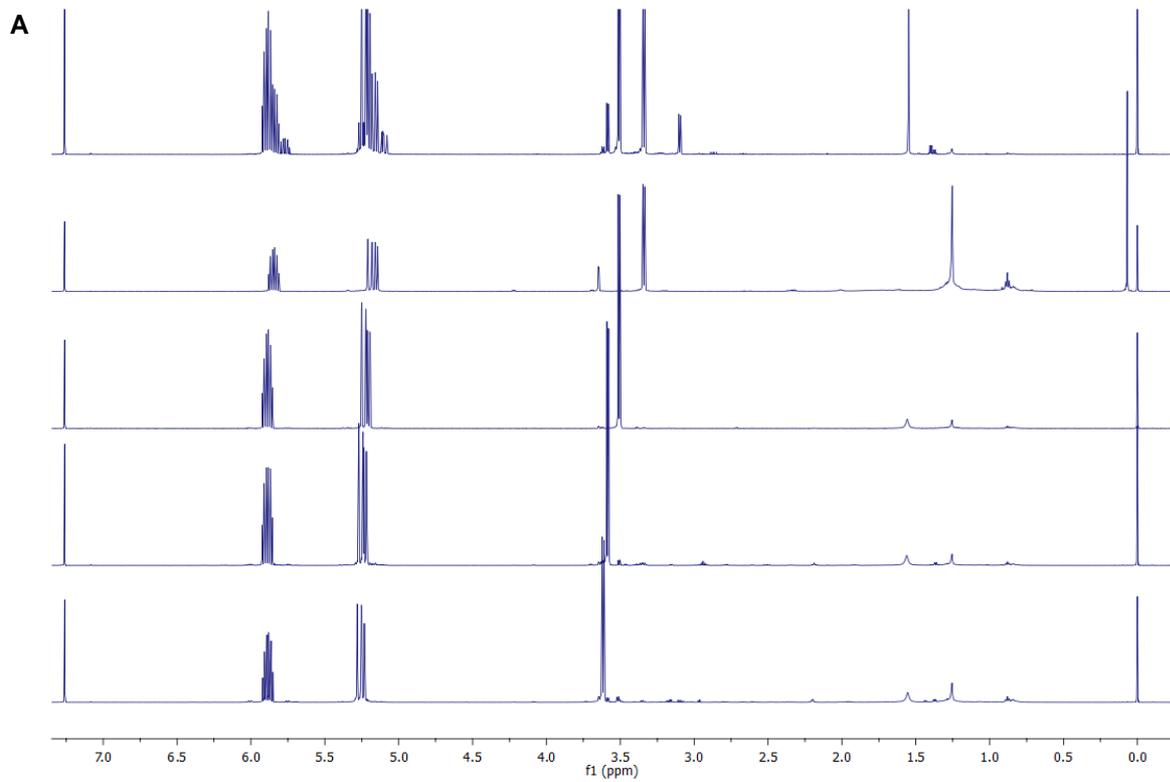


Figura 12. Cromatogramas de HPLC-UV a 210 nm do óleo de alho e respectivos polissulfetos isolados.



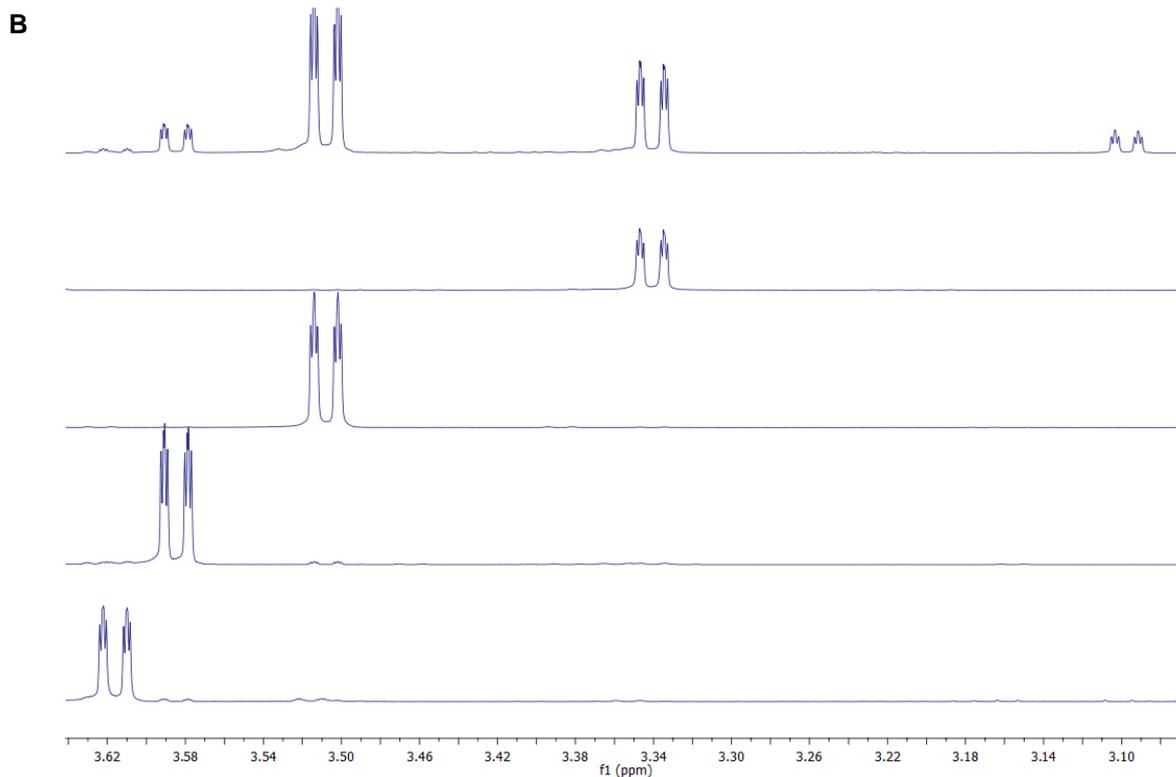


Figura 13. A: Espectros de ^1H NMR do óleo de alho e polissulfetos em CDCl_3 . **A:** De cima pra baixo: óleo de alho, dissulfeto de dialila (DAS2); trissulfeto de dialila (DAS3); tetrassulfeto de dialila (DAS4); pentassulfeto de dialila (DAS5). **B:** Espectros de ^1H NMR de óleo de alho e polissulfetos na região de 3,30 a 3,70 ppm.

Para os espectros de ^1H NMR, foram observados os sinais correspondentes aos hidrogênios do CH_2 mais próximos ao enxofre, já que são os que mais se diferenciam nos espectros dos polissulfetos. Esses hidrogênios tem deslocamento químico na região de 3,3 a 3,7 ppm para os compostos analisados, a depender do número de átomos de enxofre no composto (WANG et al., 2013). Na Figura 14, os espectros estão sobrepostos na região de interesse.

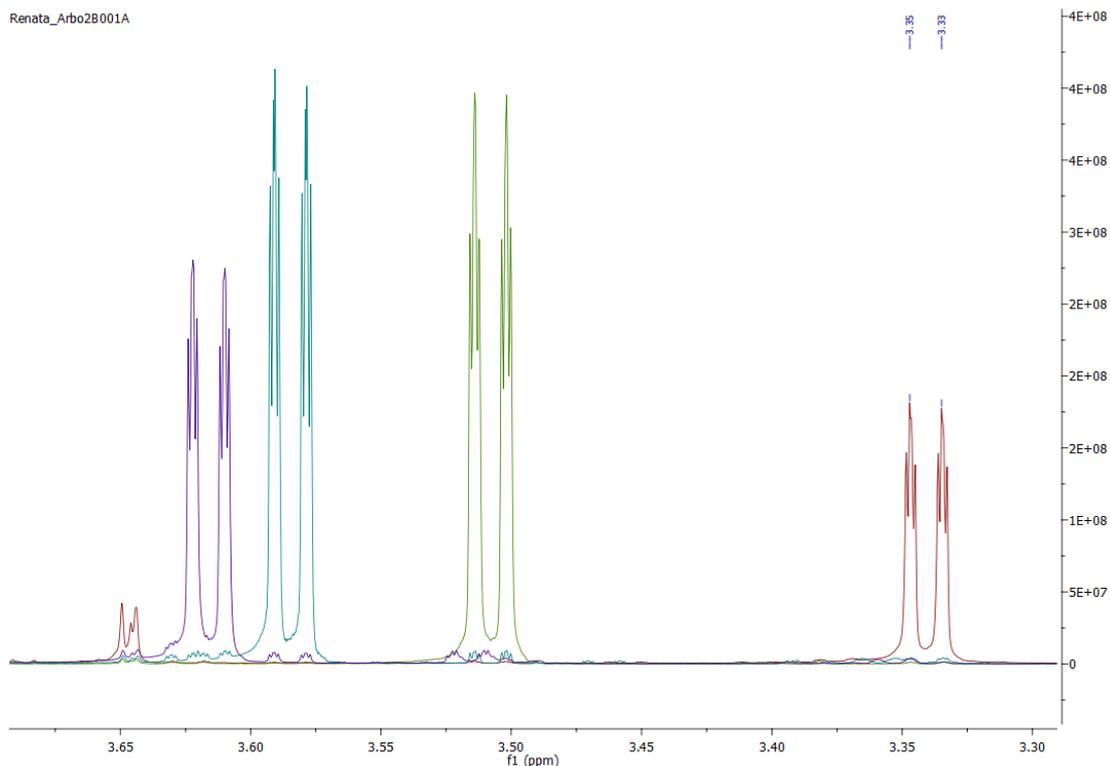


Figura 14. Espectros sobrepostos de NMR ^1H (em CDCl_3) dos compostos de alho isolados com enfoque na região de 3,30 ppm a 3,70 ppm. O sinal em vermelho, com deslocamento de 3,33 ppm é do DAS2; enquanto o verde de deslocamento 3,50 ppm é referente ao DAS3. DAS4 e DAS5 possuem deslocamentos mais próximos, a 3,58 ppm e 3,61 ppm (linhas azul e roxo), respectivamente

Foi feita análise de NMR ^1H dos padrões de DAS2 e DAS3 (Sigma Aldrich) para confirmação da estrutura. Na Figura 15 é possível observar que há sobreposição total dos espectros dos padrões com os respectivos compostos isolados.

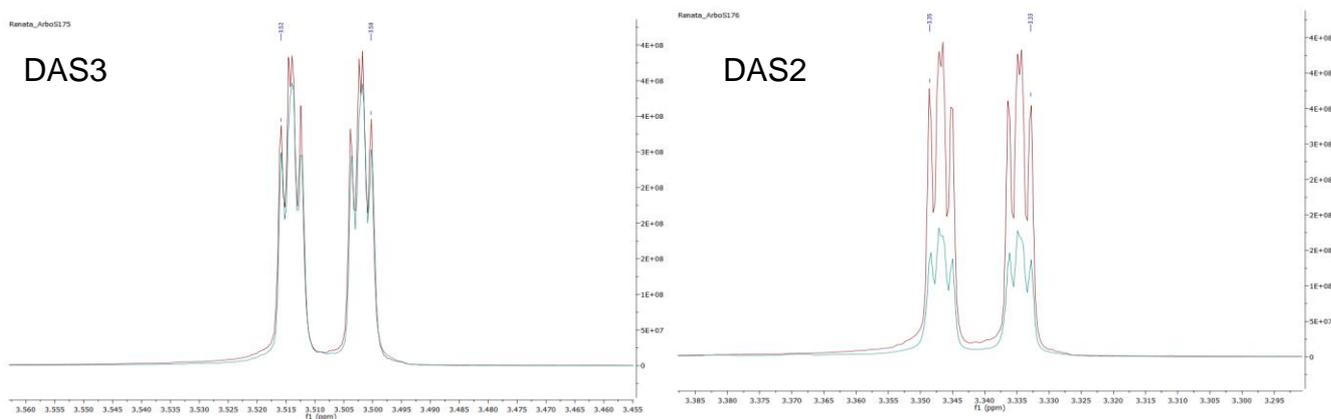


Figura 15. Espectros sobrepostos de NMR ^1H (em CDCl_3) dos compostos de alho isolados com seus respectivos padrões comerciais.

Um estudo realizado por Kimbaris et al. também produziu óleos semi-sintéticos de alho, porém, através da mistura de óleo de alho com DAS2 e sulfeto de dialila (DAS) (KIMBARIS et al., 2009). Aparentemente, após a adição dos compostos no óleo não foi realizado aquecimento, o que configura mais um enriquecimento do óleo do que propriamente uma semissíntese. Dessa forma, o óleo que continha inicialmente traços de DAS, passou a ter 55% desse composto após o enriquecimento na proporção de 1:1 (óleo de alho : DAS). Da mesma maneira, o óleo suplementado com DAS2 aumentou em mais de 30% a participação desse composto na composição do óleo. Em seguida, os óleos foram testados em larvas de *Culex pipiens*, revelando que o óleo suplementado com DAS2 foi o mais ativo de todos. Nesse estudo a composição inicial do óleo de alho era majoritariamente de compostos sulfurados com cadeias metil, e não alil que se mostram as mais ativas.

Efeito de solventes nos estabilidade de polissulfetos

Após isolamento, os polissulfetos (DAS2-DAS5) foram diluídos em DMSO para testes biológicos e seguiram para análise por HPLC-UV. A análise das soluções recém-preparadas mostrou que amostras de DAS4 e DAS5 isolados não exibiam mais um pico único após 2 h da solubilização em DMSO (Figura 16). Por isso, estudos adicionais foram realizados para compreender o papel de solventes na estabilidade dos polissulfetos.

O DAS4 se mostrou instável na diluição com DMSO e por sua maior disponibilidade foi selecionado para estudos mais aprofundados. Foram realizadas análises com óleo de alho ArboS187 paralelamente, para aferir se os efeitos também poderiam ocorrer no óleo. A fim de compreender se o efeito seria resultado puramente da interação com DMSO, amostras foram também diluídas em DMSO d6. Para controlar o tempo de diluição das amostras em DMSO, foram preparadas soluções em metanol e 2 min antes da injeção da amostra, a solução foi diluída em DMSO.

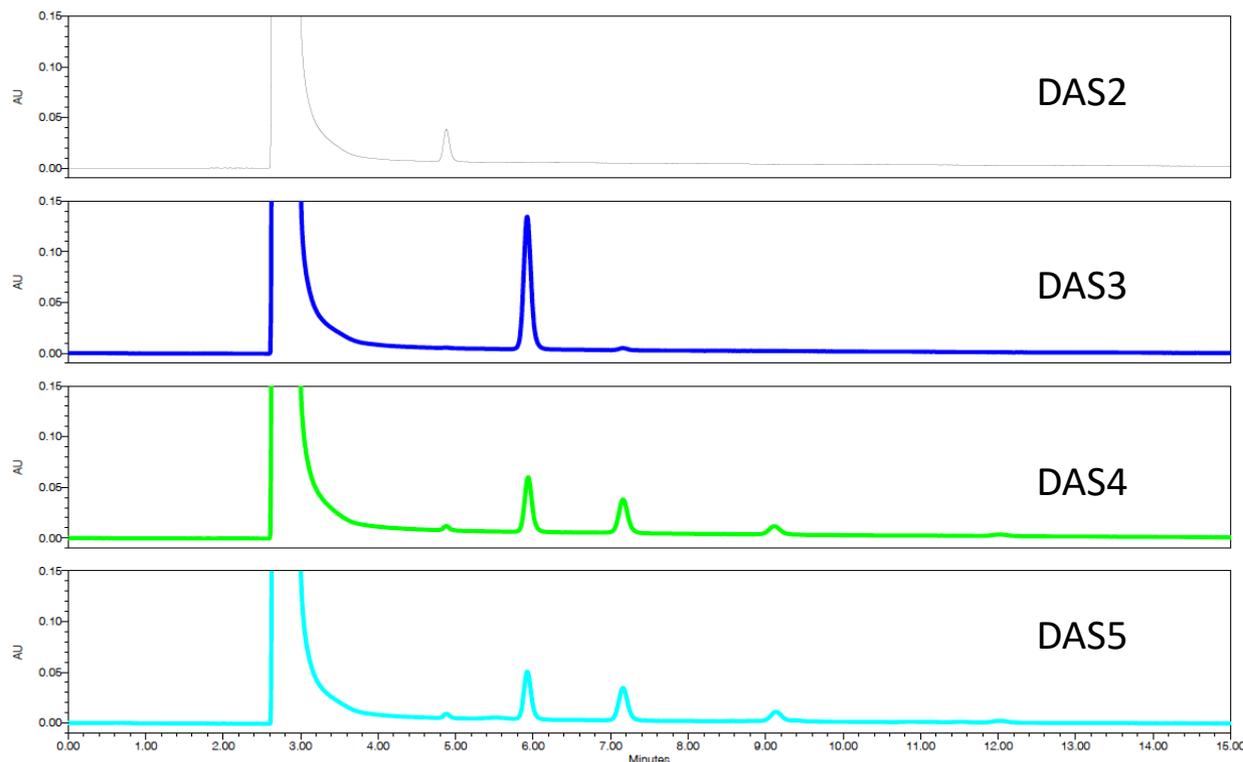


Figura 16. Cromatogramas de HPLC-UV a 210 nm do óleo de alho e dos polissulfetos 2 h após diluição em DMSO à temperatura ambiente.

DAS4 diluído em metanol sofreu relativamente poucas alterações em sua composição nas primeiras 24 h. Enquanto DAS4 correspondia a 99,31% da área de pico detectada na amostra no tempo 0, passou a representar 91,5% da área do pico da amostra após 24 h (Figura 17). Após 4 dias (96 h) da preparação DAS4 passou a corresponder a 81,1% da amostra, que passou a contar com 8,0% de DAS3 e 9,3% de DAS5. As mudanças na composição da amostra foram muito mais rápidas na presença de DMSO. Após 1 h de contato com DMSO, o pico majoritário da amostra passou a ser DAS3 (46,1%) ao invés de DAS4 (38,1%). Após a primeira hora de reação, a mistura parece ter chegado a um estado de equilíbrio, com aproximadamente 2% de DAS2, 45% de DAS3, 37% de DAS4, 12% de DAS5 e 3% de DAS6. A amostra se comportou de maneira equivalente quando em contato com DMSO e DMSO-d6. O DMSO-d6 é utilizado para análises de NRM e tem grau de pureza maior do que o DMSO convencional. Uma vez que resultados semelhantes foram obtidos para os dois solventes, é provável que o DMSO, e não uma impureza, seja responsável por afetar a estabilidade de DAS4.

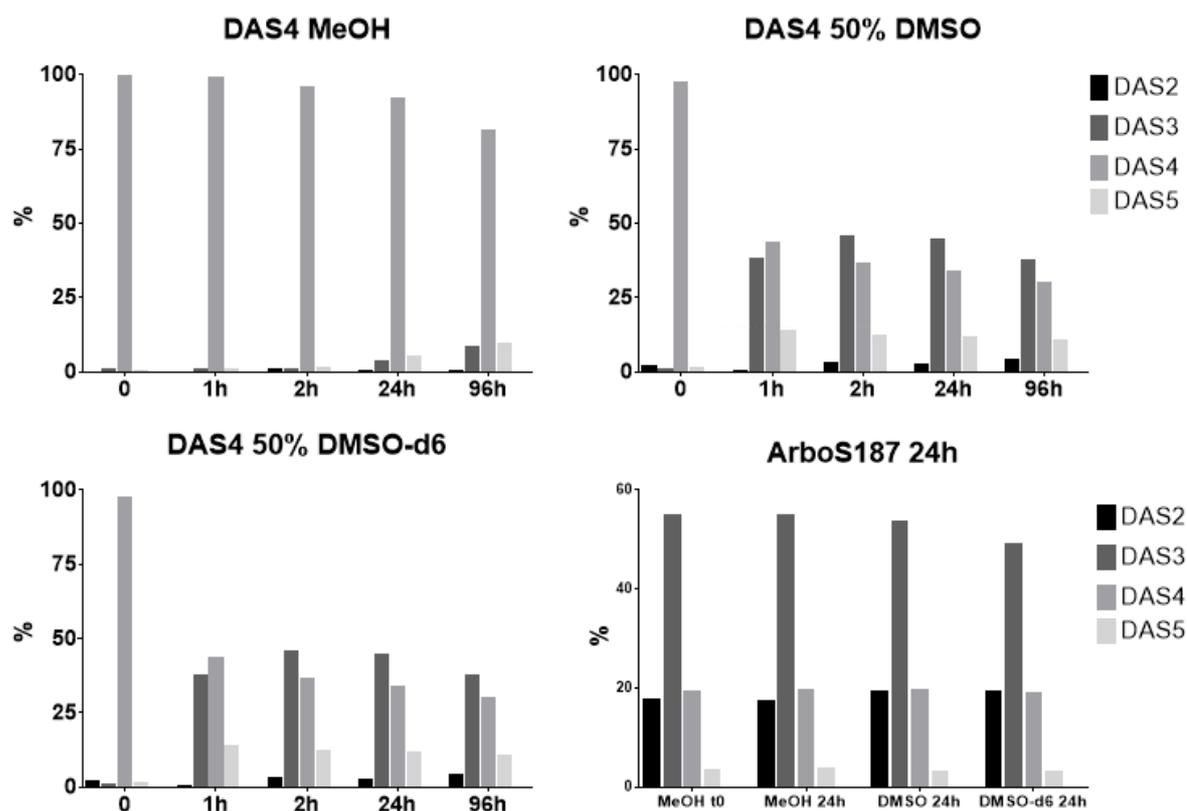


Figura 17. Percentual de polissulfetos nas amostras de DAS4 e ArboS187 após diluição em metanol, DMSO e DMSO-d6.

Diferente do observado para DAS4, a solubilização do óleo de alho ArboS187 em DMSO não acarretou em modificações na sua composição. É possível observar na Figura 17 que a mesma proporção de polissulfetos observada para ArboS187 no tempo 0 em metanol se manteve após 24 h da solubilização em todas as amostras. É provável que as reações de rearranjo que ocorreram na amostra de DAS4 isolado também ocorram nos polissulfetos presentes no óleo de alho. Por outro lado, os polissulfetos no óleo devem ter atingido um equilíbrio que é mantido mesmo com a ocorrência de rearranjos.

Uma amostra de DAS4 foi solubilizada em soluções com 1%, 10% 25% e 50% de DMSO para avaliar se a concentração de DMSO afetaria a estabilidade do polissulfeto. Somente a amostra diluída em 50% de DMSO sofreu uma queda significativa na porcentagem de DAS4 nas primeiras 24 h (Figura 18). Mesmo no tempo 0, com 2 min de reação antes da injeção no HPLC, a amostra em 50% de DMSO é a única com uma pequena queda na porcentagem de DAS4. Ressaltando, todas as amostras são advindas de uma mesma solução estoque. Portanto, é possível que a estabilidade de DAS4 em presença de DMSO seja afetada quando a

concentração de DMSO é igual ou superior a 50%. A 25% de DMSO foi observada uma diminuição progressiva de DAS4 até o dia 7, em que os níveis de DAS4 ficaram similares aos da amostra em 50% de DMSO. A 10% e 1% de DMSO, não houve reação significativa do DAS4 em todos os tempos observados. Conclui-se, portanto, que a concentração de DMSO afeta a estabilidade de DAS4. Mesmo a 1%, a concentração de DMSO é muito superior à concentração inicial de DAS4 (0,5 µL/mL). Portanto, o DMSO não parece atuar simplesmente como solvente, mas sim como um solvente reator.

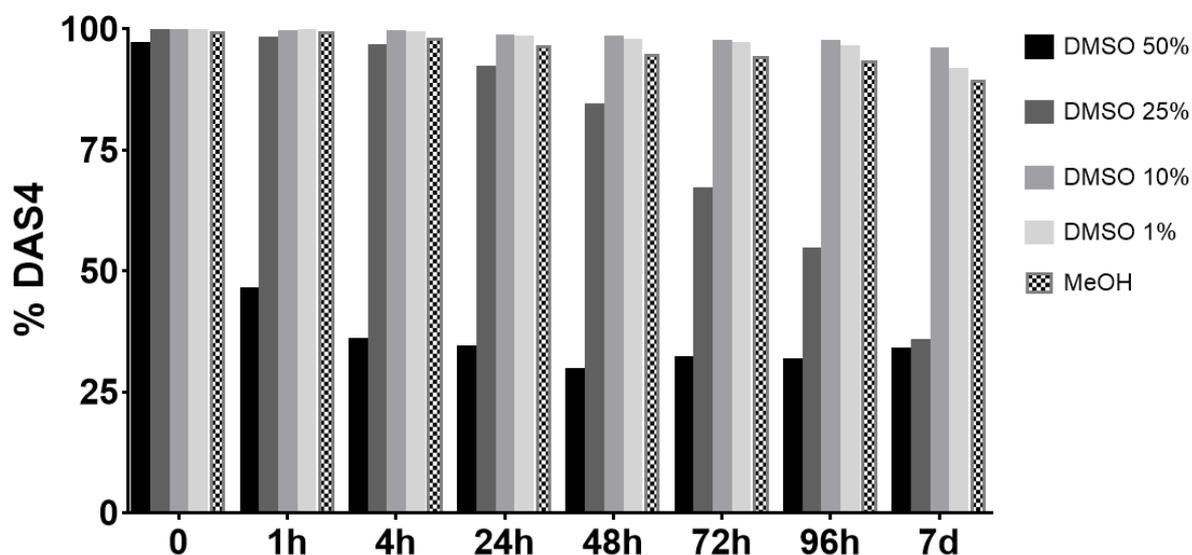


Figura 18. Percentual de DAS4 após diluição em 1%, 10%, 25% e 50% de DMSO e em metanol à temperatura ambiente.

Por ser um solvente aprótico, o DMSO poderia conferir uma reatividade diferente do que o metanol. Para testar se a característica aprótica poderia estar relacionada com a reatividade, DAS4 foi solubilizado em 50% do solvente aprótico dimetilformamida (DMF) de dois diferentes fabricantes (Sigma Aldrich e JT Baker). Seguindo o mesmo método descrito para DMSO, DAS4 foi inicialmente diluído em metanol e subsequentemente diluído em um mesmo volume de DMF para que ao final a concentração de DMF permanecesse 50%.

Inicialmente houve redução brusca de DAS4 em DMSO na primeira hora, o que não ocorreu com DAS4 solubilizado em DMF ou metanol (Figura 19). Apenas após 24 h da solubilização os níveis de DAS4 se igualaram nas amostras diluídas em DMSO e DMF, enquanto permaneceram praticamente intocados na amostra diluída em metanol. Após as primeiras 24 h, os níveis de DAS4 pouco variaram nas amostras.

Ao final de 7 dias de experimento em metanol, 90% da amostra ainda correspondia a DAS4. As amostras em DMF tinham em torno de 25% DAS2, 38% DAS3 e 26% DAS4, após 7 dias. No mesmo tempo a amostra em DMSO era composta por 2% DAS2, 52% DAS3 e 34% DAS4. A diferente composição final observada, especialmente em relação à DAS2 e DAS3 pode sugerir que o mecanismo que afeta a estabilidade de DAS4 em presença de DMSO e DMF pode ser diferente.

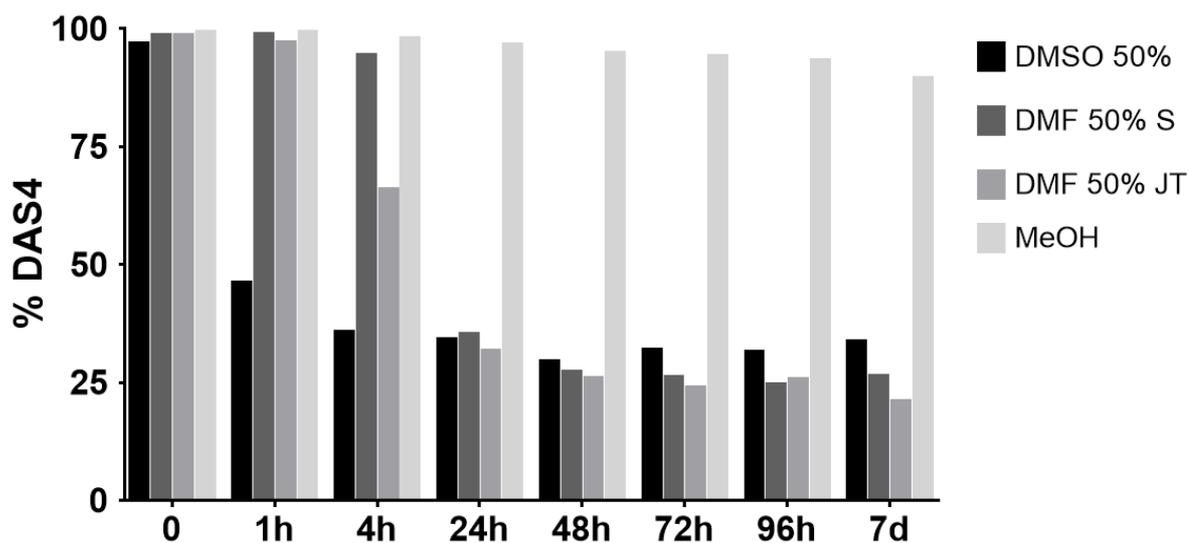


Figura 19. Percentual de DAS4 após diluição em metanol, DMSO 50%, DMF 50% (Sigma-Aldrich) e DMF (JT Baker).

O DMSO é um solvente orgânico polar aprótico com características anfipáticas que fazem com seja capaz de solubilizar uma variedade grande de compostos. É considerado inerte e atóxico, se tornando o solvente de escolha para dissolução de amostras para ensaios biológicos. Apesar de já ter sido considerado altamente tóxico no passado, atualmente é considerado um solvente de baixo risco, na mesma classe de solventes como etanol. Por outro lado, estudos recentes revelam que o DMSO mesmo em baixas concentrações (0,1%) é capaz de alterar a expressão gênica em células e causar toxicidade *in vivo* (BALDELLI et al., 2021; GALVAO et al., 2014; VERHEIJEN et al., 2019). DMSO possui efeito tóxico variado em diferentes microorganismos e linhagens celulares, compreendendo respostas em uma gama de concentrações avaliadas (ILIEVA et al., 2021). Em um estudo ecotoxicológico, o DMSO demonstrou ser tolerável na regeneração da antena de um crustáceo marinho, se mostrando pouco tóxico (DIEHL et al., 2021). Nos nossos estudos o DMSO utilizado no controle negativo não causou mortalidade em larvas, pupas e ovos, sendo

seu efeito tóxico desconsiderado. De qualquer forma, o DMSO somente é utilizado nas etapas de ensaios iniciais e deixa de ser usado no desenvolvimento tecnológico de formulações.

Os resultados aqui apresentados sugerem que além do efeito biológico (como controle negativo), a interação do DMSO com os compostos em teste deve ser observada. Diversos estudos utilizando DMSO para solubilização de polissulfetos são encontrados na literatura e vários outros estudos não relatam o solvente utilizado nos experimentos (CHANG; WU; HSU, 2015; MALLA et al., 2021; PARI et al., 2007; SAIDU et al., 2013). É possível que em vários dos relatos o efeito biológico observado não seja resultado do polissulfeto analisado. Por outro lado, como mostrado neste trabalho, a instabilidade gera o rearranjo em outros alil polissulfetos com semelhantes características e atividade biológica. Portanto, é possível que a instabilidade não represente impacto relevante nos resultados dos estudos.

Atividade larvicida e pupicida do óleo de alho ArboS187

A atividade larvicida é normalmente a primeira avaliação da atividade inseticida dos compostos. Isso se deve à facilidade de execução e leitura dos testes, à existência de um protocolo já estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para testagem de larvicidas e também à maior suscetibilidade na fase larval. Neste estudo, o óleo de alho ArboS187 teve CL_{50} de 1,58 ppm; 1,06 ppm e 0,92 ppm após 24, 48 e 72 h de exposição, respectivamente, em teste segundo protocolo estabelecido pela OMS (DUSI et al., 2022). A CL_{50} estimada nesse estudo é inferior aos valores encontrados na literatura. Em estudo com larvas L3 de *Ae. aegypti* as CL_{50} foram estimadas em 16,9 ppm em 24 h e 7,6 ppm após 48 e 72 h (SARMA et al., 2019). O óleo usado no estudo por Sarma et al. continha 8,5% de DAS2 e 7,8% de DAS3, percentuais bem inferiores às do óleo usado neste trabalho (estimado por GC-MS em 27% e 64%, respectivamente). Um óleo de alho adquirido da empresa New Directions Aromatics demonstrou CL_{50} de 7,95 ppm após 24 h (MUTURI et al., 2019). No mesmo trabalho foram feitas formulações com complexos de inclusão de amilose que foram mais ativos que o óleo não formulado. Em um estudo com 10 larvas L4 de *Ae. aegypti* a CL_{50} foi de 0,42 ppm após 24 h (MEDONA; NIRMALA, 2016). A atividade larvicida de óleo de alho em *Culex* sp. reportada na literatura está na mesma faixa da detectada

para *Ae. aegypti*, com CL₅₀ variando de 2,7 ppm a 8,0 ppm (AMONKAR; BANERJI, 1971; KIMBARIS et al., 2009; MUTURI et al., 2018).

Um estudo detectou a atividade larvicida de um inibidor de protease isolado do alho, que teve CL₅₀ de 50,8 ppm após 48 h de exposição (SHAMSI et al., 2018). Apesar desse resultado, a maior parte dos estudos sobre a atividade larvicida utilizam o óleo de alho. A análise química que poderia ajudar a explicar a variação das CL₅₀ estimadas nem sempre é reportada nos estudos. Verificou-se que há variação dos recipientes, números de larvas e volumes utilizados, que também explicam a diferença da atividade. Outro fator com importante impacto na reprodutibilidade dos resultados é o uso das concentrações em ppm relacionadas a volume/volume (µL/mL) ou peso/volume (µg/mL). Uma vez que a densidade do óleo de alho é diferente de 1, as duas medidas de concentração não são intercambiáveis. Neste estudo utilizou-se ppm em peso/volume, mas não está claro em todos os outros estudos como foram preparadas as soluções.

A atividade pupicida do óleo de alho ArboS187 foi determinada com CL₅₀ de 20,3 ppm (CI₉₅ 18,03 – 22,44 ppm) se mostrou interessante, apesar de substancialmente superior à atividade larvicida (DUSI et al., 2022). Até o momento, este é o primeiro trabalho na literatura a relatar a atividade pupicida do óleo de alho em *Ae. aegypti* (DUSI et al., 2022). As pupas são mais resistentes que as larvas e por não se alimentarem, não há absorção por via oral dos compostos presentes na água. A atividade pupicida do óleo de alho sugere que, provavelmente há penetração dos compostos por outras vias. As larvas se alimentam principalmente por filtração, e por isso estão constantemente absorvendo os compostos presentes na água, o que faz com que sejam expostas à maior quantidade de óleo. Provavelmente é por esse motivo que a CL₅₀ estimada para larvas é aproximadamente 20 vezes menor do que a estimada para pupas em copos de 200 mL.

Um estudo com dissulfeto de dialila (DAS2) sintetizado com ³⁵S, um isótopo radioativo de enxofre, demonstrou que as larvas de *Culex pipiens* absorvem DAS2 pelos menos três vezes mais rápido que as pupas (RAMAKRISHNAN; CHINTALWAR; BANERJI, 1989). Aproximadamente 95% das larvas morreram em 4 h quando tratadas com 50 ppm de DAS2, enquanto 3% das pupas morreram. Os autores sugerem que a diferença de atividade observada possa ocorrer devido à taxa acelerada de absorção das larvas em relação às pupas. Dessa forma, o sistema detoxificante das pupas teria mais tempo para lidar com concentrações inferiores de

DAS2 ao longo do tempo, e portanto, seria mais efetivo. Os autores mostraram ainda que 60% de DAS2 é perdido para o ambiente nas primeiras 4 h, fazendo com que as pupas estivessem expostas à menor concentração de compostos do óleo. Por outro lado, nos tempos letais para 50% de larvas e pupas, 5 e 16 h respectivamente, a quantidade de DAS2 absorvido é praticamente igual. Dessa forma, é possível que o mecanismo de resistência das pupas em relação às larvas seja físico e não bioquímico.

Há menos relatos na literatura de amostras com atividade pupicida do que larvicida em *Ae. aegypti*. Inclusive, ainda não há disponível no mercado um produto capaz de matar o inseto nesse estágio. Atualmente, uma vez passado o período larval, só resta o controle vetorial do mosquito adulto. Um filme formado por uma monocamada de silicone se mostrou pupicida, matando aproximadamente 100% das pupas a 1 mL/m² (NGRENNGARMLERT et al., 2016). Provavelmente esse filme produz uma barreira física impedindo a respiração das pupas na superfície. Por ser formado por silicone, derivado de petróleo, seu uso em larga escala é inviável devido ao seu impacto ambiental.

Uma formulação feita com a bactéria *Pseudomonas fluorescens* Migula (cepa VCRC B426) demonstrou atividade pupicida em *Ae aegypti* com CL₅₀ de 19,2 ppm em relação à proteína ativa (CL₅₀ de 757 ppm da formulação) (PRABAKARAN et al., 2003). Os pesquisadores revelaram, em pesquisa posterior, que o composto responsável pela atividade pupicida foi um ramnolipídio, um biosurfactante composto por carboidratos e cadeias alifáticas ácidas (PRABAKARAN et al., 2015). O provável mecanismo de ação desses compostos é físico, através da alteração da tensão superficial da água afetando a capacidade respiratória das pupas (NAYAR; ALI, 2003).

A quinona alizarina foi reportada como um potente pupicida com CL₅₀ de 2,04 ppm (GANDHI et al., 2016). Esse resultado é contrastante com a completa ausência de atividade de alizarina em pupas verificado em estudo do nosso laboratório (SILVA et al., 2020a). A quinona alizarina não foi considerada ativa a 25 ppm em larvas ou pupas. A alizarina utilizada no nosso estudo foi adquirida comercialmente da Sigma Aldrich, enquanto a alizarina do estudo de Gandhi et al. foi isolada da planta *Rubia cordifolia*. A presença de algum contaminante minoritário na alizarina isolada pode ter sido responsável pela atividade observada, uma vez que os resultados são tão divergentes.

As substâncias cardol e ácido anarcádico isolados do líquido da casca da castanha de caju tiveram CL_{50} de 90,8 ppm e 109,7 ppm em pupas de *Ae. aegypti* (DE CARVALHO et al., 2019). O extrato etanólico da casca da laranja *Citrus sinensis* teve CL_{50} pupicida de 497,4 ppm (MURUGAN et al., 2012).

O óleo essencial de *Anethum graveolens* demonstrou atividade pupicida com CL_{50} de 2,9%, em torno de 29.000 ppm considerando que a porcentagem se relacionaria a v/v (CHANTAWEE; SOONWERA, 2018). O extrato etanólico de *Accacia penata*, demonstrou CL_{50} de 245 ppm e sua fração CL_{50} próxima a 50 ppm (THONGWAT; GANRANOO; CHOKCHAISIRI, 2017). Os autores não conseguiram determinar o composto responsável pela atividade pupicida.

O pesticida piriproxifeno (PPF), um análogo de hormônio juvenóide, é capaz de matar pupas quando o animal ainda é tratado no período larval. Não foi encontrado na literatura experimento com PPF em que o pesticida fosse testado diretamente sobre as pupas. Portanto, foi realizado experimento em que 25 pupas foram adicionadas em copos com 200 mL de água e PPF entre 0,0001 ppb e 200 ppm, em quadruplicata. Nenhuma pupa morreu em nenhuma das concentrações testadas (Figura 20).



Figura 20. Teste de pupas testadas com piriproxifeno de 0,0001 ppb a 200 ppm, após eclosão de todos os mosquitos.

Em larvas, a CL_{50} de PPF está na ordem de ppb, em que exerce sua atividade tardia em pupas (HUSTEDT et al., 2020). Nesse experimento, mesmo em concentração muito superior à que é utilizada para larvas, nenhuma das pupas morreu ou sofreu alteração morfológica visível. Portanto, diferente do óleo de alho ArboS187,

o PPF não é um composto pupicida quando aplicado no estágio de pupa. Possivelmente o receptor juvenóide no qual PPF atua nas larvas já não está mais presente nas pupas.

Durante os experimentos pupicidas com o óleo de alho ArboS187, foi observado que nas concentrações médias, que não causaram 100% de mortalidade, houve aparecimento de várias malformações (DUSI et al., 2022). As alterações observadas parecem estar principalmente relacionadas ao desenvolvimento das patas e asas (Figura 21). Em alguns casos, o mosquito estava completamente formado, mas um dos tarsos não tinha sido completamente liberado da exúvia. Esse tipo de alteração causava a morte do mosquito, após algumas horas, por exaustão, já que não conseguia voar ainda preso ao exoesqueleto da pupa. Outros mosquitos formados ficavam em repouso com as asas abertas, o que não é normal. É possível que as asas desses mosquitos não tenham sido completamente formadas, e que essas alterações poderiam afetar seu *fitness*. As pupas mortas antes de tentarem completar a metamorfose em adultos normalmente ficaram escurecidas (Figura 22). O escurecimento das formas imaturas do mosquito se deve à necrose dos tecidos após todas as tentativas de detoxificação.



Figura 21. Fotos das alterações observadas nas pupas tratadas com concentrações intermediárias de óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022).



Figura 22. Foto da comparação entre uma pupa sadia do controle (esquerda) e de uma pupa morta após tratamento com óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022).

Efeito dos recipientes na determinação da atividade larvicida e pupicida do óleo de alho ArboS187

Diante da magnitude do projeto ArboControl, o grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia estabeleceu um teste inicial de triagem por meio do uso de 10 larvas por poço com 3 mL de água em placas de 12 poços, em quadruplicata. A análise da atividade larvicida prossegue sempre que a mortalidade é superior à 80%, levando à testes para determinação da concentração letal para 50% das larvas (CL_{50}). Com o objetivo de reduzir o uso de amostra e outros insumos, uma prévia da curva dose resposta é realizada em placas com 3 mL de água, com o mesmo protocolo feito no *screening*. Em seguida, a determinação da CL_{50} é realizada em copos de 200 mL de água, seguindo o protocolo da OMS (WHO, 2005).

Essa abordagem foi utilizada por múltiplos pesquisadores do nosso laboratório e, por diversas vezes foi observado que a letalidade das amostras é diferente de acordo com os recipientes utilizados. A mortalidade das larvas geralmente parece ser maior quando o teste é realizado segundo o protocolo da OMS. Esse fenômeno ocorreu nos testes realizados com diferentes matrizes, mas a diferença parece ser mais significativa no estudo dos óleos essenciais.

Diante dessas observações, foram realizados teste padronizados com o óleo ArboS187, que foi pesado em balança analítica de precisão, diluída em DMSO e posteriormente em água em balão volumétrico. Em seguida, a solução homogeneizada foi transferida para os diferentes recipientes contendo as larvas. Dessa forma, foi possível garantir que todos os recipientes testados receberam a mesma solução (e portanto, a mesma concentração) de ArboS187. As concentrações que formaram uma curva dose resposta adequada para recipientes de 200 mL foram

selecionadas para os experimentos padronizados. O mesmo procedimento foi realizado para o DMSO, usado como controle negativo. Os resultados foram analisados tanto no GraphPad Prism com a construção de curvas dose-resposta quanto no R Studio para construção de regressões probit (Tabelas 5 e 6; Figuras 23 e 24). Os dois resultados foram também comparados.

Tabela 5. Atividade larvicida do óleo de alho ArboS187 nos diferentes recipientes determinada por regressão probit no R Studio.

| Tempo | Recipiente | CL ₅₀ (ppm) (IC ₉₅) | CL ₉₅ (ppm) (IC ₉₅) | Chi ² | Slope | Intercept |
|-------|------------|---|---|------------------|-------|-----------|
| 24 h | Copo200 | 1,6 (1,5 - 1,7) | 3,0 (2,7 - 3,4) | 0,17 | 5,93 | -1,17 |
| | Copo20 | 2,8 (2,6- 3,1) | > 4,8 | 1,91E-92 | 4,22 | -1,90 |
| | PlacaCT | 3,8 (3,4 - 4,4) | > 4,8 | 0,007 | 4,84 | -2,82 |
| | PlacaST | > 4,8 | > 4,8 | 0,99 | 4,71 | -4,30 |
| 48 h | Copo200 | 1,1 (1,0 - 1,1) | 1,9 (1,8 - 2,0) | 1,0 | 6,47 | -0,17 |
| | Copo20 | 1,8 (2,6 - 3,1) | 3,8 (3,3 - 4,7) | 6,03E-168 | 5,18 | -1,37 |
| | PlacaCT | 2,4 (2,3 - 2,5) | 3,2 (3,0 - 3,5) | 1,0 | 12,6 | -4,68 |
| | PlacaST | 4,7 (4,3 - 5,1) | > 4,8 | 1,0 | 6,22 | -4,16 |
| 72 h | Copo200 | 0,9 (0,9 - 1,0) | 1,8 (1,7 - 1,9) | 0,96 | 5,77 | 0,21 |
| | Copo20 | 1,6 (1,5- 1,8) | 3,9 (3,4 - 4,8) | 9,50E-11 | 4,36 | -0,93 |
| | PlacaCT | 2,2 (2,1 - 2,4) | 3,5 (3,1 - 4,1) | 4,05E-131 | 8,36 | -2,88 |
| | PlacaST | 4,4 (4,1 - 4,7) | > 4,8 | 1,0 | 6,33 | -4,04 |

Copo200: Copos plásticos com 200 mL de água e 25 larvas; Copo20: Copos plásticos com 20 mL de água e 10 larvas; PlacaCT: Placa de 12 poços com 10 larvas e 3 mL por poço com tampa; PlacaST: Placa de 12 poços com 10 larvas e 3 mL por poço sem tampa. CL₅₀ : Concentração letal para 50% dos indivíduos; IC₉₅ : Intervalo de confiança com nível de significância de 0,05; n = 12.

Em larvas, a CL_{50} variou de 1,58 ppm a >4,8 ppm em 24 h usando a regressão probit (Tabela 5). De maneira parecida, variou de 1,56 ppm a >4,8 ppm quando usando a regressão não linear no GraphPad Prism (Tabela 6). A maior variação dentre os dois modelos foi observada para a atividade nas placas sem tampa, que não se adequou a nenhum dos dois modelos, e portanto as concentrações letais estimadas são tão diferentes e imprecisas.

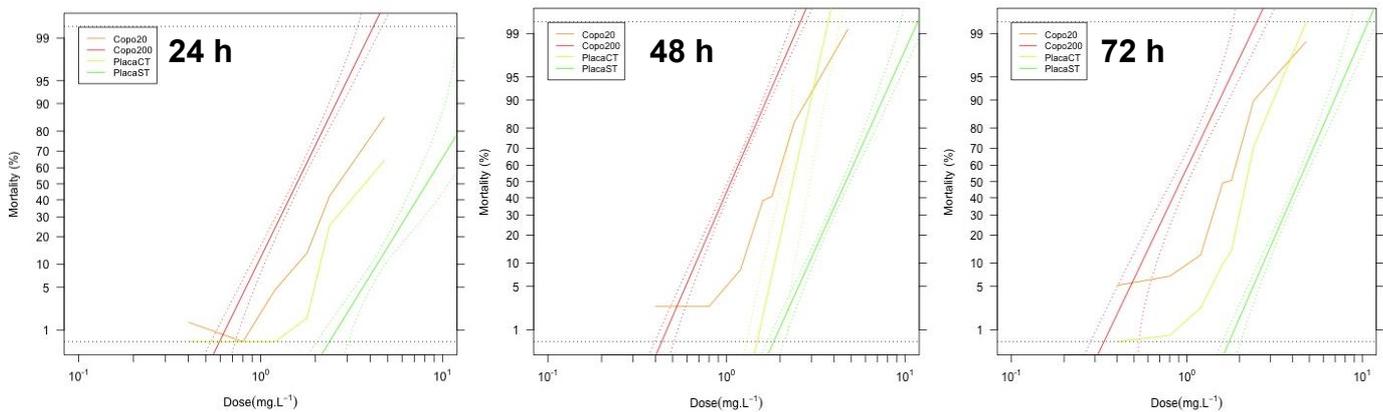


Figura 23. Gráficos resultantes da regressão probit da atividade larvicida de ArboS187 nos diferentes recipientes após 24, 48 e 72 h de exposição. Copo20: copo com 20 mL de solução; Copo200: copo com 200 mL de solução; PlacaCT: placa com tampa; PlacaST: placa sem tampa.

Tabela 6. Atividade larvicida de ArboS187 em diferentes recipientes por análise de regressão não linear no GraphPad Prism.

| Tempo | Recipiente | CL_{50} (ppm) (IC_{95}) | CL_{95} (ppm) | R^2 |
|-------|------------|----------------------------------|-----------------|-------|
| 24 h | Copo200 | 1,6 (1,5 – 1,6) | 3,00 | 0,92 |
| | Copo20 | 2,7 (2,6 – 2,9) | > 4,8 | 0,90 |
| | PlacaCT | 3,0 (2,7 – 3,2) | > 4,8 | 0,87 |
| | PlacaST | > 4,8 | > 4,8 | 0,55 |
| 48 h | Copo200 | 1,1 (1,0 - 1,1) | 1,98 | 0,96 |
| | Copo20 | 1,8 (1,7 – 1,9) | 3,24 | 0,89 |
| | PlacaCT | 2,3 (-) | 2,90 | 0,95 |
| | PlacaST | 4,5 (4,3 – 5,1) | > 4,8 | 0,80 |
| 72 h | Copo200 | 1,0 | 1,75 | 0,96 |

| Tempo | Recipiente | CL ₅₀ (ppm) (IC ₉₅) | CL ₉₅ (ppm) | R ² |
|-------|----------------|---|------------------------|----------------|
| | | (0,9 – 1,0) | | |
| | Copo20 | 1,7 (1,6- 1,8) | 3,00 | 0,89 |
| | PlacaCT | 2,2 (2,1 – 2,2) | 3,05 | 0,92 |
| | PlacaST | 4,4 (4,2 – 4,6) | > 4,8 | 0,80 |

Copo200: Copos plásticos com 200 mL de água e 25 larvas; Copo20: Copos plásticos com 20 mL de água e 10 larvas; PlacaCT: Placa de 12 poços com 10 larvas e 3 mL por poço com tampa; PlacaST: Placa de 12 poços com 10 larvas e 3 mL por poço sem tampa. CL₅₀ : Concentração letal para 50% dos indivíduos; IC₉₅ : Intervalo de confiança com nível de significância de 0,05; n = 12.

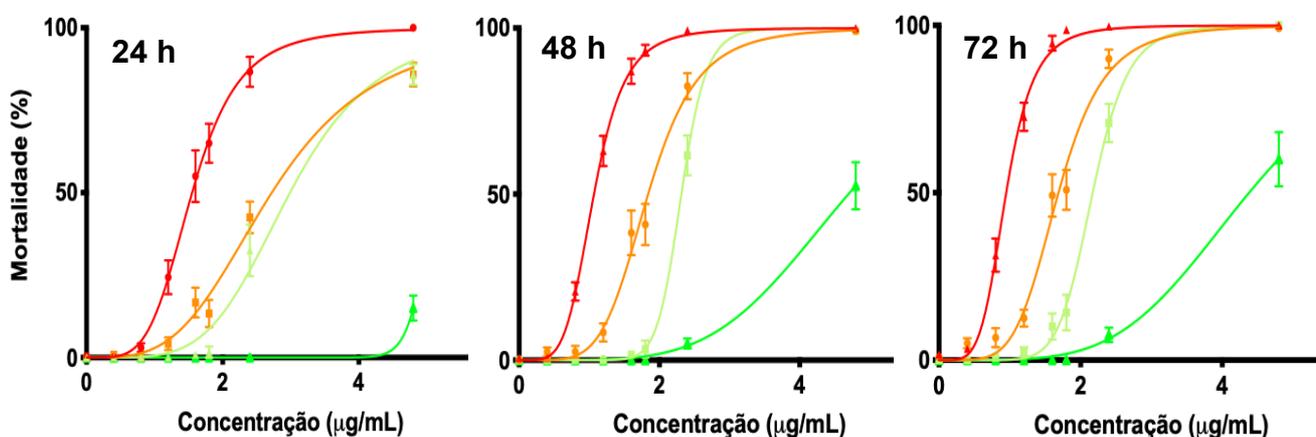


Figura 24. Gráficos resultantes da regressão não linear da atividade larvicida de ArboS187 nos diferentes recipientes após 24, 48 e 72 h de exposição. Laranja: copo com 20 mL de solução; Vermelho: copo com 200 mL de solução; Verde claro (quadrado): placa com tampa; Verde escuro (triângulo): placa sem tampa; n = 12.

Os resultados mostram que a amostra ArboS187 foi mais ativa nos recipientes com 200 mL de água, com CL₅₀ de 1,6 ppm; 1,1 ppm e 1,0 ppm após 24, 48 e 72 h de exposição, respectivamente. O resultado foi semelhante na análise não linear no GraphPad Prism. Apesar de apresentar um bom R² para a regressão no GraphPad Prism, o copo de 20 mL não se adequou ao modelo probit, já que o valor de p para Chi² foi maior que 0,05. Na Figura 23 é possível observar que o copo de 20 mL não formou uma linha reta, como visto para os outros recipientes que se adequaram ao modelo probit. Apesar disso, as CL₅₀ estimadas para os testes em copo de 20 mL, utilizando os dois métodos estatísticos foi muito próxima para 24 h, 2,82 ppm (análise Probit) e 2,72 ppm (análise em GraphPad Prism). Já a placa com tampa não se adequou ao probit e demonstrou diferença entre a CL₅₀ estimada pelos dois métodos.

O experimento padronizado para larvas mostrou que há diferença de atividade larvicida do óleo de alho ArboS187 nos diferentes recipientes. Diante da interessante atividade larvicida de óleos essenciais amplamente divulgada na literatura, os resultados apresentados ressaltam a importância de seguir o protocolo da OMS para estimativa de sua atividade. Por outro lado, o protocolo é impreciso em relação ao procedimento do experimento, uma vez que somente descreve a altura de coluna de água a ser utilizada e não faz qualquer relação com o volume de solução empregada.

O organofosforado temefós foi testado como controle positivo em recipientes de 200 mL de água com 25 larvas ou em placas com 3 mL por poço e 10 larvas. As soluções de teste para o temefós não foram preparadas como nos testes padronizados para ArboS187. Soluções estoque de temefós foram preparadas em DMSO, pipetadas diretamente na água do teste e em seguida, homogeneizadas. De acordo com a atividade preliminar observada para o temefós diferentes faixas de concentração foram utilizadas nos dois experimentos. Para teste em placa, a concentração variou de 0,05 ppm a 0,0031 ppm, enquanto nos copos as concentrações foram de 0,025 ppm a 0,0016 ppm.

A CL_{50} do temefós em todos os recipientes e tempos avaliados foi substancialmente inferior à maior concentração do óleo de alho ArboS187 (Tabela 7). Por outro lado, a atividade de temefós variou nos diferentes recipientes, assim como para o óleo de alho. Em 24 h e 48 h de exposição, a CL_{50} no copo foi de 2 a 2,6 vezes inferior que a CL_{50} da placa. A atividade só foi similar após 72 h de exposição. O temefós não é uma amostra volátil como o óleo de alho e sua atividade residual é superior a 72 h (SILVA et al., 2020b). Portanto, a diferença da atividade do temefós observada pode ser explicada por uma diferente interação do composto com o material dos recipientes, pela exposição à maior massa de temefós nos copos maiores devido à filtração da água pelas larvas ou por erros das dissoluções uma vez que as soluções não foram preparadas uniformemente como nos testes de padronização de ArboS187. Novos experimentos devem ser realizados com soluções padronizadas para avaliar o impacto da última hipótese.

Diferente do que foi observado para o teste larvicida padronizado, há alternativas para avaliação da atividade pupicida do óleo de alho ArboS187. A atividade pupicida de ArboS187 variou com CL_{50} de 17,88 ppm nas placas fechadas com 5 pupas até CL_{50} maior que 60 ppm para as placas sem tampa (Tabela 8). A CL_{50} estimada para copos de 200 mL, que seria considerado o recipiente “padrão ouro” foi

de 20,34 ppm. Da mesma forma do que foi visto para o experimento com diferentes recipientes na atividade larvicida, foi possível observar que as placas sem tampa não podem ser utilizadas para os testes pupicidas (Tabela 8). O único recipiente que parece ser reprodutível ao copo de 200 mL é o copo de 20 mL. Apesar de apresentar valor de p inferior a 0,05 no teste de verossimilhança, a placa com tampa e 5 pupas tem CL_{50} estimada dentro do intervalo de confiança (IC_{95}) do copo de 200 mL. Diante de uma restrição de disponibilidade de amostra, as placas tampadas com 5 pupas podem ser uma boa alternativa para o teste.

Tabela 7. Atividade larvicida de temefós em diferentes recipientes.

| Tempo | Recipiente | CL_{50} (ppm), (IC_{95}) |
|--------------|-------------------|---|
| 24 h | Copo200 | 0,008, (0,0076 – 0,0085) |
| | PlacaCT | 0,021, (0,018 – 0,023) |
| 48 h | Copo200 | 0,007, (0,0063 – 0,0068) |
| | PlacaCT | 0,014, (0,011 – 0,017) |
| 72 h | Copo200 | 0,006, (0,0055 – 0,0060) |
| | PlacaCT | 0,005, (0,002 – 0,007) |

Copo200: Copos plásticos com 200 mL de água e 25 larvas; PlacaCT: Placa de 12 poços com 10 larvas e 3 mL por poço com tampa; CL_{50} : Concentração letal para 50% dos indivíduos; IC_{95} : Intervalo de confiança com nível de significância de 0,05; n = 12.

Diante da diversidade de criadouros artificiais onde são encontradas as formas imaturas de *Ae. aegypti*, é importante realizar experimentos que comprovem a eficácia dos candidatos a pesticidas em diferentes recipientes. O estudo realizado mostrou que o comportamento do óleo de alho ArboS187 difere nos diferentes recipientes testados, mas que em todos os cenários teve alguma atividade mantida. Os resultados mostram que é importante levar em consideração os volumes e características dos criadouros que levem a orientações precisas de uso no eventual desenvolvimento do produto pesticida.

Tabela 8. Atividade pupicida do óleo de alho ArboS187 nos diferentes recipientes determinada por regressão probit no R Studio.

| Recipiente | CL ₅₀ (ppm) (IC ₉₅) | CL ₉₅ (ppm) (IC ₉₅) | p Chi ² | Slope | Intercept |
|---------------------|---|---|--------------------|-------|-----------|
| Copo200 | 20,3 (18,0 – 22,4) | 57,0 (51,9 – 63,7) | 0,46 | 3,21 | -4,81 |
| Copo20 | 21,7 (18,4 – 24,8) | 70,8 (60,9 – 86,8) | 0,99 | 3,68 | -4,29 |
| PlacaCT 10 P | 26,1 (19,6 – 31,6) | 99,1 (73,8 – 171,3) | 0,02 | 2,84 | -4,02 |
| PlacaST 10 P | NA | NA | NA | 0,17 | -1,58 |
| PlacaCT 5 P | 17,9 (12,8 – 22,7) | 84,3 (62,1 – 137,4) | 0,14 | 2,44 | -3,06 |
| PlacaST 5P | 56,6 (52,2 – 64,9) | 92,6 (76,4 – 142,9) | 0,0003 | 7,70 | -13,50 |

Copo200: Copos plásticos com 200 mL de água e 25 pupas; Copo20: Copos plásticos com 20 mL de água e 10 pupas; PlacaCT 10 P: Placa de 12 poços com 10 pupas e 3 mL por poço com tampa; PlacaST 10 P: Placa de 12 poços com 10 pupas e 3 mL por poço sem tampa; PlacaCT 5 P: Placa de 12 poços com 5 pupas e 3 mL por poço com tampa; PlacaST 5 P: Placa de 12 poços com 5 pupas e 3 mL por poço sem tampa. CL₅₀: Concentração letal para 50% dos indivíduos; CL₉₅: Concentração letal para 95% dos indivíduos IC₉₅: Intervalo de confiança com nível de significância de 0,05; n = 12.

Foram levantadas duas principais hipóteses para explicar diferença do perfil nos resultados do teste de padronização larvicida e pupicida: (1) as diferenças na atividade se devem a um aumento na evaporação dos compostos do alho (que são voláteis) nos recipientes com maior relação área de superfície x volume. Como a concentração nos testes pupicida chega a ser 12,5 vezes superior à concentração empregada nos testes larvicida, o efeito da evaporação pode não ser tão significativo para as pupas. (2) Uma vez que as larvas filtram a água, estariam expostas a uma quantidade maior de composto em grandes volumes do que em pequenos volumes. Portanto, mais larvas morreriam em recipientes com maior volume de água. Como as pupas não filtram a água, esse fenômeno não aconteceria nos recipientes dos testes pupicidas.

Como descrito anteriormente, a atividade larvicida nos diferentes recipientes foi estatisticamente distinta, enquanto nos testes pupicidas, alguns recipientes tiveram resultados semelhantes. Dentre as hipóteses, especulou-se que a capacidade de filtração das larvas seria um fator importante para a diferença encontrada. Dessa forma, uma mesma solução do óleo de alho ArboS187 a 2,4 ppm foi distribuída em copos plásticos em 200 mL com 25 larvas, 120 mL com 50 larvas e 120 mL com 25 larvas, todos em quadruplicata. Em 24 h, as mortalidades médias foram

respectivamente de 35%, 18% e 15% (Figura 25). Em 48 h foram de 77%, 42% e 45%. A mortalidade final observada após 72 h foi de 82%, 54% e 62%.

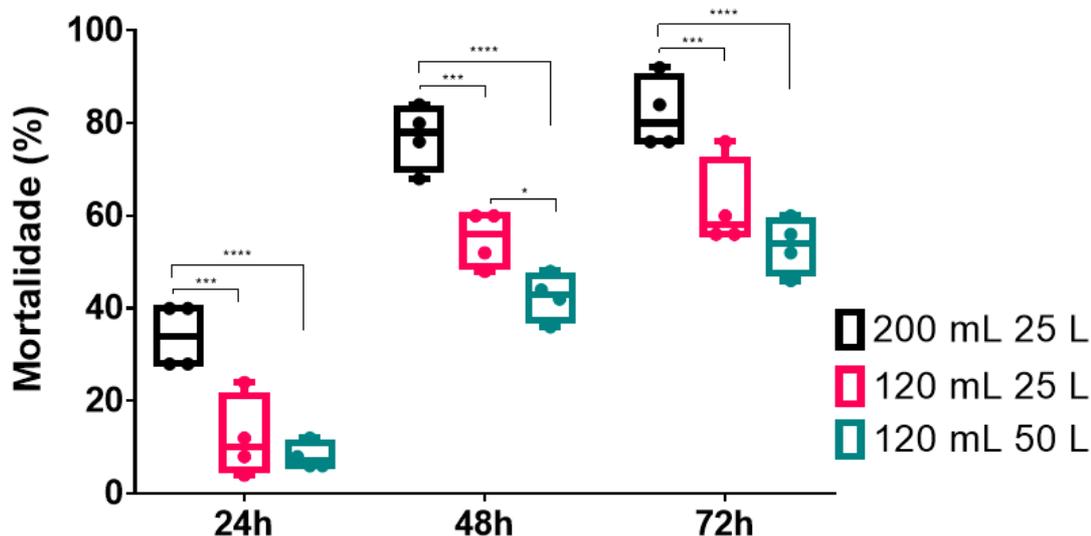


Figura 25. Mortalidade de larvas tratadas com 2,4 ppm do óleo de alho ArboS187 em diferentes volumes e densidade de larvas (L); n=3

A análise de variância ANOVA seguida pelo pós teste de Tukey mostrou que só há diferença significativa entre os recipientes com 200 mL e 120 mL em todos os tempos avaliados. Não houve diferença entre os recipientes com mesmo volume (120 mL) e com diferente densidade de larvas (50 vs 25 larvas), indicando que sua capacidade de filtração não parece ser determinante para a diferença de atividade vista nos diferentes volumes de água. Por outro lado, a diminuição em quase pela metade do volume alterou significativamente a relação área de superfície / volume de água.

Para verificar o efeito da relação área/volume, foram realizados experimentos por HPLC-UV (210 nm). Na maior concentração do teste, no tempo 0, os compostos não são visíveis. Por isso, o óleo de alho em água foi concentrado através de eluição em cartuchos SPE C₁₈. Por se tratar de compostos apolares, ficam retidos na fase estacionária de C₁₈ quando da adição da água e só são eluídos com solvente orgânico como o metanol.

A quantidade de DAS3 recuperada imediatamente após a transferência da solução para os recipientes foi semelhante entre os recipientes, sendo estatisticamente diferente somente entre a área de DAS3 no copo de 20 mL e na placa

($p < 0,05$) (Figura 26). A pequena diferença na área de pico no tempo 0 sugere que o material dos recipientes não é um fator importante para a alteração da área de pico encontrada. Ao longo de todo o experimento, não houve diferença estatística entre a área de DAS3 no copo com 200 mL e copo com 120 mL (Figura 26) apesar de que a pequena variação de concentração parece impactar a atividade biológica (Figura 25).

Por outro lado, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a área de DAS3 no copo de 200 mL e os outros tipos de recipientes após 4 h e 24 h de exposição. Essa diferença se expressa na atividade biológica, em que a atividade larvicida é diferente entre todos os recipientes (Tabelas 5 e 6). Não houve diferença estatística entre o copo de 20 mL e a placa fechada após 4 h e 24 h, sugerindo que a taxa de volatilização nesses recipientes seria semelhante. A atividade larvicida entre esses dois recipientes é similar, sendo, em 24 h, a CL_{50} de 2,7 ppm (IC_{95} 2,6 - 2,9) para copo de 20 mL e 3,0 ppm (IC_{95} 2,7-3,2) (Tabela 6).

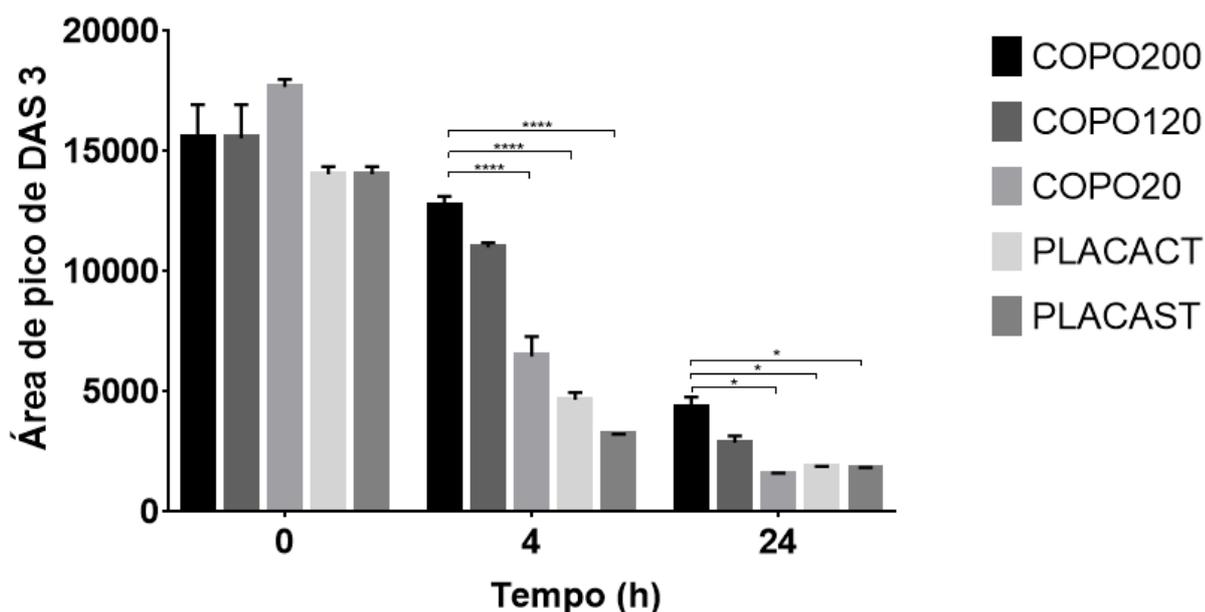


Figura 26. Área de pico de DAS3 nos diferentes recipientes após concentração do óleo de alho em cartuchos de SPE C_{18} . Diferença estatística expressa em relação ao Copo200: ****: $p < 0,0001$; *: $p < 0,05$. PLACACT: Placa com tampa; PLACAST: Placa sem tampa.

Sabe-se que os polissulfetos, especialmente de cadeia longa, são instáveis e se rearranjam levando à formação de polissulfetos de cadeia menor (ARBACH et al., 2019). Por isso, uma diminuição da área de pico de DAS3 poderia representar um aumento na quantidade de outros polissulfetos. Desta forma, foram analisadas as somas da área de pico de DAS2, DAS3 e DAS4, polissulfetos mais abundantes no

óleo. O padrão de perda de todos esses polissulfetos foi semelhante ao observado para DAS3. Na Tabela 9 é possível observar que houve redução dos três polissulfetos ao longo do experimento. No geral, DAS4 foi o polissulfeto com maior redução de concentração nas 4 primeiras h.

Após 4 h de exposição ao ambiente do insetário, apenas 36,5%, 22,6% e 33,1% da área inicial de DAS3 foi mantida no copo de 20 mL, na placa aberta e na placa fechada, respectivamente (Tabela 9). A redução de área de DAS3 nos copos com maior volume de água foi expressivamente inferior, chegando a 81,8% e 70,8% da área inicial para respectivamente o copo com 200 mL e copo com 120 mL. Ao final do experimento, não foi possível detectar DAS2 e DAS4 nos recipientes, exceto no copo de 200 mL. A CL_{50} para larvas é a menor nos copos com 200 mL de solução (Tabelas 5 e 6), o que pode estar relacionado à maior persistência dos polissulfetos nesse recipiente e volume de água. Diante da diferente dinâmica da absorção de compostos pelas pupas em relação às larvas, o efeito da volatilização dos compostos não pode ser diretamente relacionado à atividade pupicida. Aliados aos resultados de atividade biológica, esses resultados sugerem que a volatilização é o fator mais impactante na diferença da atividade observada entre os diferentes recipientes. Ainda, a rápida volatilização dos compostos faz com que os compostos não persistam no meio ambiente causando reduzidos impactos à outras formas de vida e não bioacumulando.

Tabela 9. Percentual dos polissulfetos nos diferentes recipientes em relação à área de pico inicial (HPLC-UV, 210 nm).

| | 4h | | | | 24h | | | |
|----------|------|------|------|------------------|------|------|------|------------------|
| | DAS2 | DAS3 | DAS4 | Soma DAS2 - DAS4 | DAS2 | DAS3 | DAS4 | Soma DAS2 - DAS4 |
| COPO200 | 78,5 | 81,8 | 36,1 | 73,3 | 9,6 | 27,8 | 12,7 | 22,8 |
| COPO20 | 34,8 | 36,5 | 22,2 | 33,5 | 0,0 | 8,7 | 0,0 | 4,8 |
| PLACA ST | 6,9 | 22,6 | 9,1 | 15,7 | 0,0 | 12,5 | 0,0 | 6,7 |
| PLACA CT | 24,7 | 33,1 | 26,9 | 29,6 | 0,0 | 13,0 | 0,0 | 7,0 |
| COPO120 | 58,1 | 70,8 | 60,5 | 65,5 | 0,0 | 18,4 | 0,0 | 10,1 |

PLACA CT: Placa com tampa; PLACA ST: Placa sem tampa.

Atividade larvicida e pupicida dos polissulfetos isolados e dos óleos de alho enriquecidos

A elucidação da potência dos diferentes polissulfetos pode levar ao desenvolvimento de formulações mais potentes a partir de óleos de alho enriquecidos. Os polissulfetos DAS2-DAS5 foram isolados a partir do óleo de alho em HPLC preparativo e suas estruturas foram individualmente confirmadas pela comparação dos espectros de ^1H NMR com dados da literatura (WANG et al., 2013). Os compostos foram então testados isoladamente e usados para enriquecimento do óleo de alho (Tabela 10). DAS3 e DAS4 foram mais ativos que os outros polissulfetos em larvas na exposição de 24 h, porém foram menos ativos que o óleo de alho (Figura 27). Tanto DAS2 quanto DAS4 chegaram ao mesmo nível de atividade das outras amostras após 72 h. Curiosamente, todos os polissulfetos isolados foram menos ativos em larvas em 24 h que os óleos de alho individualmente suplementados por esses mesmos compostos (DUSI et al., 2022). Sarma et al. reportaram que DAS2 e DAS3 foram menos ativos que o óleo de alho após 72 h em larvas de *Ae. aegypti*, e que DAS3 foi mais ativo nas primeiras 24 h (SARMA et al., 2019).

Tabela 10. Percentual da área de pico dos polissulfetos de dialila (DAPS) determinados por HPLC-UV a 210 nm no óleo de alho original e nos óleos de alho suplementados com polissulfetos.

| Amostra | Tempo (h) | % | | | | | DAS2-DAS5 |
|-----------------------|-----------|------|------|------|------|-------------|-----------|
| | | DAS2 | DAS3 | DAS4 | DAS5 | | |
| Óleo de alho ArboS187 | 0 | 16,9 | 53,9 | 19,0 | 3,8 | 93,6 | |
| | 24 | 15,6 | 54,9 | 20,8 | 4,1 | 95,3 | |
| | 48 | 14,4 | 55,0 | 21,5 | 4,3 | 95,2 | |
| | 72 | 13,1 | 55,3 | 22,6 | 4,7 | 95,7 | |
| 1:1 ArboS187 + DAS2 | 0 | 53,4 | 30,5 | 10,8 | 2,2 | 96,9 | |
| | 24 | 52,9 | 30,3 | 10,9 | 2,1 | 96,2 | |
| | 48 | 52,6 | 30,9 | 11,6 | 2,2 | 97,3 | |
| | 72 | 52,5 | 31,3 | 11,6 | 2,1 | 97,5 | |
| 1:1 ArboS187 + DAS3 | 0 | 7,9 | 79,8 | 8,6 | 1,5 | 97,8 | |
| | 24 | 7,3 | 77,8 | 11,6 | 1,2 | 97,9 | |
| | 48 | 6,7 | 77,1 | 12,9 | 1,5 | 98,1 | |
| | 72 | 6,1 | 77,3 | 13,4 | 1,3 | 98,1 | |
| 1:1 ArboS187 + DAS4 | 0 | 7,0 | 22,5 | 66,8 | 1,6 | 97,9 | |
| | 24 | 7,1 | 40,2 | 37,2 | 11,3 | 95,8 | |
| | 48 | 8,2 | 43,5 | 32,8 | 11,4 | 95,9 | |
| | 72 | 10,6 | 41,7 | 32,1 | 11,7 | 96,1 | |
| | 0 | 7,5 | 23,5 | 9,3 | 56,6 | 96,8 | |

| | | | | | | |
|--------------|----|------|------|------|------|-------------|
| 1:1 ArboS187 | 24 | 8,0 | 39,8 | 31,5 | 13,5 | 92,8 |
| + DAS5 | 48 | 10,3 | 38,7 | 30,6 | 12,6 | 92,2 |
| | 72 | 12,0 | 36,8 | 29,3 | 12,0 | 90,0 |

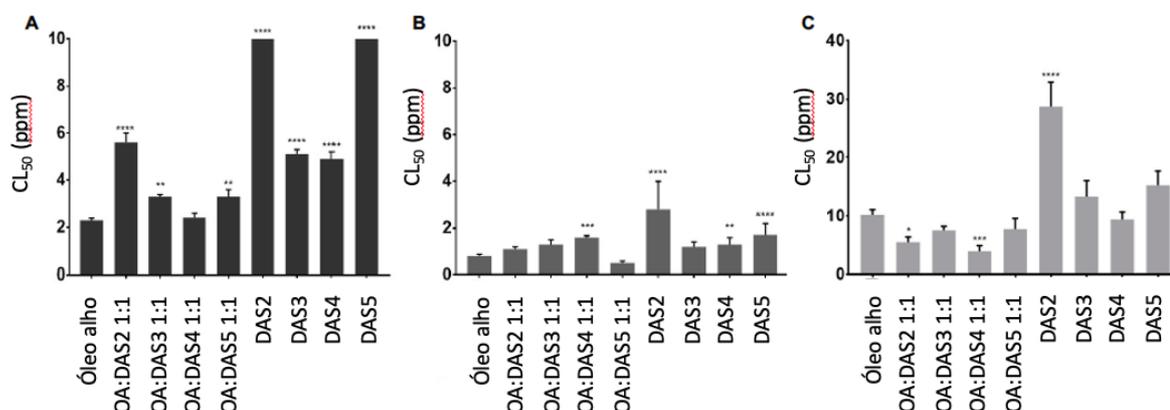


Figura 27. Valores da concentração letal média (CL_{50}) para os polissulfetos isolados, óleo de alho ArboS187 e óleos de alho suplementados com polissulfetos em larvas de *Ae. aegypti* após 24 h (A), 48 h (B) e pupas (C). Significância estatística (valor de p) relacionados à atividade do óleo de alho ArboS187. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$; ****: $p \leq 0.0001$. OA: Óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022)

O óleo de alho ArboS187 junto ao óleo suplementado com DAS4 foram as amostras mais ativas em larvas em 24 h. Todas as outras amostras testadas em larvas tiveram potências estatisticamente diferentes quando comparadas à atividade do óleo original em 24 h. Após 72 h, o óleo enriquecido com DAS5 foi o mais ativo com CL_{50} de 0,5 ppm em larvas. A atividade pupicida do óleo enriquecido com DAS4 e DAS2 foi significativamente mais potente (CL_{50} de 4,0 ppm e 5,5 ppm, respectivamente) do que o óleo de alho original (CL_{50} de 10,2 ppm).

Na literatura, a CL_{50} larvicida estimada para um óleo de alho rico em DAS2 (49,1% DAS2) foi de 7,95 ppm (7,19 – 8,66) (MUTURI et al., 2018, 2019). A proporção dos polissulfetos desse óleo é similar à reportada neste trabalho para o óleo suplementado com DAS2, mas a CL_{50} aqui estimada foi de 5,6 ppm (4,9 – 6,4) (Figura 27). Outro óleo de alho suplementado com DAS2 (37,4% DAS2) com 4,3% DAS, 10,9% DAS3 e 0,4% DAS4 tiveram CL_{50} de 7,05 ppm (6,12 – 7,82) em larvas de *Culex pipiens* em 48 h. O óleo original desse estudo possuía 7,2% de DAS2, 16,3% DAS3 e 0,7% DAS4 e teve CL_{50} ligeiramente superior, de 8,01 ppm (7,64 – 8,36) (KIMBARIS et al., 2009).

DAS2 parece ter efeito antagônico quando em combinação com outros compostos. A interação de DAS2 com trans-anetol e alfa-pineno foi antagônica em larvas do besouro *Tribolium castaneum* (SHAHRIARI et al., 2016). Por outro lado, a combinação com timol foi apenas aditiva. É importante avaliar o efeito da combinação dos componentes e do óleo do alho com outros princípios ativos. Por seu odor pungente, é de grande interesse fazer a combinação do óleo de alho com outros compostos de odor agradável para mascarar o cheiro característico de alho. Portanto, é essencial antes compreender o efeito dessas combinações na atividade esperada.

Enquanto há diferenças significantes nas atividades observadas (Figura 27), a tendência geral é de que os óleos são mais ativos que os polissulfetos isolados. O mecanismo de ação já estudado em outros organismos sugere que esses compostos interagem com tióis de baixo peso molecular, como a glutatona e cisteína, causando um desequilíbrio do potencial redox intracelular (ANWAR et al., 2017; ARBACH et al., 2019).

Outro possível mecanismo de ação dos polissulfetos foi observado em larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* (GEORGE; AMONKAR; EAPEN, 1973). No estudo foi demonstrado que larvas tratadas com óleo de alho tiveram inibição da síntese de proteínas. Para o estudo, larvas foram tratadas com aminoácidos essenciais marcados isotopicamente. Foi observado que o óleo de alho só afeta a produção de novas proteínas, mas é incapaz de alterar as proteínas já existentes (GEORGE; AMONKAR; EAPEN, 1973). Possivelmente os polissulfetos podem atuar nos mesmos alvos de síntese proteica, e suas combinações possam afetar de forma mais impactante esse sistema.

A variação da potência dos diferentes óleos de alho testados é significativa, mas pode ser irrelevante diante da pequena magnitude das concentrações para levar a uma atividade larvicida ou pupicida. Ainda, algumas composições de óleo foram mais ativas em pupas e menos ativas em larvas, e vice-versa (Figura 27). Por exemplo, o óleo suplementado com DAS4 foi significativamente menos ativo em larvas (em 72 h), mas foi mais potente em pupas do que o óleo original. Em conjunto, esses resultados sugerem que alterações nas proporções dos DAPS podem não ser significativas para impactar a atividade global do óleo de alho nas diversas formas de vida na qual é ativo. As diferenças referidas são quanto à alterações nas proporções dos polissulfetos, porém a concentração da combinação dos polissulfetos (DAS2-DAS5) deve ser mantida. Dados na literatura sugerem que a suplementação com DAS

pode afetar negativamente a atividade do óleo de alho por reduzir a proporção dos outros polissulfetos mais ativos. Um óleo de alho enriquecido com DAS teve CL_{50} larvicida de 24,3 ppm enquanto a CL_{50} do óleo original foi 8,0 ppm para *Culex pipiens* em 48 h (KIMBARIS et al., 2009).

O óleo de alho natural contém outros compostos organosulfurados minoritários que podem contribuir para a atividade biológica (SATYAL et al., 2017). Os óleos estudados neste trabalho são compostos principalmente pelos polissulfetos DAS2-DAS5 e somente o efeito desses compostos na atividade foram investigados. De acordo com as análises químicas (Tabela 3) do óleo de alho original ArboS187, é pouco provável que compostos que não sejam os polissulfetos sejam responsáveis pelas atividades inseticidas observadas. A atividade mais potente do óleo em comparação com os polissulfetos isolados pode ser resultado de uma interação sinérgica entre os compostos. Contraditoriamente, Sarma et al. sugeriram que mistura de DAS2 e DAS3 levam a um efeito antagônico em larvas e mosquitos adultos de *Ae. aegypti* (SARMA et al., 2019). Entretanto, produtos naturais, especificamente óleos essenciais, são reconhecidos como larvicidas mais potentes que seus compostos isoladamente (SILVÉRIO et al., 2020). A combinação de compostos vista nos óleos pode impactar não somente a eficácia, mas também o desenvolvimento de resistência por atuarem em diferentes alvos moleculares (ANWAR et al., 2017; ARBACH et al., 2019).

Os polissulfetos do alho provavelmente não permanecem como um único composto quando isolados, principalmente os polissulfetos de cadeia longa (Arbach et al., 2019). Amostras de DAS2, DAS3, DAS4, DAS5, do óleo de alho original ArboS187 e do óleo de alho modificado (Arbo2A170A) que foram preparados em etanol para os ensaios biológicos foram estocados a temperatura ambiente e analisados por HPLC-UV (Figura 27 e Tabela 10). DAS2 e DAS3 se mantiveram estáveis ao longo de todo o tempo do experimento larvicida e pupicida. Como já reportado (ARBACH et al., 2019), a estabilidade dos polissulfetos é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia de enxofre, como visto para DAS4 e DAS5 na Figura 28A. Em estudo anterior, 50% do DAS5 foi perdido nas primeiras 4 h após isolamento por HPLC (ARBACH et al., 2019), enquanto neste estudo apenas 25% do DAS5 inicial permanecia nos vials após 24 h. Diferente dos estudos de volatilização dos diferentes recipientes, as amostras reportadas nessa seção permaneceram em vials com tampa rosqueada ao longo de todas as análises.

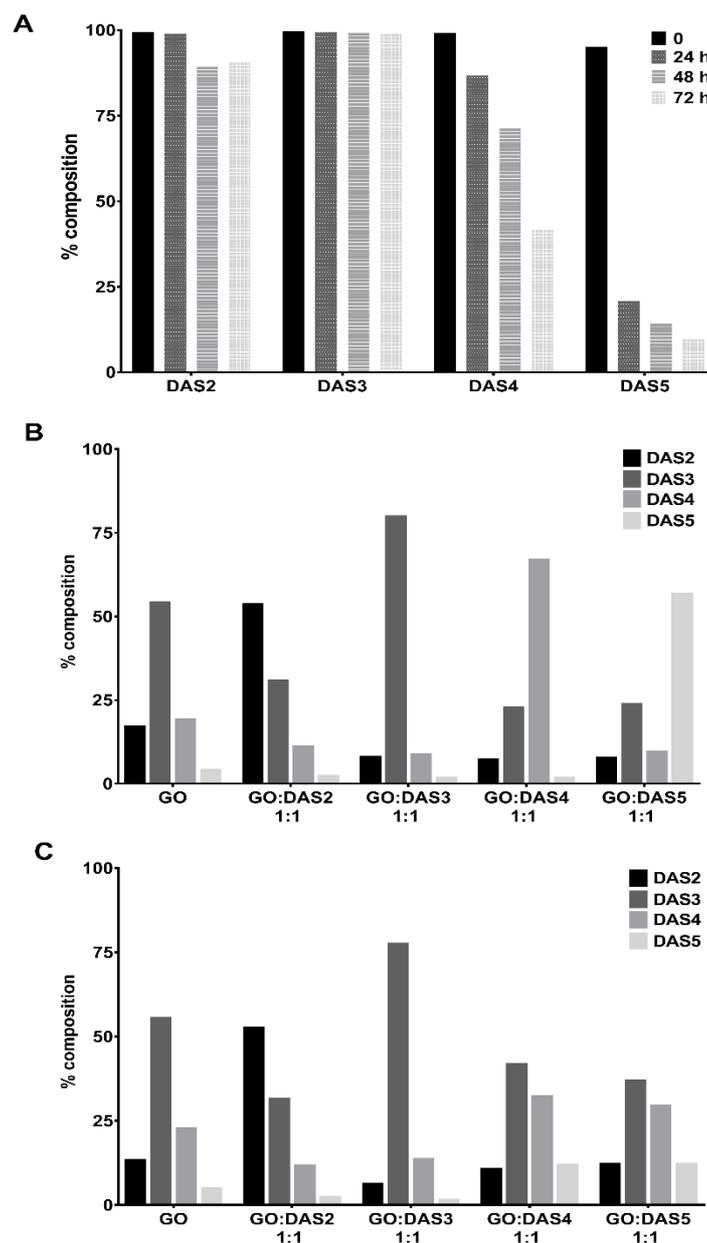


Figura 28. Percentual da área dos polissulfetos determinados por HPLC-UV a 210 nm em diferentes tempos. A: Polissulfetos isolados; B: Composição dos óleos de alho no tempo 0; C: Composição dos óleos de alho após 72 h. GO – Óleo de alho ArboS187 (DUSI et al., 2022).

O óleo de alho ArboS187 não teve alteração em sua composição após 72 h quando comparado com a análise no tempo 0 (Figura 28B e 28C). Assim como observado para DAS4 e DAS5 isolados, os óleos enriquecidos com esses compostos chegaram a um equilíbrio, sendo ricos em DAS3 e DAS4 (Figura 28B e 28C). Como essas amostras analisadas em HPLC permaneceram em condições diferentes das condições experimentais dos ensaios biológicos, provavelmente as variações observadas podem ser diferentes no ambiente biológico. Além da inclusão de

sistemas biológicos vivos, a água da torneira, temperatura do insetário e diferentes graus de volatilização dos compostos podem ter alterado de maneira diferente a composição das amostras. De qualquer forma, a instabilidade dos polissulfetos de cadeia longa e a rápida volatilização dos compostos a toxicidade para larvas e pupas observada após 72 h de exposição pode ser um efeito residual da exposição inicial aos DAPS. Em resumo, a menor atividade dos polissulfetos isolados junto à sua instabilidade indicam que o isolamento dos polissulfetos para atividade inseticida não é aconselhado.

Testes em condições de semi-campo do óleo de alho ArboS187

Para observar o comportamento do óleo de alho em condições próximas às reais, foram realizados testes semi-campo tanto para larvas e pupas em baldes plásticos contendo 8 litros de água da torneira. As concentrações foram selecionadas para os testes pupicidas com base no LC₉₀ (43,0 ppm); LC₈₀ (33,5 ppm) e na menor concentração testada em copos de 200 mL que matou todas as pupas (60,0 ppm). Apesar de ter menor atividade nos copos, todas as 3 concentrações mataram praticamente 100% das pupas nos baldes testados (Figura 29). A temperatura durante os três testes variou de 9,1 °C a 34,8 °C e a umidade relativa mínima foi de 24%. Esse experimento demonstrou que o óleo de alho ArboS187 mantém seu potencial pupicida em condições de semi-campo.

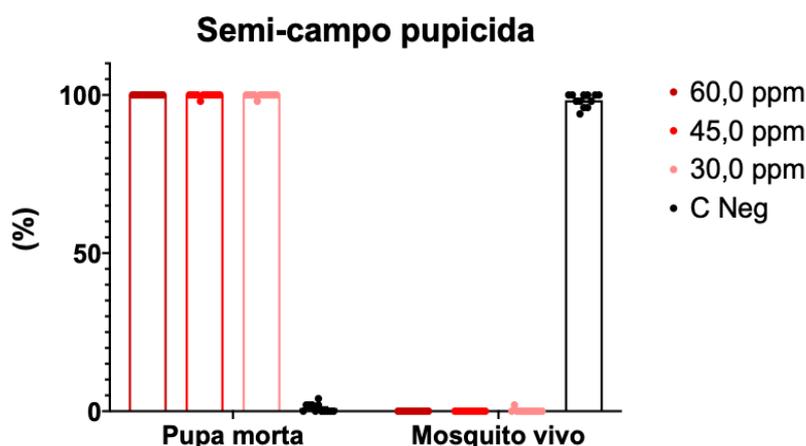


Figura 29. Resultado do teste pupicida em condições de campo com o óleo de alho ArboS187. C Neg: controle negativo DMSO 0,012%. n = 12.

Para os testes em condições de semi-campo para larvas foram selecionadas as concentrações de 4,0 ppm, 3,0 ppm e 1,5 ppm. As duas maiores concentrações mataram quase 100% das larvas em 24 h (Figura 30). Para 1,5 ppm a mortalidade aumentou ao longo do experimento, atingindo mais de 95% em 48 h. Nos copos, essa concentração mata aproximadamente 50% das larvas. A temperatura durante os três testes variou de 10,4 °C a 28,8 °C e a umidade mínima foi de 44%. Assim como observado para o teste semi-campo com pupas, a amostra ArboS187 foi mais ativa em testes semi-campo do que nos cenários de laboratório.

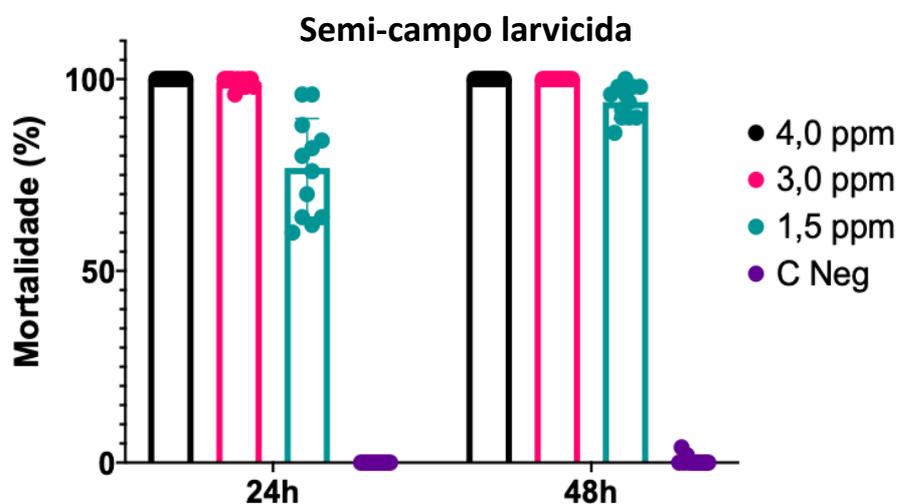


Figura 30. Resultado do teste larvicida em condições de campo com o óleo de alho ArboS187. C Neg: controle negativo composto por DMSO 0,012% (n=12).

Atividade ovicida do óleo de alho ArboS187

A capacidade de permanecer viável por mais de um ano e a imobilidade, fazem com que os ovos do mosquito sejam os alvos ideais para o controle vetorial. Por outro lado, os ovos de *Ae. aegypti* são extremamente resistentes e possuem estruturas que torna muito difícil sua permeação. Os estudos sobre atividade ovicida de compostos, são, portanto, escassos. Além do baixo potencial de toxicidade aos ovos, os testes podem ser pouco reprodutíveis, uma vez que diferentes lotes de ovos podem apresentar taxas de eclosão completamente diferentes. Por essa razão, nesse estudo utilizamos ovos de 4 diferentes lotes, que demonstraram diferentes graus de viabilidade. Para que os resultados fossem padronizados, a mortalidade dos ovos foi corrigida segundo a fórmula de Henderson-Tilton (HENDERSON; TILTON, 1955).

O óleo de alho ArboS187 a 100 ppm inibiu $59,6 \pm 10,6\%$ ($n=4$) a eclosão de ovos após correção da mortalidade com a fórmula de Henderson-Tilton. Na média, a eclosão foi de $28,3 \pm 5,9\%$ para o óleo de alho e $70,7 \pm 9,4\%$ para o controle de DMSO. A viabilidade dos ovos variou de 19,4% a 33,6% para os ovos tratados com óleo de alho e 54,7% a 87,7% para o controle negativo (DUSI et al., 2022). As taxas de eclosão dos ovos podem variar de acordo com o tempo e condições de estocagem dos ovos (SOARES-PINHEIRO et al., 2016, p.). A temperatura do ambiente e dos criadouros pode também impactar a viabilidade e retardar a emergência dos ovos (BYTTEBIER; DE MAJO; FISCHER, 2014).

Em outro estudo, mortalidade de 100% dos ovos de *Ae. aegypti* foi reportada após 72 h de exposição a uma solução a 100 ppm de óleo de alho (SARMA et al., 2020). Para o experimento, apenas as larvas que eclodiram espontaneamente foram contadas. No nosso estudo, nenhuma larva eclodiu espontaneamente após exposição ao alho ArboS187 por 48 h, enquanto 85% das larvas que eclodiram no controle o fizeram de maneira espontânea no mesmo período. Uma vez que o óleo de alho possui atividade larvicida, a água tratada poderia estar matando as larvas recém eclodidas ao invés de afetar diretamente os ovos. Para verificar a atividade ovicida os ovos foram transferidos para água limpa e a eclosão estimulada em câmara de vácuo.

Um estudo de microscopia eletrônica de varredura investigou o potencial ovicida de extrato aquoso de alho e do conteúdo de uma cápsula de alho (JARIAL, 2001). O estudo concluiu que a 6% não houve eclosão de larvas nos ovos tratados, mas para as cápsulas, alguns ovos tentaram eclodir, promovendo fissuras no córion, porém foram incapazes de eclodir completamente e morreram. Em outra publicação a CL_{50} ovicida do óleo de alho em *Ae. aegypti* foi de 1,0 ppm (SARMA et al., 2020). A publicação dá poucos detalhes do método utilizado para realização dos testes. A efetiva eclosão dos ovos do controle não é demonstrada no artigo, o que impõe questionamentos acerca da validade dos experimentos conduzidos.

O ovo é reconhecido como o estágio mais resistente de *Ae. aegypti*, permanecendo viável por muitos meses mesmo sem a presença de água (KLIEWER, 1961). Por conta dessa resistência à dessecação, as populações de mosquito sobrevivem em regiões que passam por prolongados períodos de seca, como grande parte da região Centro-Oeste do Brasil. Na subsequente estação chuvosa há aumento exponencial nas populações de mosquitos com o avanço da pluviosidade. A transmissão transovariana de arbovírus já reportada sugere que esse é um dos

fenômenos responsáveis pela manutenção da circulação viral em períodos interepidêmicos (JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002). Os ovos de *Ae. aegypti* são alvos cruciais e muito desafiadores para o desenvolvimento de estratégias de controle vetorial.

Atividade do óleo de alho ArboS187 em *Ae. aegypti* adultos

Toxicidade

Para essa avaliação, as 25 fêmeas de *Ae. aegypti* (n=4) foram inseridas em garrafas pré-tratadas com o óleo de alho ArboS187 (10 µL por garrafa) e as garrafas avaliadas até 24 h depois, de acordo com a metodologia do CDC (CDC, 2010). O tempo diagnóstico, ou tempo para que todos os mosquitos morram ou sofram KD (*knockdown*) em uma determinada dose, foi de 25 minutos (DUSI et al., 2022). Foi observado no experimento que todos os mosquitos permaneceram imóveis após 24 h, resultando em 100% de mortalidade (DUSI et al., 2022). O tempo diagnóstico de 25 min observado para o óleo de alho ArboS187 é comparável ao tempo diagnóstico de outros inseticidas comuns como o malation e permetrina (CDC, [s.d.]). Por outro lado, quantidades maiores de óleo de alho foram necessárias para esse efeito. Por exemplo, para tempos diagnósticos de 15 e 10 min, 0,4 mg de malation e 0,043 mg de permetrina, respectivamente, são necessários.

A alta volatilidade do óleo também pode fazer com que diferentes concentrações de óleo permaneçam na garrafa nos diferentes experimentos. Dessa forma, a cada replicação dos experimentos, a atividade pode variar significativamente. Possivelmente em algumas garrafas houve maior perda de compostos que em outro dia de experimento. Em razão disso, as taxas de toxicidade variam de um teste para outro, pois há diferença na exposição dos mosquitos à amostra. Uma vez detectada a atividade adulticida da amostra, sugere-se propor formulações de maior duração que possam minimizar a variação dos resultados pela volatilização dos compostos.

Repelência espacial e irritação por contato

A repelência espacial de mosquitos é considerada uma ferramenta promissora para auxiliar no controle da transmissão de arbovirose. O principal objetivo dessa

tecnologia é prevenir que mosquitos se aproximem de áreas em que possam encontrar com um hospedeiro humano. Um repelente espacial ideal não deve causar mortalidade nas doses repelentes, o que acredita-se que diminua a pressão para o desenvolvimento de resistência (ACHEE et al., 2012).

No ensaio de repelência espacial, a amostra fica em um gradiente de concentração ao longo do aparato (Figura 5), em que a extremidade onde está a tela tratada tem maior concentração do composto, que vai diminuindo até o outro extremo do tubo onde está o controle negativo. Os mosquitos são inseridos no compartimento central e voam para as extremidades de acordo com sua percepção do ambiente. Se existe um composto altamente repelente, os mosquitos tendem a ser repelidos e se alojam no compartimento controle, gerando valores de SAI (*Spatial Activity Index*) acima de zero. Caso o composto tenha média repelência, os mosquitos terão alguma tendência de deslocamento para o controle negativo, mas a maior parte não será repelida do compartimento central, levando a valor de SAI próximo a zero. Na presença de um composto atraente, os mosquitos serão mais direcionados para o cilindro tratado e os valores de SAI serão negativos.

O óleo de alho ArboS187 foi testado a 7,5%, 5,0%, 2,5% e 1,0% (v/v) utilizando o aparato HITSS (*High-throughput screening system*; Figura 5) para avaliação de sua repelência espacial (n=9). O valor de SAI das três maiores concentrações foi significativamente maior que o SAI do controle negativo, alcançando $0,67 \pm 0,17$ (2,5%), $0,71 \pm 0,1$ (5,0%) e $0,56 \pm 0,24$ (7,5%) (DUSI et al., 2022). O maior valor de wSAI (*weighted spatial activity index*) obtido foi de $15,2 \pm 6,8$ para a concentração de 7,5%, o que é considerado baixo. Apesar de SAI estatisticamente significativo e indicando boa repelência espacial, os valores de wSAI foram baixos por conta de uma baixa resposta dos mosquitos no experimento. Para todas as concentrações a PRESP (percentual de resposta) ficou abaixo de 20%, ou seja, a maior parte dos mosquitos não se movimentaram durante o teste. Um baixo percentual de resposta foi também observado para o controle positivo PMD (p-mentano-3,8-diol), em que somente $21,6\% \pm 4,9\%$ dos mosquitos responderam. O wSAI ($17,2 \pm 5,7$) e SAI ($0,64 \pm 0,23$) do controle positivo PMD a 20% foram comparáveis aos valores observados para o óleo de alho testado em menor concentração (7,5%, 5,0% e 2,5%).

Apesar da tendência do aumento de repelência com o aumento da concentração de óleo de alho, tanto o SAI quanto o wSAI das maiores doses não foram significativamente diferentes. Apesar da porcentagem de mosquitos que

responderam aos tratamentos ter sido baixa, os mosquitos ficaram muito agitados durante o teste, com vôos aleatórios. Portanto, concluímos que o aparato poderia ter ficado completamente saturado durante os experimentos e os mosquitos não conseguiram identificar uma área com ar limpo para onde pudessem escapar. Esses resultados indicam que o aparato HITSS pode não ser adequado para produtos altamente voláteis.

Diante da potencial atividade repelente espacial e ausência de mosquitos *knockdown*, mesmo nas maiores concentrações, o experimento foi conduzido em condições simuladas de campo. Duas salas do insetário foram conectadas por um tubo de 1,3 m que permitia o livre acesso de uma sala a outra. Uma gaiola foi posicionada ao final de cada extremidade do tubo, dentro da sala de controle e da sala tratada com óleo de alho (Figura 6). Ao se utilizar 150 μL de óleo de alho ArboS187 para a sala de teste, a concentração testada ficou em 0,015 mL/m^3 . Nesse cenário o SAI foi de $0,5 \pm 0,17$ e o wSAI de 31,9 (DUSI et al., 2022). Os valores de SAI, wSAI e os dados brutos do experimento indicam que houve movimento direcionado de escape dos mosquitos para a sala não tratada com óleo de alho. Mais da metade dos mosquitos voaram para a sala controle durante as 9 repetições do experimento.

É importante salientar que no teste de repelência espacial, não há contato tarsal do composto testado com o mosquito, mas sim uma percepção das partículas dispersas no ar. O maior trunfo do repelente espacial é prevenir o encontro do mosquito com um hospedeiro, sem que haja a necessidade de contato direto do mosquito com áreas tratadas. Essa estratégia evita a aproximação dos mosquitos de áreas onde estão pessoas, diminuindo o risco de transmissão de patógenos. O óleo de alho se mostrou um bom candidato para o desenvolvimento de um repelente espacial.

Uma segunda estratégia repelente é através do uso de compostos que promovam irritação do mosquito pelo contato direto, fazendo com que se evadam da área tratada. Novamente a 1,0%, o óleo de alho causou irritação por contato, com $66,03\% \pm 7,86$ de escape ($P = 0,004$) do cilindro com tratamento (DUSI et al., 2022). A Figura 31 apresenta a resposta de escape associada a KD ou sobrevivência do teste de irritação por contato. A altura das barras representa os mosquitos sobreviventes, que tiveram maior exposição (não escaparam) e aqueles que foram repelidos. O controle positivo PMD causou escape de $42,4\% \pm 14,13\%$ dos mosquitos

na concentração de 20%. Por comparação direta, o óleo de alho é mais irritante para os mosquitos do que o PMD, um repelente comercial.

Os valores de KD no experimento não foram relevantes. Desta forma, o óleo não apresenta toxicidade para o tipo de exposição avaliado, o que é importante para o desenvolvimento de novos inseticidas, no sentido de se reduzir a pressão seletiva e possível desenvolvimento de resistência pelos vetores (ACHEE et al., 2012). Caso o valor de KD fosse alto, não seria possível observar o efeito repelente. Para avaliar o efeito repelente, portanto, os mosquitos devem permanecer vivos e responder ao composto testado.

O óleo de alho consta na lista EPA 25(B) da agência americana de proteção ambiental (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, [s.d.]). Nessa lista estão os ingredientes ativos considerados seguros e que requerem menos etapas para o processo de registro e comercialização. Em um estudo com 21 dos 44 ingredientes ativos que constam na lista, o alho se mostrou um dos repelentes mais ativos no teste em olfatômetro em Y com fêmeas de *Ae. aegypti* (MITRA et al., 2020). O efeito repelente, durou menos de 30 min, o que é insuficiente para atingir uma atividade repelente sustentada. Apesar da potência repelente do óleo de alho, a falta de residualidade impede demanda extensas pesquisas de desenvolvimento de formulações.

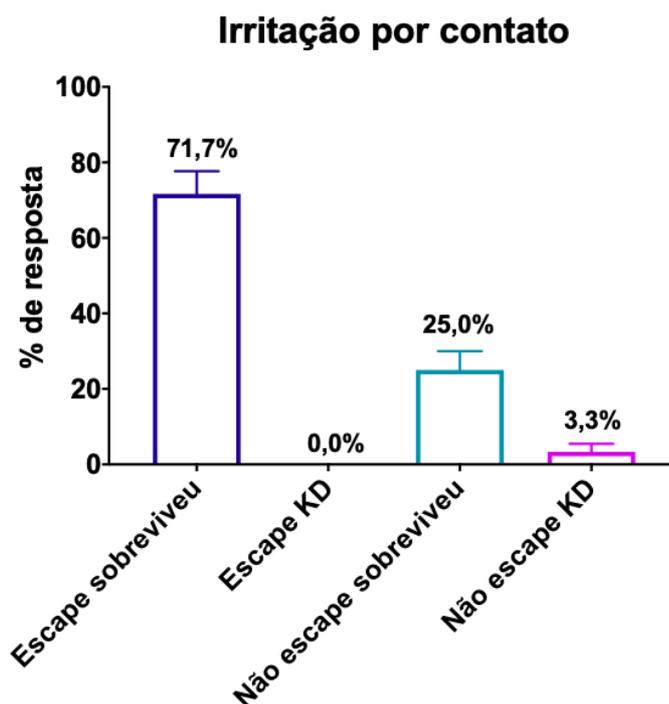


Figura 31. Resposta dos mosquitos (escape e não escape, associado a *knockdown* (KD) ou sobrevivência) após contato com o óleo de alho ArboS187 por irritação por contato. n=6

Estudo da antenografia em fêmeas de *Ae. aegypti* expostas ao óleo de alho e seus componentes isolados mostra que os compostos com repelência mais ativos foram DAS2, DAS3 e DAS4. Por outro lado, o curto tempo de ação e seu forte odor, faz com que sejam compostos com pouco potencial para desenvolvimento de repelentes corporais. Os autores sugerem então a síntese de compostos inspirados nos compostos do alho, mas que possuam maior atividade por tempo prolongado e odor mais brando (CAMPBELL et al., 2011a).

Uma outra possibilidade para o uso do alho como repelente seria através do consumo de cápsulas ou alho *in natura* para que os compostos fossem exalados pela pele. Um estudo clínico duplo cego randomizado demonstrou, porém, que a administração aguda de uma dose de cápsula de alho não afetou a frequência de picadas de *Ae. aegypti* (RAJAN et al., 2005). Os autores sugerem estudo com uso mais prolongado como possibilidade de que compostos repelentes possam ser exalados através da pele.

Além dos efeitos observados na repelência e toxicidade dos mosquitos, o DAS3 parece alterar a reprodução, e por consequência, a dinâmica populacional de alguns insetos. Em dose subletal (CL_{20}), as mariposas *Sitotroga cerealella* tratadas com essa substância tiveram diminuição da fecundidade e quantidade de ovos viáveis, assim

como alteração no tempo e frequência de acasalamento. Foi também detectada diminuição da concentração de feromônios e mudanças significativas do ciclo circadiano das fêmeas (CHANG et al., 2020). Estudos semelhantes podem ser conduzidos com *Ae. aegypti* para verificar se os efeitos são também observados nessa espécie.

Os estudos repelentes do óleo de alho para *Ae. aegypti* citados acima focam em sua atividade repelente corporal. Do ponto de vista epidemiológico, os repelentes corporais são criticados uma vez que dependem da ação individual de uso do produto (NORRIS; COATS, 2017). Por outro lado, os repelentes espaciais vem sendo reconhecidos como alternativas inovadoras aos repelentes corporais, e podem se tornar muito úteis para o manejo integrado de vetores (ACHEE et al., 2019; NORRIS; COATS, 2017). Produtos com alho tem sido comercializados como repelentes para mosquitos no uso em jardins e gramados, como o Mosquito Barrier® e Mosquito-less® comercializados nos EUA e Canadá. A presença desses produtos no mercado não é prova de que são efetivos, uma vez que são isentos de registro e portanto, não há exigência de comprovação de eficácia. A falta de evidências científicas robustas acerca do potencial repelente do alho, fazem com que autores equivocadamente o declarem um ineficiente repelente (MAIA; MOORE, 2011).

Os repelentes espaciais e os repelentes de irritação por contato são tecnologias mais aplicáveis e efetivas para o controle vetorial em escala populacional. O óleo de alho demonstrou sua atividade complementar em todas as formas de administração de um inseticida em adultos, com atividade interessante em todos os experimentos realizados. Caracteriza-se como um bom candidato para desenvolvimento de protótipos de produtos para uso em adultos em diferentes linhas: aduicida, repelente espacial e de irritação por contato. Após extensas buscas bibliográficas, este pode ser o primeiro trabalho da literatura a reportar a atividade inseticida, repelente espacial e repelente por contato do óleo de alho (DUSI et al., 2022).

Estudo toxicidade do óleo de alho ArboS187 em embriões Peixe-zebra (*Danio rerio*)

Foi observado que as diferentes concentrações do óleo de alho ArboS187 apresentaram-se homogêneas no momento de sua dissolução e permaneceram dessa forma até o término do teste. A Figura 32 mostra a visão geral do teste de embriotoxicidade. As concentrações testadas foram: DMSO 1% (controle solvente - CS); 0 (controle negativo – água do sistema de cultivo); 1; 2; 3,9; 7,7; 15,2; 30; 59,2 e 100 ppm de ArboS187 e o tempo total de exposição foi de 96 h.

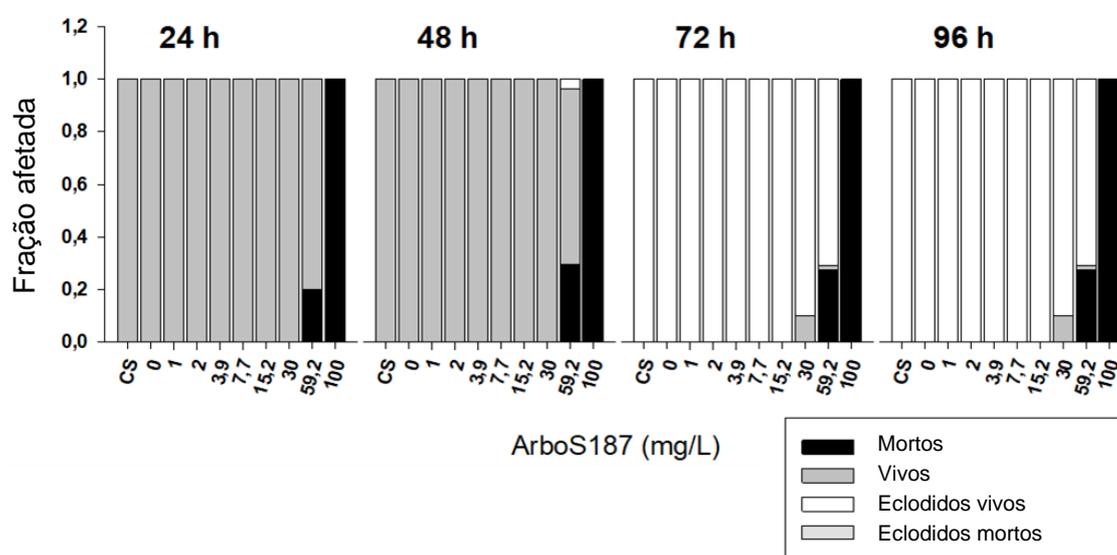


Figura 32. Gráfico “overview” do teste de embriotoxicidade do óleo de alho ArboS187. CS: controle solvente.

Após 24 h de exposição foi observado que todos os embriões de peixe-zebra expostos a concentração de 100 ppm de óleo de alho morreram, além disso, notou-se uma mortalidade de 20% dos embriões expostos a concentração de 59,2 ppm. Na mesma concentração, observou-se que 10% dos embriões vivos apresentavam efeito característico de retardo no desenvolvimento embrionário (Figura 33) e o referido precedeu a morte dos organismos no dia posterior (48 h de exposição).

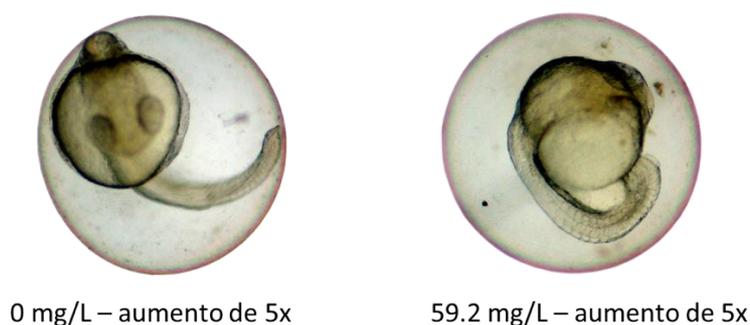


Figura 33. Fotodocumentação de embriões de peixe-zebra “normal” (0 ppm) e um embrião com atraso no desenvolvimento, exposto por 24 h à concentração de 59,2 ppm do óleo de alho ArboS187.

Às 72 h, observou-se que aproximadamente 20% dos embriões de peixe-zebra expostos a concentração de 30 ppm apresentavam edema cardíaco e 10% estavam com atraso na eclosão (Figura 34).

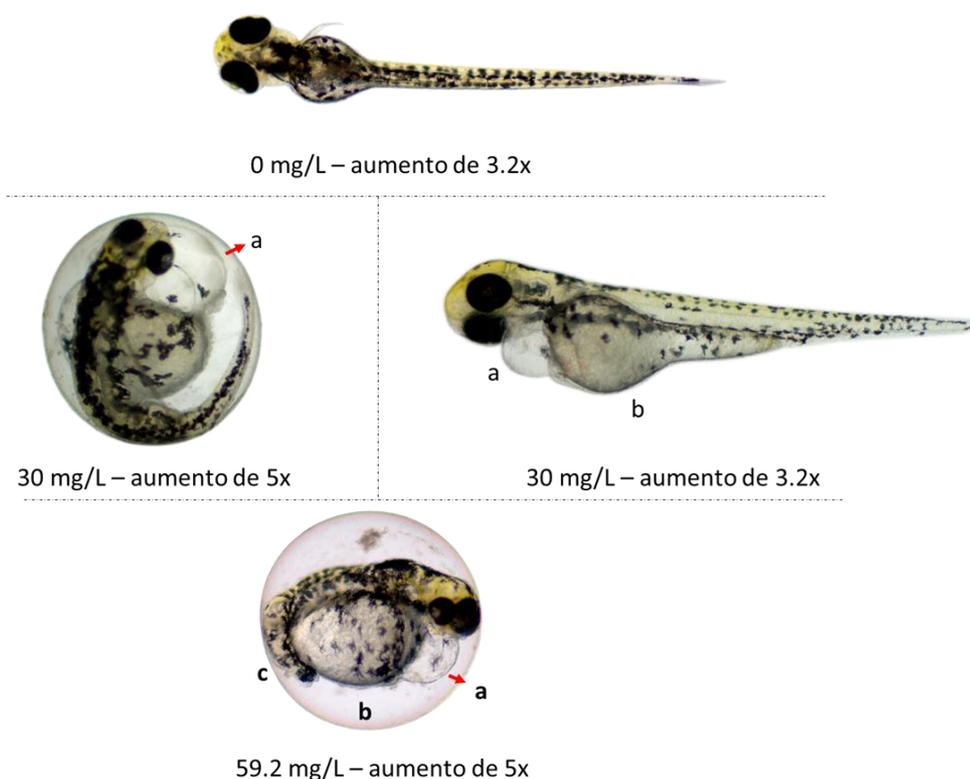


Figura 34. Fotodocumentação dos embriões de peixe-zebra expostos por 72 h às concentrações de 0 ppm (controle negativo), 30 ppm e 59,2 ppm do óleo de alho ArboS187. a: edema; b: alteração na absorção do saco vitelínico; c: malformação da cauda.

No mesmo período, notou-se que 21% dos embriões expostos a concentração de 59,2 ppm apresentaram malformação da cauda e alteração no saco vitelínico (Figura 35).

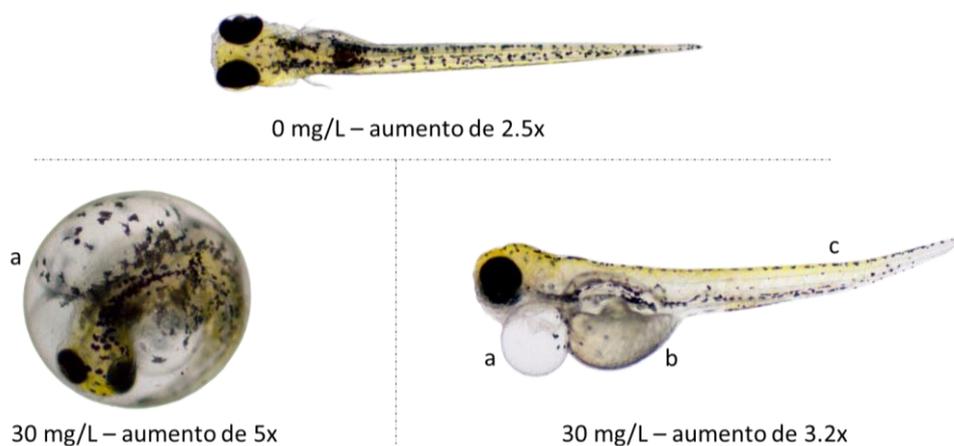


Figura 35. Fotodocumentação dos embriões de peixe-zebra expostos por 96 h às concentrações de 0 ppm (controle negativo) e 30 ppm do óleo de alho ArboS187. a: edema; b: alteração no saco vitelínico; c: curvatura anormal na cauda.

Ao final do bioensaio foi possível determinar uma CL_{50} 96 h para o óleo de alho ArboS187. A CL_{50} 96 hpf (h pós-fertilização) = 60.7 ppm, Modelo: Sigmoide 4 parâmetros, R^2 : 0,99, $P < 0,001$ (Figura 36).

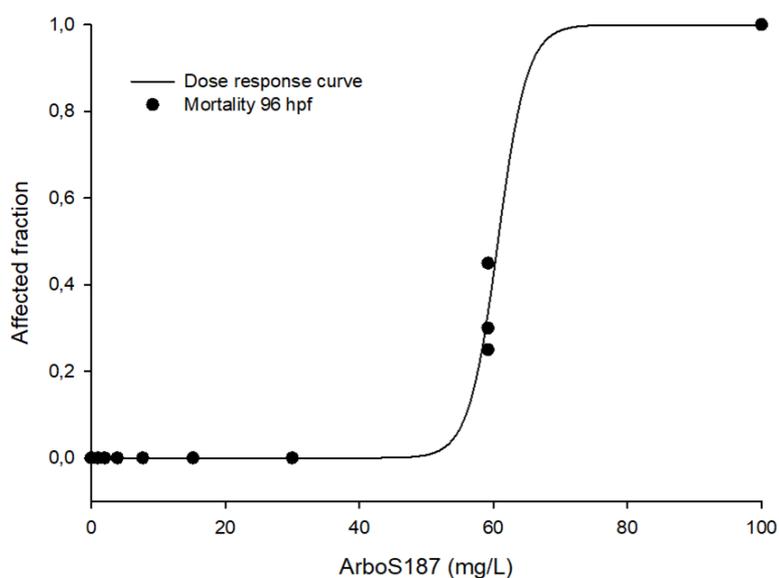


Figura 36. Curva de dose resposta (parâmetro: mortalidade) para o óleo de alho ArboS187. A CL_{50} 96 hpf (h pós-fertilização) = 60,7 ppm, Modelo: Sigmoide 4 parâmetros, R^2 : 0,99, $p < 0,001$.

O peixe-zebra é um bom modelo de ecotoxicidade, principalmente se tratando de compostos que tem perspectiva de uso em ambientes aquáticos. A CL_{50} estimada para larvas e pupas de *Ae. aegypti* foram próximas a 1,0 ppm e 20,0 ppm, respectivamente. A toxicidade em larvas de *Ae. aegypti* é cerca de 60 vezes maior que a observada para peixe-zebra. Para pupas, é no mínimo 3 vezes maior. A persistência do óleo de alho no ambiente é muito baixa. Foi demonstrado que mais de 60% de DAS2 é perdido nas primeiras 4 h após aplicação, sendo que somente 16% permanece após 24 h (RAMAKRISHNAN; CHINTALWAR; BANERJI, 1989). É importante ressaltar que os inseticidas aplicados em criadouros de *Ae. aegypti*, não chegam aos mananciais de água na mesma concentração em que foram usados no controle vetorial.

O suco de alho fresco preparado a partir da prensagem do alho cru foi testado em diferentes concentrações em embriões de peixe-zebra. Os autores verificaram toxicidade dose-dependente, com CL_{50} de 0,03%, em torno de 300 ppm, bem superior à encontrada no presente estudo com óleo de alho. Em concentrações inferiores a 0,01% (cerca de 100 ppm) não foram observadas malformações, que se expressaram como distorção da notocorda e alterações na inflação da bexiga natatória a partir da concentração de 0,02%. As malformações foram mais severas com o aumento da concentração, chegando a 100% de mortalidade em 12 h para a concentração de 0,08% (MAJEWSKI; KASICA, 2017). Já o extrato envelhecido de alho, produzido pela maceração de alho em solução hidroalcoólica por 15 meses, não exibiu toxicidade em embriões de peixe-zebra. A análise dos dois diferentes extratos de alho em HPLC mostrou que a alicina é o componente principal do extrato de alho fresco e não é detectável no extrato envelhecido. Por outro lado, no extrato envelhecido, o componente majoritário é S-alil-cisteína (MAJEWSKI et al., 2017).

Um produto comercial a base de alho cujo principal componente é DAS2 foi testado em diferentes espécies de abelhas. O produto foi tóxico tanto para larvas quanto para adultos de *Apis mellifera*, uma abelha que foi introduzida no Brasil (XAVIER et al., 2015). O produto porém, não foi tóxico para duas espécies de abelhas nativas, a abelha "jataí" *Tetragonisca angustula* e a abelha "iraí" *Nannotrigona testaceicornis* (XAVIER et al., 2010). O trissulfeto de dialila não demonstrou toxicidade em algas benignas nas concentrações testadas, que variou de 1 a 10 ppm. Por outro lado, a CL_{50} de 24 h variou de 1,4 a 10,8 ppm para diferentes espécies de zooplâncton e juvenis de peixes e crustáceos (ZHOU; CHEN; ZHENG, 2010).

Formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot

Diante do grande potencial descrito do óleo de alho como inseticida, atuando em todas as formas de vida do mosquito, foram iniciados estudos para desenvolvimento de formulações. O óleo de alho ArboS187 é imiscível em água e possui alta volatilidade, fazendo com que essas sejam as principais características a serem superadas. As formulações, do tipo nanoemulsões, foram desenvolvidas utilizando óleo de alho e Carbon dots (CDots). Os CDots são hidrossolúveis e, através de interações intermoleculares, são capazes de solubilizar componentes oleosos em água, sem necessidade de uso de surfactantes (Figura 37). Nesse trabalho, foi possível observar os CDots no interior de larvas em lupa de fluorescência (Figura 38).

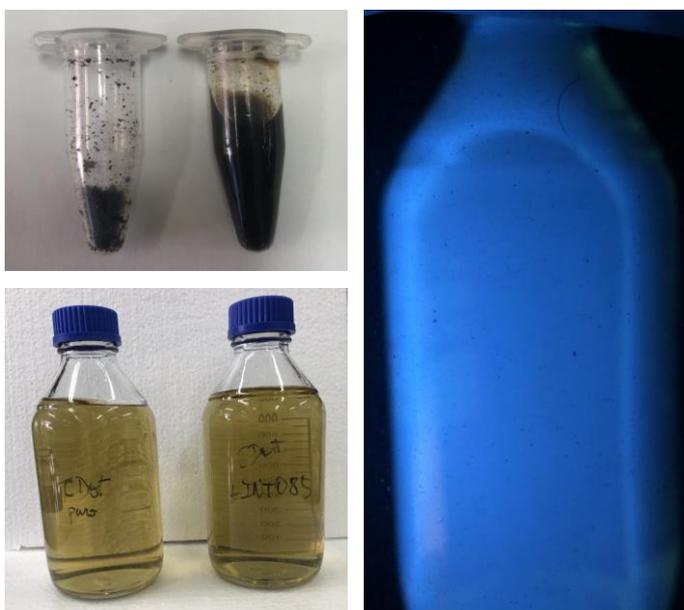


Figura 37. Carbon dot (CDot) em pó, em solução aquosa e em solução aquosa sob luz UV.

Nas imagens da Figura 38, é possível observar uma grande concentração de CDot por todo tubo digestivo das larvas, evidenciando que as larvas estão filtrando o CDot presente na solução. Estudos adicionais de microscopia tornarão possível a detecção, com precisão, dos locais onde o CDot se acumula e desenvolvimento de formulações que favoreçam a atividade dos princípios ativos.

Em teste com copos de 200 mL com 25 pupas, as soluções de alho ArboS187 em CDot foram aparentemente mais ativas que as soluções de alho ArboS187 diluídas em DMSO (Figura 39 e 40). A CL_{50} em pupas, em 72 h, para solução com CDot foi de

10,4 ppm e de 20,3 ppm para a solução em DMSO, sem CDot (Figura 40). Os dois tratamentos possuem eficácia similar (efeito máximo na mesma concentração), apesar do tratamento com CDot ser mais potente, visto que é necessária uma menor concentração para atingir metade do efeito máximo (CL_{50}). A análise de variância ANOVA seguido de Tukey mostrou que a mortalidade nas concentrações de 15 ppm e 25 ppm foram significativamente diferentes. É possível que o incremento da atividade pela adição do CDot seja pelo aumento de solubilidade do óleo de alho em água. O controle em que foi testado apenas CDot diluído em água não matou nenhuma pupa.

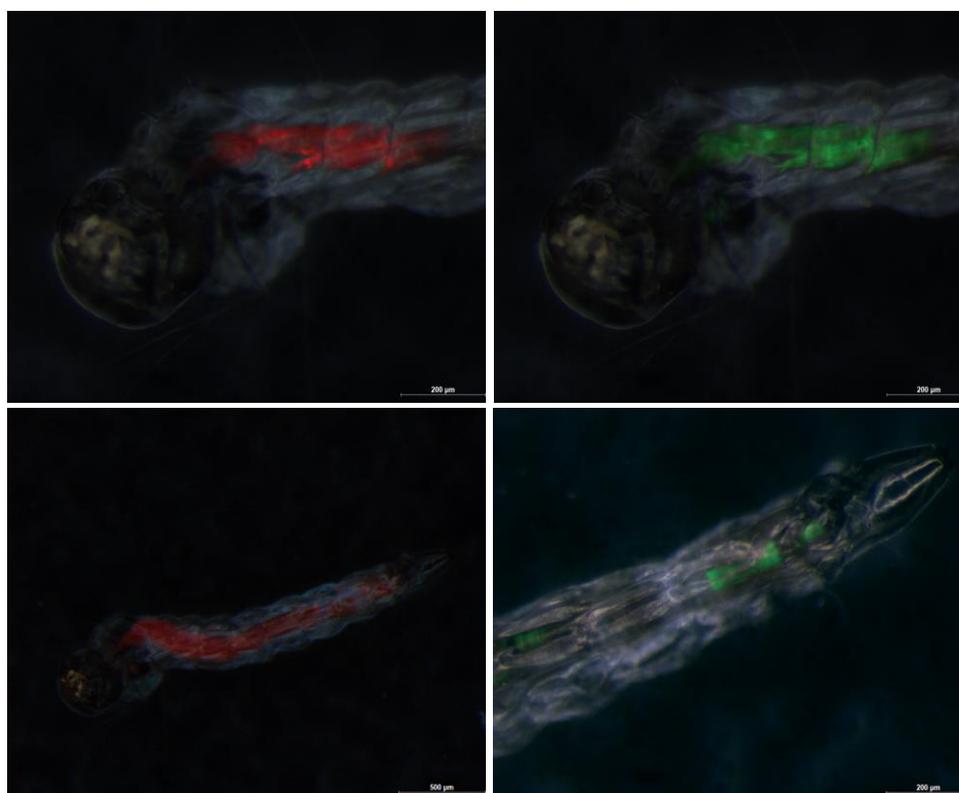


Figura 38. Fotomicrografia de fluorescência de larvas de *Ae. aegypti* tratadas com Cdote. Na esquerda uso do filtro REDx e na direita filtro GFP. As imagens foram sobrepostas usando o software ImageJ.

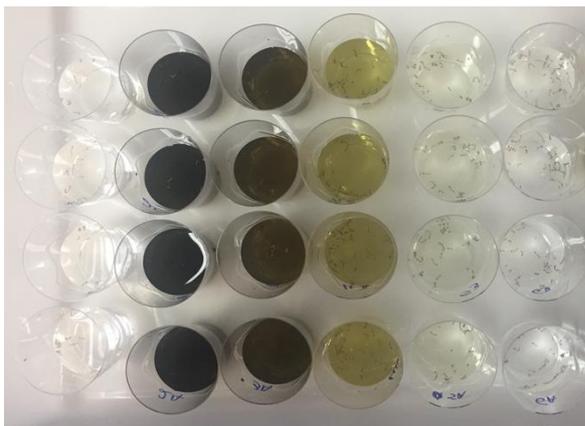


Figura 39. Copos do teste pupicida em diluição seriada com soluções de óleo de alho ArboS187 e CDot (da segunda ate última fileira de copos) e DMSO (copos na extrema esquerda).

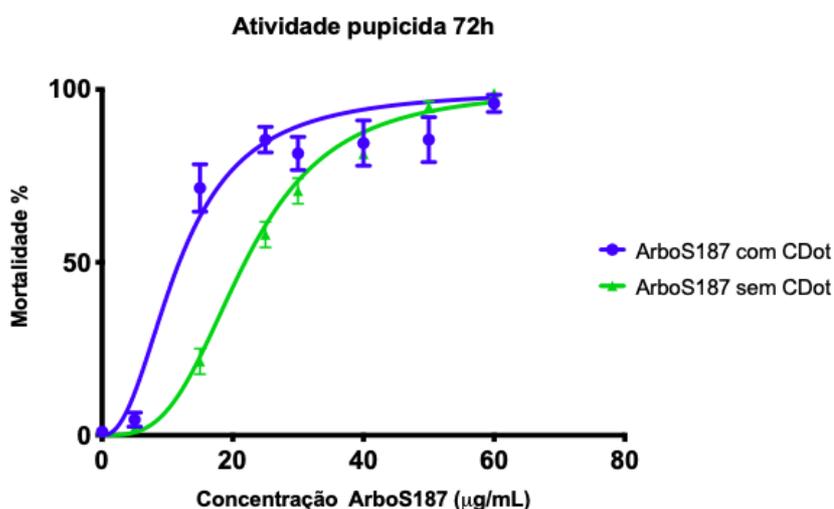


Figura 40. Comparação da curva dose resposta em pupas de *Ae. aegypti* de ArboS187 com e sem CDot.

Os experimentos iniciais de detecção dos CDots no interior das larvas demonstraram que o material possui bom perfil de disponibilidade e absorção. O aumento de efeito tóxico do óleo de alho na presença de CDot em pupas sugere que a nanopartícula é capaz de melhorar o *drug delivery*, possivelmente por melhorar a solubilidade e biodisponibilidade do óleo. Após esses resultados, foram desenvolvidas nanoemulsões utilizando o óleo de alho ArboS187 e CDot em pó ou líquido.

Nanoemulsões de óleo ArboS187 com CDot em pó

Emulsões são sistemas coloidais de dois líquidos imiscíveis, em que uma fase está dispersa na outra por meio do uso de agentes emulsificantes. As nanoemulsões são emulsões que possuem tamanho médio de gotícula inferior à 500 nm (ADIL;

ONAIZI, 2022). Inicialmente foram realizados experimentos para observação das condições experimentais que afetassem substancialmente a formação das formulações. Nesses experimentos foram observados a ordem de adição dos materiais de partida, tempo de agitação e o solvente reacional. Para as primeiras reações a temperatura reacional foi 30 °C sob agitação com barra magnética constante em sistema aberto. Foram adicionados 0,9 g de CDot em pó e 0,6 g de óleo de alho ArboS187.

Na primeira formulação, o óleo foi adicionado ao CDot com agitação dessa mistura por 5 min. Em seguida, foi adicionado 100 mL de água e 5 mL de etanol, sendo o sistema agitado por mais 12 min. Foi observada uma extensa camada de óleo na superfície do líquido final (Figura 41). Na segunda reação o CDot foi adicionado lentamente ao óleo, levando à formação de uma mistura mais homogênea. Seguindo, 10 mL de água foram adicionados sob agitação, seguido da adição de 10 mL de etanol sob agitação. Para finalizar foram adicionados 90 mL de água e o sistema ficou sob 10 min de agitação. A troca da ordem de adição levou à formação de um sistema com menos óleo na superfície (Figura 41). Para o teste seguinte, o etanol foi adicionado antes da água. Após adição do etanol observou-se a formação de um precipitado no fundo do recipiente. Prosseguiu-se com adição de 80 mL de água e agitação por 10 min. Ao final foi observada uma camada de óleo na superfície e precipitado de CDot. Na quarta reação, prosseguiu-se com método da segunda reação, mas etanol e água foram adicionados inicialmente em mistura (1:1). Para esta reação foi observada pequena quantidade de óleo na superfície.



Figura 41. Teste de formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot em pó. Esquerda: 1ª reação. Direita: 2ª reação.

Após o período de 24 h de repouso, foi observada deposição de CDot em todas as quatro reações bem como um aumento na camada de óleo sob a superfície do sistema. De forma geral, foi possível observar nos testes iniciais que a ordem de adição dos reagentes interfere na reação e que a homogeneização é melhor quando o CDot é adicionado ao óleo de forma lenta e sob agitação constante. A variação da forma de adição e da quantidade do solvente reacional permitiu inferir que o etanol promove a precipitação de partículas de CDot. Por outro lado, quanto menos etanol mais espessa a camada de óleo da superfície do sistema.

Em seguida, foram realizados experimentos com alteração da temperatura reacional, e uma vez que o óleo de alho é volátil, foi realizado em sistema fechado. Para tal, os sistemas foram montados em refluxo a 30 °C, 40 °C e 50 °C sob agitação constante por 2 h. Os produtos se mostraram mais fluidos e homogêneos do que nos experimentos anteriores. Após resfriamento e repouso, porém, foi observado óleo na superfície de todos os sistemas. Foi observado que a agitação branda por meio de barra magnética não era capaz de movimentar todo o sistema e não tinha energia suficiente para emulsionar o óleo. Diante desses resultados, foi possível concluir que a ordem de adição, o solvente reacional e a agitação são fatores determinantes, enquanto a temperatura do sistema é irrelevante.

Para os experimentos seguintes, as formulações foram preparadas com dispersor Ultra Turrax IKA T25 digital, com elemento de dispersão em aço inoxidável e com ajuste de velocidade de 3.000 a 20.000 rpm. Apesar do CDot ter se mostrado efetivo para a dispersão do óleo de alho, percebeu-se a necessidade de adoção de um agente emulsificante para incorporação de uma grande quantidade de óleo em formulações. Um conjunto de 13 novas formulações foram montadas com variação da quantidade de óleo e sistema tensoativo (CDot, tensoativo ou mistura de CDot e tensoativo), assim como da quantidade e tipo de solvente (Tabela 11). Essas formulações foram produzidas a 30 °C com agitação a 10.000 rpm, por 30 min., com todos os materiais de partida adicionados ao mesmo tempo.

Nas formulações 1 e 2 houve precipitação de CDot, sendo maior precipitação na formulação 1. Na formulação 2 não houve separação de fases, enquanto na formulação 1 houve formação de uma película de óleo. Assim, a formulação 3 foi montada de maneira similar à 2, mas sem a adição de etanol. A formulação 3 foi a primeira reação em que não houve precipitação de CDot e nem separação de fases. O mesmo ocorreu para a formulação 4, mas em virtude da presença de etanol a

quantidade de tensoativo teve de ser quadruplicada. Portanto, a formulação 3 foi tida como modelo para que os parâmetros pudessem ser otimizados.

A formulação 5 foi montada com sistema tensoativo sem CDot para que pudesse ser observado o efeito desse componente nas formulações. Ao final, foi obtido líquido branco leitoso, característico de uma emulsão. Na formulação 6 foi observado o efeito do aumento da concentração final de óleo de alho, que resultou em formulação estável e homogênea sem a presença de precipitado ou sobrenadante. Para as formulações 7 e 8, houve modificação da velocidade de agitação, sendo adotada a velocidade de reação de 3.000 rpm e 5.000 rpm. A redução da velocidade de agitação levou ao surgimento de óleo sobrenadante, sugerindo a necessidade de agitação vigorosa para uma emulsão homogênea e estável. Nas formulações 10 a 13 foram modificadas as proporções entre os reagentes, que não resultaram em vantagens para o sistema.

As formulações foram submetidas à análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Esta técnica determina o tamanho de partícula, o índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta do sistema, parâmetros físico-químicos cruciais na determinação da estabilidade do sistema. A análise mede o tamanho das gotículas dispersas no meio líquido, o que corresponde a tamanho das gotas mais a camada de solvente em sua superfície. Os valores resultantes da avaliação por DLS junto à inspeção visual guiaram o prosseguimento dos experimentos.

Tabela 11. Parâmetros para preparação das formulações 1 a 13 ArboS187 e CDot em agitador Ultra Turrax a 10.000 rpm. Sistema tensoativo: CDot e polissorbato.

| Formulação | Solvente | | Óleo de Alho (mL) | Sistema tensoativo (mL) |
|----------------|-------------------------|----------|-------------------|-------------------------|
| | Tipo | Vol (mL) | | |
| 1 | Etanol/H ₂ O | 10 | 0,6 | 0,9 |
| 2 | Etanol/H ₂ O | 9 | 0,6 | 1,9 |
| 3 | H ₂ O | 9 | 0,6 | 1,9 |
| 4 | Etanol/H ₂ O | 6 | 0,6 | 4,9 |
| 5 | H ₂ O | 9 | 0,6 | 1 |
| 6 | H ₂ O | 9 | 0,9 | 1,8 |
| 7 ¹ | H ₂ O | 9 | 0,6 | 1,9 |
| 8 ² | H ₂ O | 9 | 0,6 | 1,9 |
| 9 | H ₂ O | 8,2 | 1,8 | 1,5 |
| 10 | H ₂ O | 9 | 0,9 | 2,7 |
| 11 | H ₂ O | 9 | 1,8 | 1,8 |
| 12 | H ₂ O | 9 | 0,9 | 2,25 |
| 13 | H ₂ O | 20 | 1,8 | 2,7 |

¹: velocidade de agitação de 3.000 rpm; ²: velocidade de agitação de 5.000 rpm;

Dessa maneira, ao final desses experimentos foram estabelecidos alguns parâmetros para a produção das formulações: temperatura de 30 °C, proporções equivalentes entre os materiais de partida com 9 mL de água, adição de todos os componentes logo no início da reação e agitação a 10.000 rpm por 30 min. Após a definição desses parâmetros, foram planejadas novas reações para otimização da quantidade do sistema tensoativo, quantidade de solvente no sistema e ordem de adição dos reagentes. Na nova etapa foram produzidas 35 novas formulações seguindo os parâmetros da Tabela 12.

Dentre os parâmetros observados, a escolha do sistema tensoativo foi crucial. Nas formulações 33, 34, 37 e 38 foi utilizado um sistema tensoativo diferente (CDot com lauril sulfato sódico) que não levou à formação de uma emulsão estável. A inclusão de NaCl como um co-estabilizante não resultou em melhora das características da formulação.

A avaliação das formulações resultou na percepção de que o tempo de reação é importante, visto que tempos de reação inferiores levam à formação de sistemas com óleo da superfície. O aumento do tempo reacional forma formulações mais estáveis. O tempo padrão escolhido para as reações com CDot em pó foi de 30 min.

Tabela 12. Parâmetros para a produção das formulações de CDot e óleo de alho ArboS187 14 a 50. Sistema tensoativo: CDot e polissorbatato.

| Form. | Óleo de alho (mL) | Água (mL) | Sist. Tens. (mL) | Rotação (rpm) | Tempo (min) | % final óleo | Ordem de adição |
|-------|-------------------|-----------|------------------|---------------|-------------|--------------|---|
| 14 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Todos juntos |
| 15 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + CDot + polissorbatato -> 10 min -> Solvente -> 20 min |
| 16 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 10 | 7,6 | Todos juntos |
| 17 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + CDot + polissorbatato -> 20 min -> Solvente -> 10 min |
| 18 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + polissorbatato + Solvente -> 10 min -> CDot -> 20 min |
| 19 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Solvente + CDot + polissorbatato -> 10 min -> Óleo -> 20 min |
| 20 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | CDot + polissorbatato -> 10 min -> Solvente + Óleo -> 20 min |
| 21 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Solvente + CDot -> 10 min -> Óleo + polissorbatato -> 20 min |
| 22 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + polissorbatato -> 10 min -> Solvente + CDot -> 20 min |
| 23 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + Solvente -> 10 min -> CDot + polissorbatato -> 20 min |
| 24 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | CDot + polissorbatato -> 5 min -> Óleo -> 5 min -> Solvente -> 20 min |
| 25 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + CDot -> 5 min -> polissorbatato -> 5 min -> Solvente -> 20 min |
| 26 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | polissorbatato + Óleo -> 5 min -> CDot -> 5 min -> Solvente -> 20 min |
| 27 | 0,9 | 10 | 0,9 | 10000 | 20 | 8,3 | Todos juntos |

| Form. | Óleo de alho (mL) | Água (mL) | Sist. Tens. (mL) | Rotação (rpm) | Tempo (min) | % final óleo | Ordem de adição |
|-------|-------------------|-----------|------------------|---------------|-------------|--------------|---|
| 28 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + CDot -> 5 min -> Solvente -> 5 min -> polissorbató -> 20 min |
| 29 | 0,9 | 10 | 1,6 | 10000 | 30 | 7,8 | Todos juntos |
| 30 | 0,9 | 10 | 1,4 | 10000 | 30 | 7,9 | Todos juntos |
| 31 | 0,9 | 10 | 1,2 | 10000 | 30 | 8,0 | Todos juntos |
| 32 | 0,9 | 10 | 1 | 10000 | 30 | 8,2 | Todos juntos |
| 33 | 0,9 | 10 | 1,8 tens 2 | 10000 | 30 | 7,6 | Todos juntos |
| 34 | 0,9 | 10 | 1,6 tens 2 | 10000 | 30 | 7,6 | Todos juntos |
| 35 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + CDot + Solvente -> 10 min -> polissorbató -> 20 min |
| 36 | 1,8 | 20 | 3,6 | 10000 | 30 | 7,6 | Óleo + CDot -> 10 min -> polissorbató + Solvente -> 20 min |
| 37 | 0,9 | 10 | 1,8 tens 2 | 10000 | 60 | 7,6 | Todos juntos |
| 38 | 0,9 | 10 | 1,8 tens 2 | 10000 | 40 | 7,6 | Todos juntos |
| 39 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 40 | 7,6 | Solvente + CDot -> 20 min -> Óleo + polissorbató -> 20 min |
| 40 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Solvente + CDot -> 20 min -> Óleo + polissorbató -> 10 min |
| 41 | 0,9 | 10 | 1,8 tens 2 | 10000 | 30 | 7,6 | CDot + solvente -> 15 min -> polissorbató + óleo -> 15 min |
| 42 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 60 | 7,6 | CDot + solvente -> 20 min -> polissorbató + óleo -> 40 min |
| 45 | 0,9 | 10 | 1,8 | 3000 | 30 | 7,6 | Todos juntos |
| 46 | 0,9 | 10 | 1,8 | 5000 | 30 | 7,6 | Todos juntos |
| 47 | 0,9 | 10 | 1,8 | 15000 | 30 | 7,6 | Todos juntos |
| 48 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 60 | 7,6 | Todos juntos |
| 49 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 90 | 7,6 | Todos juntos |
| 50 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Todos juntos + NaCl 100 mM |
| 53 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10000 | 30 | 7,6 | Todos juntos + NaCl 25 mM |

Form: Formulação; Sist Tens : sistema tensoativo

Dentre todos os parâmetros investigados um dos mais cruciais refere-se à velocidade de agitação do sistema. De forma geral, rotações menores (3000 e 5000 rpm) produzem formulações com óleo sobrenadante. Por outro lado, a elevação da velocidade de agitação acima de 10.000 rpm não parece ter efeito benéfico e resultaria em maior gasto energético e de desgaste do equipamento. Após o estudo das 50 formulações, foi definido que para formulações com CDot em pó a velocidade de agitação ideal é 10.000 rpm.

Formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot líquido 1

Os parâmetros otimizados para o CDot em pó foram aplicados para os sistemas com o CDot líquido 1. Nesta etapa, foram produzidas 6 formulações podendo ser visualizados na Tabela 13. Como o CDot líquido 1 é uma suspensão com concentração específica foi necessário ajuste na quantidade de CDot. Em 2,25 mL de CDot líquido 1, há aproximadamente 0,9 g de CDot. Como o CDot usado é uma

suspensão aquosa, fez-se necessário algumas avaliações acerca da ordem de adição dos reagentes.

Tabela 13. Parâmetros para preparação das formulações de ArboS187 e CDot líquido 1. Sistema tensoativo: CDot e polissorbato.

| Formulação | Óleo de alho (mL) | Água (mL) | Sist Tens (mL) | Tempo (min) |
|------------|-------------------|-----------|----------------|-------------|
| 43 | 0,9 | 7,75 | 3,15 | 30 |
| 44 | 0,9 | 4 | 3,15 | 30 |
| 51 | 0,9 | 2,5 | 3,15 | 60 |
| 52 | 0,9 | 2,5 | 3,15 | 60 |
| 55 | 0,9 | 7,75 | 3,15 | 60 |
| 56 | 0,9 | 2,5 | 3,15 | 30 |

Sist Tens : sistema tensoativo.

Como anteriormente, observou-se que a necessidade de adição de quantidade superior de sistema tensoativo em relação à quantidade de óleo de alho. As formulações 51, 52 e 55 não apresentaram formação de sobrenadante, e nas 52 e 55 não houve formação de precipitado. As reações 43, 44 e 56 apresentaram óleo na superfície, sugerindo a necessidade de aumento do tempo reacional. O tempo de agitação necessário para sistemas com CDot líquido 1 é de 60 min, quando não é mais observada separação de fases. O CDot líquido 1 se mostrou superior ao CDot em pó, já que foi possível aumentar a proporção de óleo na formulação. As formulações obtidas neste processo apresentam coloração preta, assim como as formulações com CDot em pó.

Formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot líquido 2

A partir da disponibilidade de uma nova apresentação de CDot líquido, novos experimentos foram realizados, utilizando os parâmetros otimizados dos sistemas anteriores. O CDot líquido 2 é mais viscoso e homogêneo, mais concentrado quando comparado ao CDot líquido 1. Foi realizado então o cálculo para manutenção da concentração de 0,9 g de soluto. Contudo, uma simples extensão da metodologia não formou sistemas estáveis. Assim como o desenvolvimento das formulações anteriores, a avaliação preliminar da estabilidade do sistema se deu por análise visual, no qual se observou a existência de óleo como sobrenadante ou a precipitação de CDot. Como o sistema anterior era uma solução escura, a formação de sobrenadante

era de fácil visualização, fato que não se estende para este novo sistema que apresenta uma cor mais clara.

Desta forma, a proporção entre os materiais de partidas, sua ordem de adição, a homogeneização do sistema, a quantidade do solvente e as condições experimentais como: temperatura, tempo e velocidade de agitação tiveram que ser estudados para a obtenção de sistema estável. De forma sucinta, os dados dessa variação estão presentes nas Tabela 14.

A principal característica que diferencia as formulações obtidas a partir de CDot líquido **2** das outras é a coloração azulada. Apesar do início da reação possuir coloração semelhante aos sistemas anteriores, uma tonalidade marrom, o sistema passa por um tom acinzentado até formar a sua coloração azul característica (Figura 42). Tal fato permitiu inferir que os tipos de CDot interagem diferentemente no sistema com o óleo de alho. Semelhante às outras formulações, foi observado ser necessária quantidades maiores do sistema tensoativo do que óleo de alho. O óleo precipita quando a quantidade do sistema tensoativo adicionada é proporcionalmente menor que o óleo de alho (Figura 43). Como também observado anteriormente, velocidades de agitação mais brandas levam à formação de sistemas instáveis.

Tabela 14. Parâmetros para preparo das formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot líquido **2**. Sistema tensoativo: CDot e polissorbato.

| Formulação | Óleo de alho (mL) | Água (mL) | Sistema tensoativo (mL) | Rotação (rpm) | Tempo (min) |
|------------|-------------------|-----------|-------------------------|---------------|-------------|
| 57 | 1 | 4 | 2,05 | 10000 | 60 |
| 58 | 1,2 | 4 | 1,8 | 10000 | 60 |
| 59 | 1,2 | 4 | 1,9 | 10000 | 60 |
| 60 | 1,1 | 4 | 1,97 | 10000 | 60 |
| 61 | 1,1 | 4 | 1,97 | 10000 | 45 |
| 62 | 1,2 | 5 | 1,0 | 10000 | 60 |
| 63 | 1,1 | 4 | 1,97 | 10000 | 20 |
| 64 | 1,1 | 4 | 1,97 | 10000 | 60 |
| 65 | 1,1 | 4 | 2,0 | 3000 | 60 |
| 66 | 1,1 | 4 | 2,0 | 5000 | 60 |
| 67 | 0,9 | 4 | 3,0 | 10000 | 60 |
| 68 | 0,9 | 4 | 2,0 | 10000 | 60 |
| 69 | 0,9 | 4 | 2,5 | 10000 | 60 |
| 70 | 0,9 | 4 | 2,7 | 10000 | 60 |
| 71 | 0,9 | 7,75 | 3,15 | 10000 | 60 |
| 72 | 8 | 32 | 16,44 | 10000 | 60 |
| 73 | 8 | 36 | 12,4 | 10000 | 60 |
| 74 | 8 | 32 | 16,4 | 10000 | 120 |
| 77 | 10 | 32 | 14,5 | 10000 | 60 |
| 78 | 7,2 | 35 | 10,2 | 10000 | 60 |
| 79 | 7,2 | 32 | 13,2 | 10000 | 60 |
| 80 | 7,2 | 32 | 13,2 | 10000 | 60 |
| 81 | 5 | 0 | 10,0 | 10000 | 90 |

| Formulação | Óleo de alho (mL) | Água (mL) | Sistema tensoativo (mL) | Rotação (rpm) | Tempo (min) |
|------------|-------------------|-----------|-------------------------|---------------|-------------|
| 82 | 4 | 16,5 | 8,0 | 10000 | 180 |
| 83 | 4,03 | 33 | 8,06 | 10000 | 90 |
| 84 | 4,03 | 33 | 8,06 | 10000 | 60 |
| 85 | 4 | 33 | 8 | 10000 | 90 |

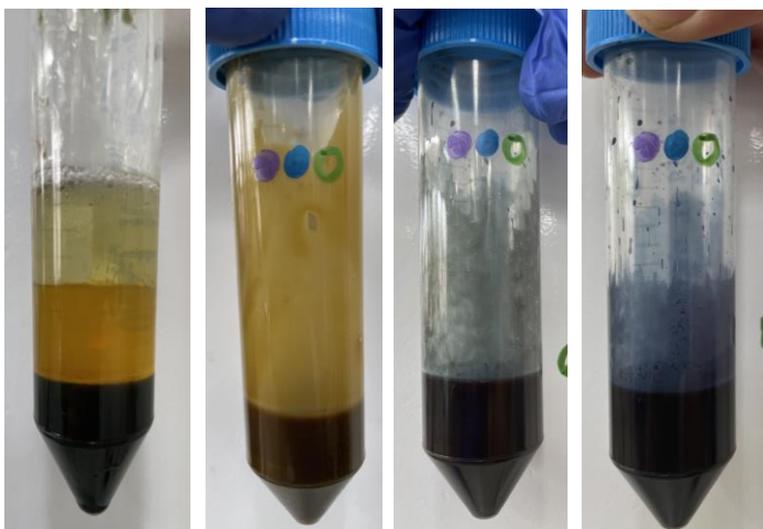


Figura 42. Frasco contendo emulsão de CDot líquido **2** com mudança de coloração ao longo do tempo de reação.

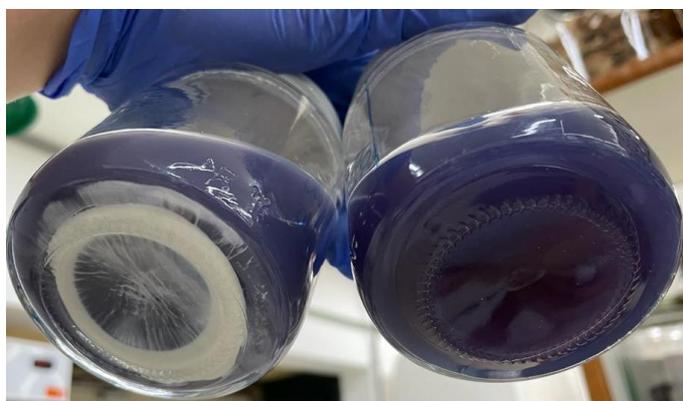


Figura 43. Formulações após diluição em água e repouso. Esquerda: formulação com precipitação. Direita: formulação estável sem precipitação.

A formulação final selecionada contém 71,5% de água e o restante é composto pelo óleo de alho ArboS187 e sistema tensoativo com CDot líquido **2**. Ficou estabelecido tempo total de 90 min com agitação a 10.000 rpm à temperatura de 30 °C.

Testes de escalonamento em bancada de alho ArboS187 com CDot líquido

Dois testes de escalonamento em bancada foram realizados, com as formulações de óleo de alho ArboS187 com CDot líquido **1** e **2**. O escalonamento permite compreender o comportamento da reação quando aumentado o volume dos materiais de partida, bem como do solvente reacional. Este teste é de suma importância, pois permite avaliar se a metodologia desenvolvida pode ser aplicada para produção em larga escala e os principais ajustes necessários dos parâmetros reacionais. Foram preparadas 200 mL de cada formulação, aproximadamente 15 vezes o volume de trabalho inicial. Para a formulação com CDot líquido **1** foi realizado um sistema em triplicata, enquanto para a formulação com CDot líquido **2**, foram realizadas três diferentes reações com pequenas alterações na quantidade de solvente. Os dados da reação escalonada estão presentes na Tabela 15. As reações ocorreram à temperatura de 30 °C com agitação a 10.000 rpm. Foi também produzida uma reação escalonada sem CDot algum seguindo os mesmos parâmetros das formulações com CDot líquido.

Tabela 15. Parâmetros usados para o escalonamento de bancada das formulações com de alho de óleo ArboS187 e CDot líquido **1** e **2**. Sistema tensoativo: CDot e polissorbato.

| Form. | Tipo CDot | Óleo de alho (mL) | Água (mL) | Sistema Tensoativo (mL) | Tempo de agitação (min) | % final de óleo |
|-------------|-----------|-------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| 87.1 | 1 | 15,4 | 132,6 | 53,9 | 60 | 7,6 |
| 87.2 | 1 | 15,3 | 132 | 53,55 | 60 | 7,6 |
| 87.3 | 1 | 15,3 | 132 | 53,35 | 60 | 7,6 |
| 125 | 2 | 20,0 | 140 | 40,0 | 90 | 10 |
| 126 | 2 | 20,0 | 150 | 40,0 | 90 | 9,5 |
| 127 | 2 | 20,0 | 160 | 40,0 | 90 | 9,0 |

Os parâmetros que possuem importante influência na estabilidade das formulações são o tamanho de partícula, a homogeneidade do sistema e as forças de atração ou repulsão na superfície das partículas. Quanto menor o tamanho dos glóbulos, mais estável é a emulsão. Isso ocorre uma vez que a força gravitacional tem menor influência sobre partículas menores, protegendo o sistema da sedimentação ou coalescência (TADROS et al., 2004). A seleção do óleo, do sistema tensoativo e do método de obtenção da emulsão interferem diretamente no tamanho das partículas, na homogeneidade e estabilidade do sistema. A estabilização das nanoemulsões pode ocorrer através de forças de atração ou repulsão. O potencial

zeta é definido como a diferença de potencial entre os íons ligados à superfície da partícula e uma região neutra da formulação. Quando o valor desse potencial é acima de 30 mV (em módulo) as forças de repulsão são as principais em relação à estabilização do sistema. Em sistemas com tensoativos não-iônicos as forças de van der Waals podem impedir a colisão das partículas. Nesses sistemas não-iônicos o impedimento estérico resultante do tamanho do polímero tensoativo é outro fator para a estabilização da nanoemulsão (ADIL; ONAIZI, 2022; TADROS et al., 2004). As emulsões do tipo Pickering são estabilizadas pelo uso de nanopartículas sólidas e demonstram vantagens de estabilização frente aos sistemas convencionais. O aumento da quantidade de nanopartículas tende a diminuir o potencial zeta do sistema. Ainda, nanopartículas de carga neutra tendem a formar uma rede de partículas na fase contínua que estabilizam as nanoemulsões Pickering (ADIL; ONAIZI, 2022).

Todas as formulações mostraram características bastante similares aos sistemas em menor escala. Os testes de estabilidade das emulsões com CDot líquido 1 mostraram algumas flutuações dos parâmetros observados ao longo de 12 semanas (Figura 44). As formulações estocadas na geladeira e estufa sofreram as maiores flutuações de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão (Pdl). À baixa temperatura a formulação ficou com aspecto mais viscoso, potencialmente por afetar o estado do óleo na emulsão.

Durante todo o experimento o tamanho de partícula ficou abaixo de 200 nm, sendo portanto possível caracterizar as reações como nanoemulsões. O potencial zeta ficou abaixo de 30 (em módulo) em quase todos os momentos e temperaturas de estocagem. Esse baixo valor de potencial zeta era esperado uma vez que o sistema tensoativo utilizado não possui caráter iônico. O Pdl ficou abaixo de 0,3 em todo o experimento, e aliado à estabilidade do tamanho de partícula, sugerem que as formulações se mantiveram estáveis ao longo do experimento. Não houve diferença nos parâmetros para as amostras estocadas em frasco âmbar ou translúcido, sugerindo que, em 12 semanas, a luz não é fator determinante para a estabilidade do sistema (Figura 44). No geral, as formulações estocadas à temperatura ambiente tiveram menor flutuação no valor dos parâmetros observados, o que sugere que essa tende a ser a condição ideal de estocagem dessas formulações. Os testes preliminares de estabilidade das emulsões com CDot líquido 1 sugerem que as

formulações mantêm estabilidade em todas as condições de armazenamento avaliadas.

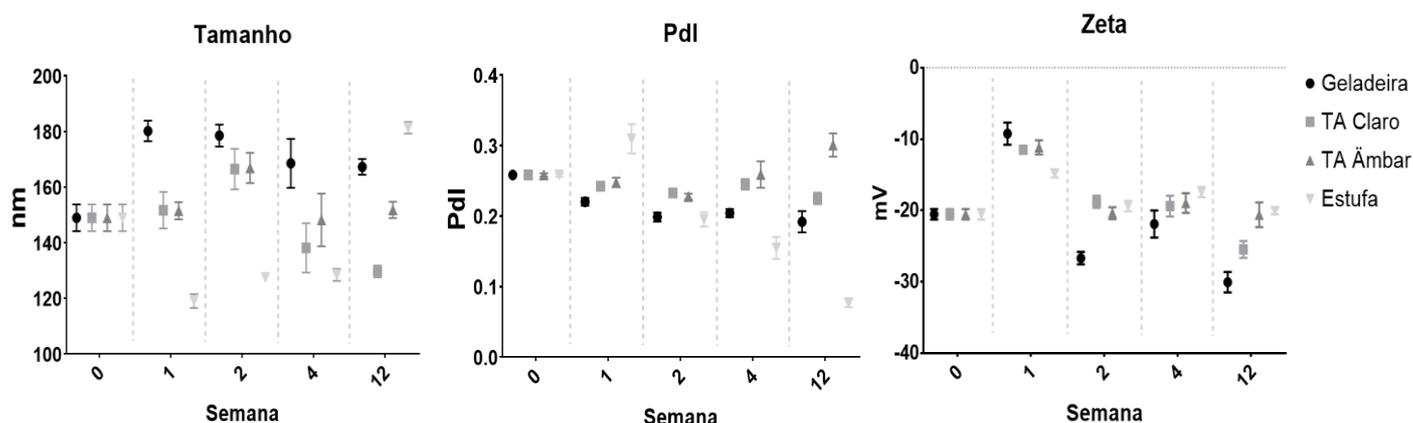


Figura 44. Características das formulações escalonadas com CDot líquido 1 após estocagem sob diferentes condições de temperatura. TA Claro: temperatura ambiente em frasco translúcido; TA Âmbar: temperatura ambiente em frasco âmbar. Tamanho em nm; potencial Zeta em mV.

Para as três formulações escalonadas com CDot líquido 2 (formulações 125, 126 e 127), foi observado um aumento no tamanho de partícula ao longo do tempo quando estocadas na estufa (Figura 45). Da mesma forma, o Pdl para as formulações estocadas em estufa demonstram instabilidade após 12 semanas de estocagem em temperatura mais elevada. Em contrapartida, as formulações estocadas a temperatura ambiente e sob refrigeração mantiveram estabilidade no tamanho de partícula e Pdl ao longo de 12 semanas. Desta forma, a estocagem em temperaturas mais amenas sugere que as formulações se mantiveram estáveis. O tamanho de partícula nessas condições se manteve abaixo de 200 nm em todas as medidas. O Pdl variou entre 0,2 e 0,3, valores aceitáveis para indicar homogeneidade do sistema e uma possível estabilidade. O potencial zeta de todas as amostras ficou abaixo de 30 (em módulo) sugerindo que as forças eletrostáticas tem pouco efeito na estabilidade das nanoemulsões preparadas (Figura 45).

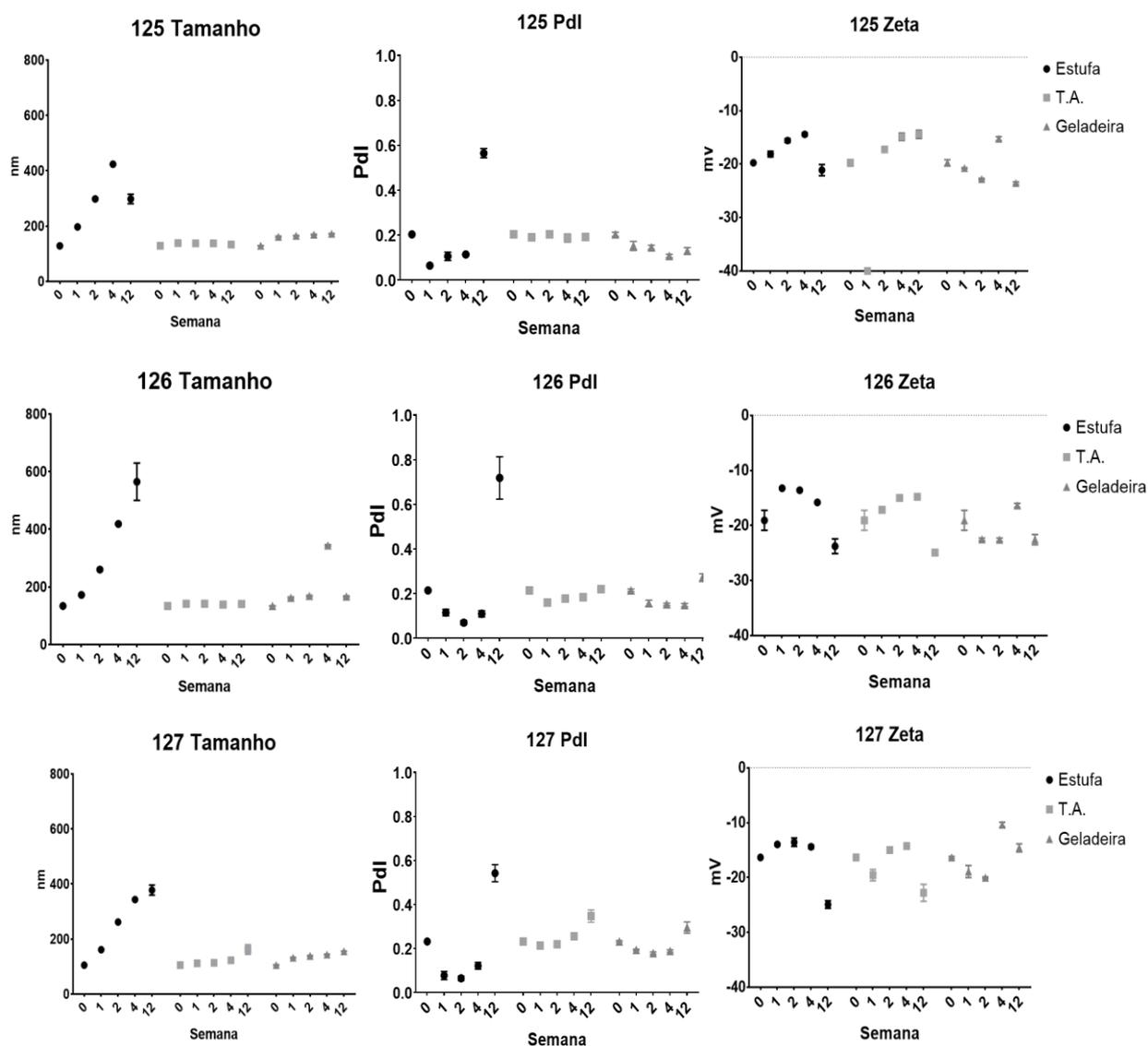


Figura 45. Características das formulações escalonadas com CDot líquido **2** após estocagem sob diferentes condições de temperatura. TA: temperatura ambiente. Tamanho em nm; potencial Zeta em mV.

As formulações 127 (CDot líquido **2**) e 129 (sem CDot) foram avaliadas em HPLC no tempo 0 e após 4 meses de estocagem nas três condições de armazenamento (temperatura ambiente, estufa e geladeira). Para essa análise, foram realizados testes com 3 diferentes filtros de amostra (Nylon, PTFE hidrofóbico e PVDF), volume (50 mL, 100 mL e 200 mL) e solvente de dissolução das amostras (metanol, acetonitrila, etanol e água). Além disso diferentes gradientes de eluição foram estudados e três colunas cromatográficas C18 utilizadas. As melhores condições de preparo de amostras foram a diluição em 200 mL de metanol e filtração em membrana de PTFE hidrofóbico. A coluna cromatográfica e o gradiente de escolha foram Phenomenex Kinetex 2,6 μ EVO C18 250 x 4,6 mm utilizando gradiente :80-

100% metanol (0-8 min), 100% (8-10 min), 100-80% (10-12 min), 80% (12-15 min) com detecção a 215 nm. Foi feita uma curva de calibração com os padrões analíticos de DAS2 e DAS3 (Sigma-Aldrich). Para DAS2 a curva contou com 8 pontos variando de 160 µg/mL a 12,5 µg/mL. Sendo DAS3 o composto majoritário, as concentrações variaram de 320 µg/mL a 25 µg/mL. As curvas foram lineares, com $R^2 > 0.999$.

A concentração inicial de DAS2 foi de aproximadamente 100 µg/mL e de DAS3 foi de 200 µg/mL nas amostras das formulações 126 e 129 diluídas 200 vezes em metanol. As formulações contêm, portanto, aproximadamente 20 mg/mL de DAS2 e 40 mg/mL de DAS3. Não houve variação da concentração estimada de DAS2 e DAS3 para as amostras estocadas por 4 meses em geladeira em comparação com a análise do início do experimento. Já o armazenamento em temperatura ambiente pelo mesmo período causou uma diminuição de cerca de 30% de DAS2 e DAS3 para a amostra 127 (com CDot líquido **2**) e de 40% para 129 (sem CDot). Possivelmente as interações entre as nanopartículas de carbono e o óleo de alho são capazes de retardar a vaporização do óleo nessas condições. Já as amostras da estufa perderam mais de 95% dos polissulfetos e tiveram uma mudança de coloração significativa. A formulação 127 se tornou castanho escura (antes era azul), cor do CDot líquido **2**. Essa mudança de coloração e ausência quase completa dos polissulfetos após o armazenamento em estufa é mais um indicativo de que a cor azulada vem de interações entre os compostos do alho e grupos funcionais das nanopartículas de carbono.

A volatilidade do óleo de alho é o possível causador da instabilidade da formulação detectada nas amostras estocadas em estufa nas avaliações de tamanho de partícula e homogeneidade da amostra (Figura 45). É importante ressaltar que as amostras foram estocadas em frascos plásticos com bico conta gotas sem batoque e rotineiramente abertas para execução dos experimentos de estabilidade e de atividade biológica. Outra formulação com CDot líquido **2** estocada por 5 semanas à temperatura ambiente em frasco de vidro com tampa rosqueável não teve alteração do teor de DAS2 e DAS3. Portanto, novos experimentos devem ser conduzidos com acondicionamento controlado dos frascos nas diferentes temperaturas para determinar as condições ótimas de armazenamento.

A Figura 46 mostra os espectros de absorção no UV/Vis das formulações com CDot em pó, CDot líquido **1** e **2**, além dos reagentes isoladamente foram solubilizados em água. É possível observar o surgimento de novas bandas de interação em

aproximadamente 430 nm para a formulação 14 (feita com CDot em pó – nanoformulação 1) e em 600 nm para a formulação 126 (feita com CDot líquido 2 – nanoformulação 3) (Figura 46). As novas bandas indicam que novas interações entre os componentes da formulação foram formadas.

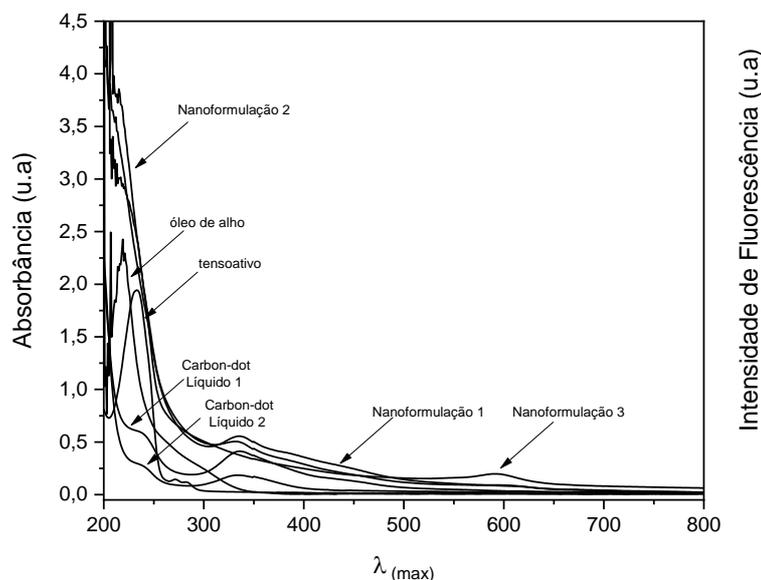


Figura 46. Espectros de absorção UV/VIS das formulações e de seus reagentes isoladamente. Nanoformulação 1: formulação de óleo de alho com CDot em pó; Nanoformulação 2: formulação de óleo de alho com CDot líquido 1; Nanoformulação 3: formulação de óleo de alho com CDot líquido 2.

As formulações foram avaliadas quanto à sua atividade biológica em larvas e pupas de *Ae. aegypti*. Todas as formulações tiveram CL_{50} entre 10 e 15 ppm nas primeiras 24 h, o que significa uma CL_{50} teórica de 1,0 a 1,4 ppm de óleo de alho (Tabela 16). A CL_{50} de 72 h foi inferior que à de 24 h, com valores de 8,0 a 12,4 ppm que resultam em CL_{50} teórica de óleo de alho da ordem de 0,8 a 0,9 ppm. A CL_{50} determinada para o óleo de alho ArboS187 puro em seção anterior (Tabela 6) foi de 1,6 ppm em 24 h, reduzindo para 1,0 ppm em 72 h. A formulação então resultou em aumento da atividade nas primeiras horas do teste. Uma vez que as CL_{50} de 72 h são comparáveis, o desenvolvimento das formulações não impactou a potência final do sistema.

Tabela 16. Atividade larvicida das formulações escalonadas (Tabela 15).

| Formulação | % teórica final de óleo | CL ₅₀ 24h (form) | CL ₅₀ 72h (form) | CL ₅₀ 24h (óleo na form) | CL ₅₀ 72h (óleo na form) |
|------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 87 | 7,6 | 14,0 | 12,4 | 1,1 | 0,9 |
| 125 | 10,0 | 10,6 | 8,0 | 1,0 | 0,8 |
| 126 | 9,5 | 10,5 | 8,2 | 1,1 | 0,8 |
| 127 | 9,0 | 11,0 | 8,8 | 1,1 | 0,9 |
| 129 | 9,5 | 13,8 | 8,2 | 1,4 | 0,8 |

CL₅₀: concentração letal média, n=3.

Diferente do observado para a atividade larvicida, a atividade pupicida da formulação 126 foi superior à atividade do óleo de alho puro. A CL₅₀ da formulação foi de 63,3 ppm, o que equivale a aproximadamente 6,5 ppm de óleo de alho, enquanto a CL₅₀ do óleo puro foi de 20,3 ppm. Em relação à atividade pupicida, a formulação foi capaz de aumentar em mais de três vezes a potência do óleo. A formulação 129, produzida sem CDot, teve CL₅₀ de 90,7 ppm em pupas o que equivale a aproximadamente 8,6 ppm de óleo de alho.

As formulações 126 e 129 também foram avaliadas quanto ao seu potencial ovicida. Foram testadas na concentração final de 1000 ppm de formulação, o que resultaria em concentração teórica aproximada de 95 ppm de óleo de alho. A taxa de eclosão espontânea média nos controles negativos foi de 68,8% para ovos eclodidos em água e 64,7% em ovos eclodidos em formulação com um óleo inerte (Tabela 17). Em torno de 15,0% das larvas eclodiram espontaneamente nos sistemas com óleo de alho (formulações 126 e 129) e morreram imediatamente. As larvas que morreram foram excluídas do cálculo de taxa de mortalidade, uma vez que o efeito letal não foi observado diretamente nos ovos. Após estímulo à eclosão, a taxa de eclosão bruta da formulação 129 (sem CDot) foi 11,4% e 15,3% para a formulação 126 (com CDot). Após correção com a fórmula de Henderson-Tilton, a taxa de mortalidade causada pelas formulações foi em média de 80%.

Tabela 17. Atividade ovicida das formulações escalonadas.

| Form | Mort. Larvas 48h (%) | Taxa eclosão espontânea 48h (%) | Taxa eclosão total (%) | Taxa mortalidade corrigida (%) |
|-------|----------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Água | 0 | 68,8 (\pm 9,5) | 76,7 (\pm 9,4) | - |
| C Neg | 0 | 64,6 (\pm 17,7) | 65,1 (\pm 17,5) | - |
| 126 | 14,4 (\pm 9,8) | 0 | 15,3 (\pm 11,9) | 80,4 (\pm 15,3) |
| 129 | 15,2 (\pm 19,1) | 0 | 11,4 (\pm 8,4) | 81,5 (\pm 14,8) |

C Neg: controle negativo DMSO.

Neste estudo, o óleo de alho ArboS187 a 100 ppm diluído em DMSO exibiu mortalidade corrigida de $59,6 \pm 10,6\%$ dos ovos, menor que a atividade ovicida da formulação. É possível que a nanoemulsão melhore a biodisponibilidade do óleo de alho. A formulação também pode aumentar a persistência do óleo, permitindo que permaneça em solução por mais tempo.

Em geral, as nanoformulações melhoraram a atividade do óleo de alho. Por ter via de exposição oral, as larvas são mais expostas e, portanto, mais suscetíveis a agentes exógenos. Por outro lado, pupas e ovos tem poucas vias de exposição ao meio externo, resultando em menor potencial de penetração de xenobióticos. A nanoformulação, portanto, melhorou a atividade pupicida e ovicida de maneira mais importante do que a atividade larvicida. A partir dos resultados promissores, foi possível o desenho da extensão da metodologia para produção de nanoformulação com CDot numa escala maior.

Escalonamento piloto em reator de alho ArboS187 com CDot líquido 2

Os testes de escalonamento piloto possuem grande importância uma vez que o comportamento dos reagentes e do sistema de produção podem variar com o aumento da escala de produção. Os primeiros testes de escalonamento piloto realizados foram planejados para aumento de quase 100 vezes o volume do escalonamento inicial de bancada. Em relação aos testes de bancada iniciais, o escalonamento piloto com óleo de alho resultou em um aumento aproximado de 450 vezes o volume inicial. Primeiro foi realizado escalonamento no reator usando um óleo inativo, para observação dos parâmetros reacionais e capacidade de emulsificação do sistema. Foi observado que apesar do reator possuir capacidade de 40 L, não seria

possível uso do volume total principalmente pela formação de espuma. No segundo escalonamento, realizado com óleo de alho ArboS187 e sistema tensoativo com CDot líquido **2**, foram obtidos aproximadamente 19 litros de solução. O tempo reacional observado em bancada teve de ser estendido para 6 h de agitação no reator. Ao final foi obtido um líquido azulado de coloração ligeiramente diferente da coloração observada na bancada.

Através da análise por HPLC, foi observado que o perfil cromatográfico do óleo de alho ArboS187 variou em relação ao perfil observado para as formulações de bancada, mas foi semelhante ao observado para a formulação (Figura 47), mostrando que o processo de escalonamento não afetou a composição do óleo. O lote de óleo ArboS187 utilizado no escalonamento, também da Sigma Aldrich, possui proporcionalmente menos DAS3 que o outro óleo utilizado anteriormente. Em avaliação por HPLC-UV (210 nm) esse óleo possui 30,0% de DAS3, enquanto que o óleo anterior continha 63% de DAS3.

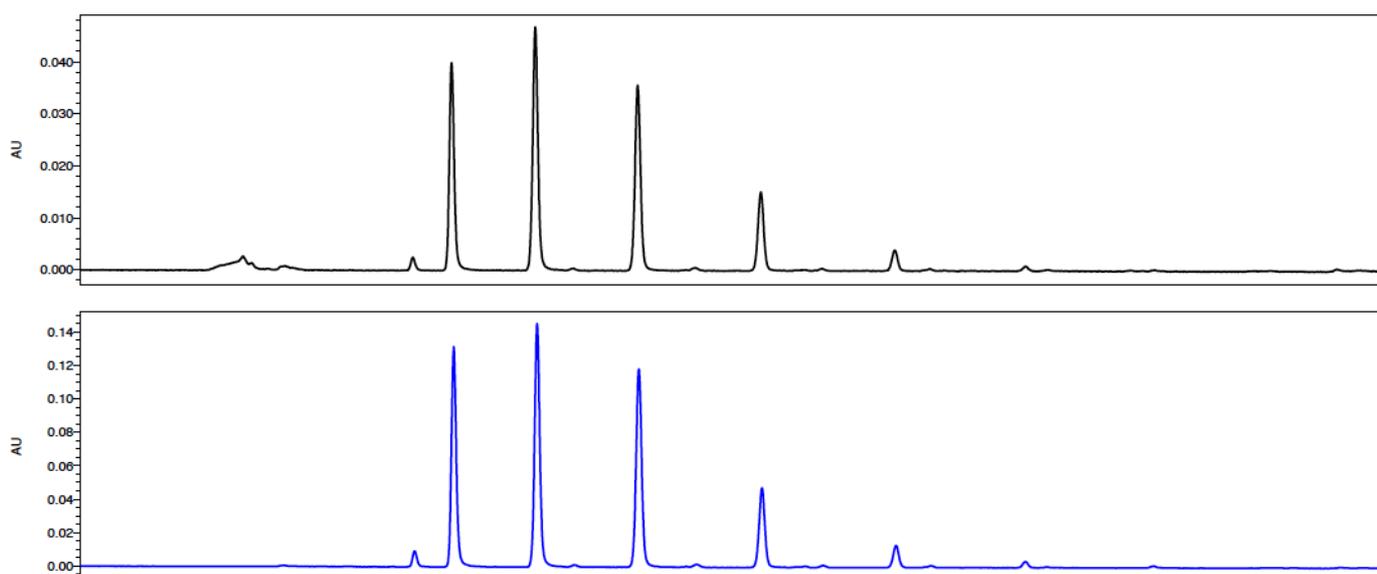


Figura 47. Perfil cromatográfico em HPLC-UV a 210 nm do óleo ArboS187 usado na formulação escalonada (superior) e do óleo de alho usado no escalonamento (inferior).

Por outro lado, a CL_{50} larvicida da formulação escalonada com óleo de alho ArboS187 (CDot líquido 2) foi de 13,8 ppm (13,7 – 13,9) em 24 h, 11,0 ppm (10,9 – 11,0) em 48h e 10,6 ppm (10,5 – 10,8) ppm em 72h. Em comparação, a formulação 126 (com CDot líquido 2) produzida em bancada possui CL_{50} de 10,5 ppm em 24 h, 9,4 ppm em 48 h e 8,2 ppm em 72 h. Considerando que os experimentos foram realizados em dias distintos, com diferentes lotes de larvas, a atividade larvicida da

formulação escalonada foi comparável à atividade da formulação de bancada. Após 3 meses de repouso em bancada, a CL_{50} de 24 h da formulação escalonada em reator aumentou para 24,9 ppm, fato também observado para as formulações de bancada. A atividade pupicida da formulação escalonada foi realizada após 4 meses de estocagem à temperatura ambiente, resultando numa CL_{50} de 107,0 ppm (105,8 – 108,1), o que representa a concentração teórica de 11,0 ppm de óleo de alho puro. A atividade pupicida dessa formulação foi inferior que a da formulação de bancada 126 (CL_{50} 63,3 ppm). Considerando que a formulação ficou estocada por 4 meses antes da avaliação da atividade pupicida, o resultado foi considerado satisfatório. Portanto, mesmo a troca de lote do óleo de alho com diferente perfil cromatográfico, o processo de escalonamento rendeu uma formulação com atividade biológica interessante.

A melhor temperatura de estocagem da formulação com CDot líquido 2 produzida em bancada, foi à temperatura ambiente (Figura 45). Portanto, uma alíquota da formulação escalonada foi mantida à temperatura ambiente em frasco de vidro translúcido para avaliação da estabilidade. Não houve variação significativa do tamanho de partícula durante as 12 semanas de avaliação (Figura 48). O índice de polidispersão teve pequena variação, mas se manteve em níveis adequados durante todo o experimento. Assim como observado para todas as formulações anteriores, o potencial zeta da formulação não apresenta valor significativo, ficando abaixo 30 mV (em módulo).

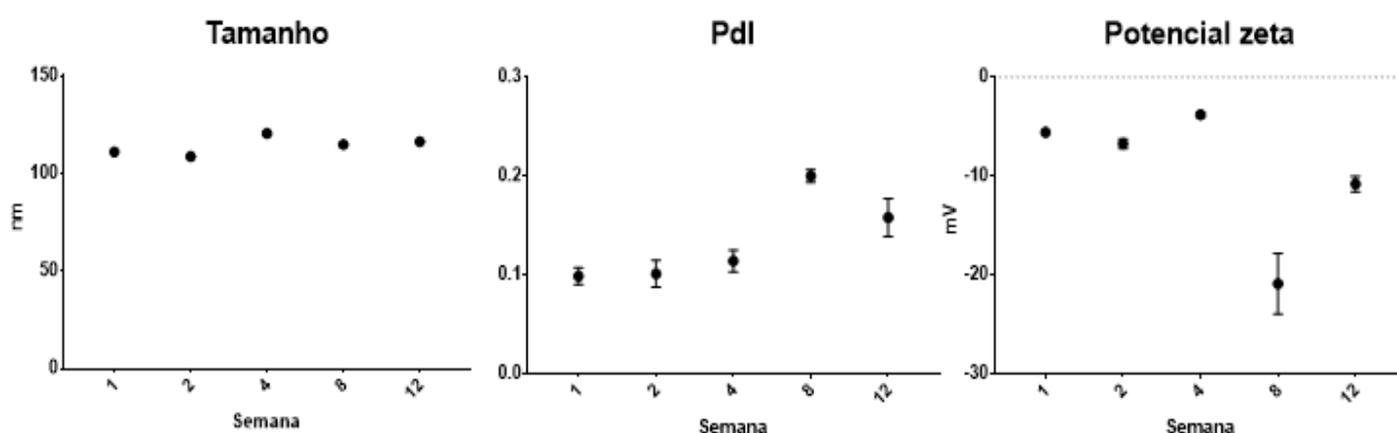


Figura 48. Características da formulação escalonada (ArboS187 e CDot líquido 2) em reator após estocagem sob temperatura ambiente. Tamanho em nm; potencial Zeta em mV.

A avaliação do teor de DAS2 e DAS3 na formulação escalonada foi realizada após 5 meses de estocagem em temperatura ambiente e frasco de vidro com tampa metálica rosqueada. Houve uma perda de aproximadamente 25% do teor de DAS2 e aumento de 10% de DAS3. A amostra foi rotineiramente aberta para execução dos

experimentos de estabilidade e atividade biológica. Os resultados sugerem que novos experimentos devem ser executados com amostras estocadas em frascos não violados durante o período todo da avaliação.

O teste de escalonamento piloto resultou em formulação de óleo de alho ArboS187 com Cdot líquido 2 estável com atividade biológica adequada. Diante dos resultados promissores, foi realizado escalonamento de 150 litros de formulação para realização do teste em campo.

Ensaio toxicológico com a nanoemulsão de óleo de alho ArboS187 com Cdot líquido 2

Ensaio toxicológico da nanoemulsão de óleo de alho desenvolvida nesta tese foram realizados pela empresa Ecolyzer, pertencente à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas). Os relatórios emitidos pela empresa estão no Anexo. O produto apresentou dose letal média (DL₅₀) superior a 2.000 mg/kg peso corpóreo, tanto na administração oral quanto dermal para ratos albinos (*Rattus norvegicus*), sendo classificado na classe toxicológica V do GHS (Global Harmonised Classification System – OECD). Não foram observados sinais de intoxicação nos ratos tratados com a maior dose (2.000 mg/kg de peso vivo). No teste de curta duração para danos oculares a viabilidade celular para a concentração de 5% foi de 78,15% e de 85,09% para 0,05%. O produto não promoveu irritação ocular e foi classificado como “sem categoria” pela classificação do GHS.

No ensaio de sensibilização dérmica foram observados tremores nos camundongos nas primeiras 48 h de teste no grupo tratado com solução teste a 100% (produto sem diluição) e no grupo do controle positivo (hexil cinamaldeído 25%). A resposta linfoproliferativa porém não foi suficiente para causar sensibilização e o produto foi classificado como não sensibilizante.

Nos testes de irritação dérmica, o tecido tratado apresentou viabilidade média de 82,7% após tratamento com o produto. Produtos que levem à viabilidade tecidual superior a 50% são classificados como Nenhuma categoria, não irritante. De forma semelhante, no ensaio de corrosão dérmica, a viabilidade do tecido após 3 e 60 min de exposição foi superior a 100%, sendo classificado como não corrosivo.

Os resultados das análises toxicológicas indicam que o produto formulado possui baixo risco de toxicidade. Os experimentos realizados responderiam às

exigências regulatórias da ANVISA quanto à avaliação toxicológica para o registro de produtos saneantes desinfestantes, como para uso de inseticidas para ações de saúde (ANVISA, 2010).

Estudos mostram o potencial uso de alho em terapias para o câncer (ZHANG et al., 2020), no tratamento de Diabetes mellitus, de doenças cardiovasculares e na proteção hepática (BANERJEE; MUKHERJEE; MAULIK, 2003; BAYAN; KOULIVAND; GORJI, 2014). O alho ainda é ativo em bactérias, protozoários, fungos e vírus (BAYAN; KOULIVAND; GORJI, 2014). Seu potencial uso como pesticida, principalmente para controle de insetos e nematoides na agricultura é extenso (ANWAR et al., 2017; BAKER; GRANT, 2018).

Cordeiros (*Ovis aries*) alimentados diariamente por 13 semanas com ração suplementada com 200 mg/kg de óleo de alho não tiveram alterações de ganho de peso nem alterações bioquímicas em relação ao grupo controle (CHAVES et al., 2008). A administração de dose oral de 300 mg/kg consecutiva por 4 dias de óleo de alho foi bem tolerada para ratos, mas não para camundongos, que toleraram bem a dose de 175 mg/kg. Toxicidade foi observada em camundongos tratados com 200 mg/kg de DAS2 por 4 dias, sendo a dose de 80 mg/kg bem tolerada. Animais com mutações em enzimas antioxidantes e de detoxificação podem apresentar perfil de toxicidade alterados, por vezes sendo mais suscetíveis aos compostos do alho (FISHER et al., 2007). Ratos em jejum por 24 h tratados com 100 mg/kg por via intragástrica morreram em 24 h por edema pulmonar agudo severa. Dados histológicos sugeriram que houve congestão severa em todos os órgãos. Em ratos alimentados, essa dose foi bem tolerada, assim como para ratos em jejum que haviam sido adaptados para alimentação com óleo de alho (JOSEPH; RAO; SUNDARESH, 1989). Em estudos de toxicidade aguda em ratos, a DL₅₀ de DAS2 foi superior a 5.000 mg/kg. Ainda em estudos agudos, o composto foi considerado como moderadamente irritante para os olhos e irritante tóxico severo em coelhos, e sensibilizante na pele em porco da Guiné (BAKER; GRANT, 2018). A administração de 5 mg/kg e 50 mg/kg de óleo de alho rico em DAS3 aumentou significativamente a anticoagulação de ratos, aumentando o tempo de sangramento e de trombina, e de fatores anticoagulantes como antitrombina III e proteína C. O uso da maior dose, 50 mg/kg, aumentou significativamente a concentração de fibrinogênio plasmático e afetou o nível de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas. O aumento de fibrinogênio causado pela maior dose não resultou em maior coagulação possivelmente pela indução concomitante

dos fatores anticoagulantes citados acima (CHAN; YIN; CHAO, 2007). O óleo de alho e seus polissulfetos em doses variando de 20 a 200 mg/kg são capazes de modular a atividade de enzimas hepáticas. A potência da estimulação ou inibição desses sistemas depende tanto da enzima quanto do polissulfeto analisado (WU et al., 2001, 2002). Ratos tratados por gavagem de 50 ou 100 mg/kg por uma semana tiveram redução dos danos renais causados pelo agente nefrotóxico nitriloacetato de ferro, sendo considerado um quimioprotetor do sistema renal (IQBAL; ATHAR, 1998).

Ensaio preliminar de campo com a nanoformulação de óleo de alho

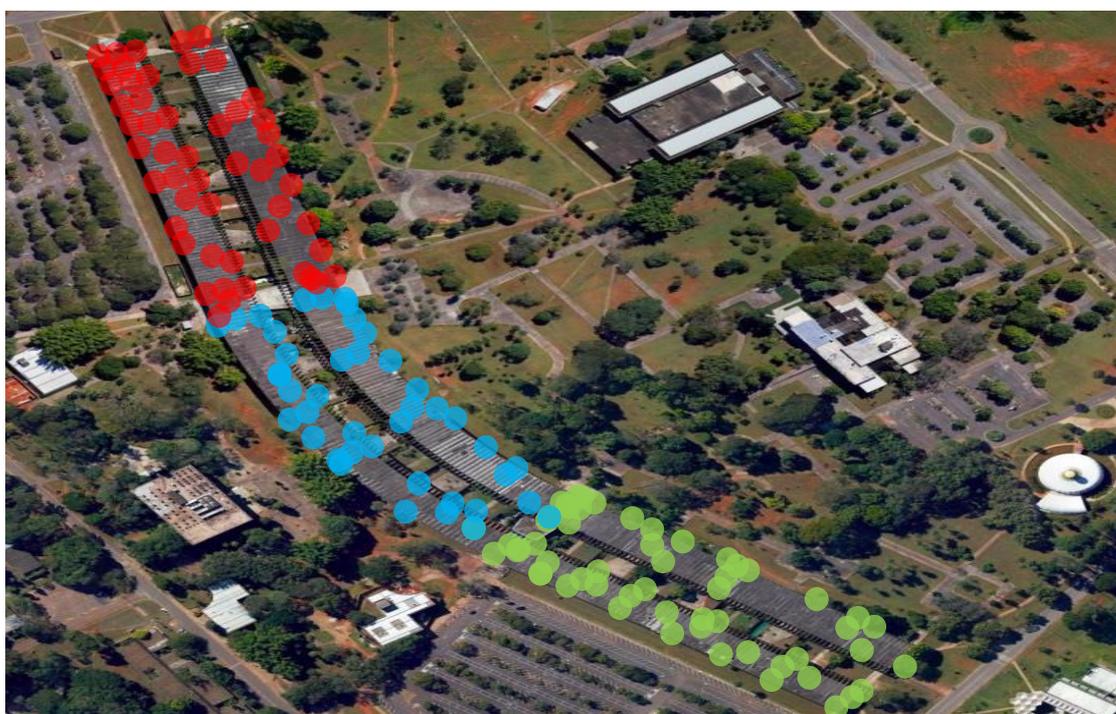
O ensaio preliminar em campo com a nanoformulação de óleo de alho desenvolvida nesse estudo (CDot líquido 2) foi realizado no Instituto de Central de Ciências da UnB (ICC), prédio histórico da UnB conhecido na comunidade acadêmica como “minhocão” (Figura 49). Após visita ao local, diversos tipos de estruturas do prédio foram identificadas como criadouros de mosquitos. A maior parte dos potenciais criadouros identificados são parte da estrutura física do prédio que não podem ser removidas (calhas e outras estruturas de escoamento de água). Portanto, os locais tratados não armazenam água para consumo humano.

A fim de se determinar a diluição e forma de aplicação do produto em campo, ensaios em baldes com 75 larvas e 10 pupas foi realizado. Foram testadas 5 concentrações que variaram de 10.000 ppm a 625 ppm de produto formulado. Todas as larvas morreram em menos de 1 hora da aplicação do produto em todas as doses testadas. As pupas tratadas com todas as concentrações também morreram, sendo que 20% das pupas nos baldes de 625 ppm tardaram 48 h para o efeito letal. Considerando os desafios do teste em campo, incluindo acesso aos reservatórios e características das linhagens de campo, e para facilitar a operacionalização, a concentração estimada final de 1.000 ppm nos reservatórios foi selecionada para o início do teste em campo. Para atingir a concentração de 1.000 ppm em reservatórios de até 4 litros, foi necessário produzir solução estoque de 50 mL de produto por litro de água para acionamento do gatilho de pulverização por até 2 segundos. O tratamento dos reservatórios foi sempre realizado após o monitoramento semanal das armadilhas, para evitar interferências na captura de mosquitos.

Após a instalação das armadilhas e antes do início do monitoramento de mosquitos, a equipe selecionou a Ala Norte do ICC (Figura 49) para a aplicação do

produto inseticida desenvolvido. Previamente à aplicação do produto, o monitoramento dos mosquitos foi realizado por 5 semanas consecutivas, da semana epidemiológica 5 à 9.

As armadilhas do tipo Mosquitrap® (Ecovec) utilizadas no estudo já demonstraram o potencial de monitoramento de mosquitos no campo (DEGENER et al., 2015; EIRAS; BUHAGIAR; RITCHIE, 2014; RITCHIE et al., 2014). Ao todo 147 armadilhas foram instaladas ao longo do prédio, sendo 50 (34,0%) na Ala Norte, 55 (37,4%) na Ala Sul e 42 (28,6%) na Ala Central (Figura 49). Dentre as 147 armadilhas, 39,5% foram instaladas no subsolo, 36,1% no térreo e 24,5% no andar superior (mezanino). O prédio ainda conta com dois blocos, Bloco A e Bloco B, localizados nas partes inferiores e superiores da Figura 49, respectivamente. No total, 55,8% das armadilhas foram instaladas do Bloco B e 44,2% no Bloco A. As diferenças na quantidade de armadilhas se deram pelas diferenças de disposição de salas, entradas, institutos e auditórios ao longo do prédio. As armadilhas foram instaladas diretamente no solo, em locais com cobertura contra chuva e sem exposição solar. Para a instalação das armadilhas, foram selecionados locais cujas condições atrairiam mosquitos fêmea para oviposição: locais escuros com pouca circulação de pessoas, preferencialmente em cantos (para auxiliar na propagação do odor do atraente).



● ALA SUL ● ALA CENTRAL ● ALA NORTE

Figura 49. Mapa do posicionamento de todas as armadilhas instaladas no ICC da Universidade de Brasília.

As armadilhas foram monitoradas por 5 semanas antes do início do tratamento (semanas epidemiológicas 5 a 9). Foi possível observar que houve aumento da quantidade de mosquitos capturados nas armadilhas ao longo das diferentes vistorias (Figuras 50 e 51). Vários fatores podem ter contribuído para a variação na quantidade de mosquitos capturados. O reconhecimento das armadilhas como possíveis recipientes para oviposição pode ter feito com que inicialmente menos mosquitos fossem capturados. A dinâmica de ocupação do prédio, com aumento progressivo de atividades presenciais, fazendo com que houvesse maior circulação e disponibilidade de pessoas disponíveis repasto sanguíneo das fêmeas. A frequência e quantidade de chuvas, que afeta a temperatura ambiente, são fatores com potencial impacto na quantidade de mosquitos. É possível observar que a diminuição de mosquitos capturados na semana 8 foi precedida por uma semana com grande quantidade de chuvas e diminuição da temperatura ambiente (Figuras 50 e 51). Por outro lado, a diminuição da quantidade de chuva da semana 12 em diante não levou à uma diminuição da quantidade de mosquitos coletados. Pelo contrário, com diminuição das chuvas, e aumento da temperatura ambiente, houve um aumento significativo na quantidade de mosquitos capturados (Figura 50 e 51). A variação da temperatura e pluviosidade já foram reportadas como variáveis que afetam diretamente na quantidade de mosquitos capturados (GAMA et al., 2007).

Como observado nas Figuras 50 e 51, houveram variações expressivas na quantidade de mosquitos capturados ao longo das semanas do estudo. A instalação de armadilhas não reduziu a quantidade de mosquitos, confirmando um estudo de campo em Manaus que também utilizou Mosquitrap (DEGENER et al., 2015).

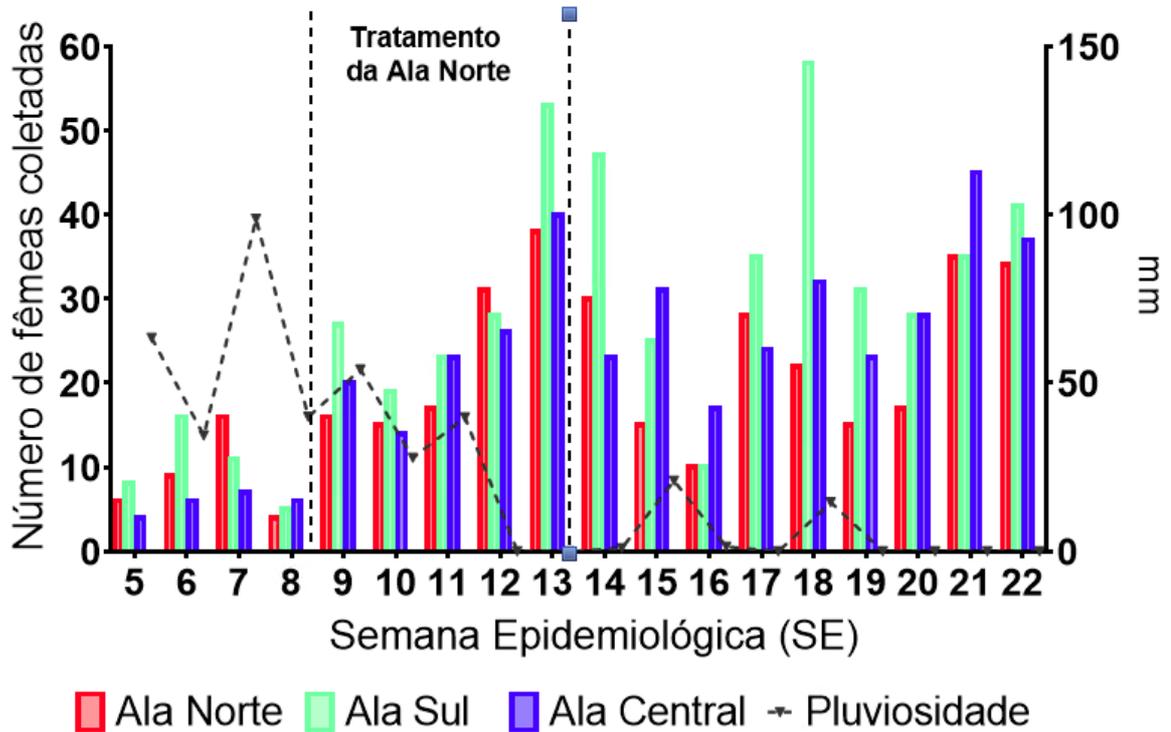


Figura 50. Pluviosidade e número de fêmeas de *Ae. aegypti* capturadas nas semanas epidemiológicas 5 (30/01 a 05/02/2022) a 22 (29/05 a 04/06/2022).

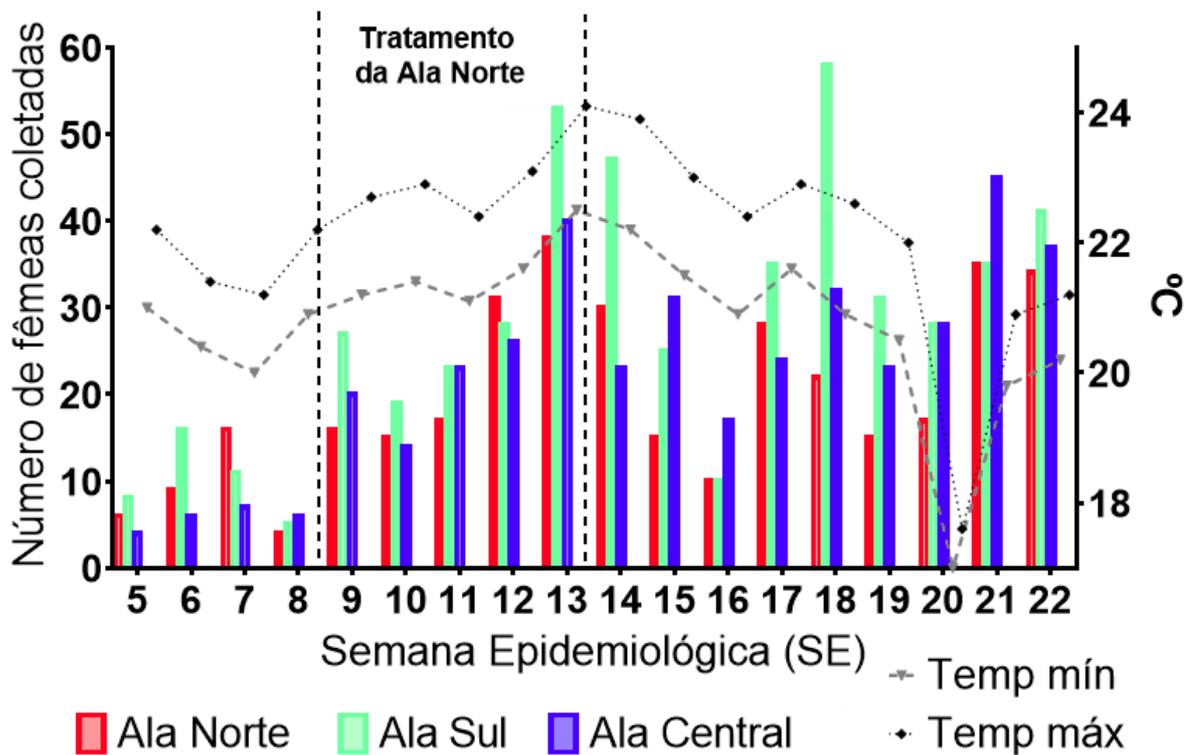


Figura 51. Temperatura ambiente mínima e máxima, e número de fêmeas de *Ae. aegypti* capturadas nas semanas epidemiológicas 5 (30/01 a 05/02/2022) a 22 (29/05 a 04/06/2022).

Inicialmente especulou-se que as calhas de escoamento de água do telhado, térreo e subsolo, seriam os principais reservatórios utilizados pelos mosquitos. Em visitas ao ICC no período de chuvas foram observados diversos dessas estruturas com água acumulada. Antes do início do experimento em campo, a prefeitura do campus realizou a limpeza e desobstrução desses locais ao longo de todo o prédio. Durante as visitas para o tratamento do prédio, se tornaram raras as ocasiões em que foi observado acúmulo de água nessas estruturas. Mesmo com a eliminação desses criadouros e diminuição da quantidade de chuvas, a quantidade de mosquitos capturados continuou aumentando. Após duas semanas de tratamento com o produto inseticida (semanas 10 e 11), foi observada pouca diferença entre a quantidade de mosquitos na Ala Norte (tratada) e nas outras áreas do prédio. Essas observações sugerem que os reservatórios tratados e que antes acumulavam a água da chuva não eram os criadouros mais importantes para a proliferação dos mosquitos.

Por outro lado, a relação da captura de mosquitos com a quantidade de chuvas pode não ser tão direta. Uma vez que as armadilhas simulam as condições ideais de criadouros, é possível que um aumento da captura de mosquitos nessas armadilhas signifique a diminuição de disponibilidade de criadouros no prédio. Isto é, a diminuição ou ausência de chuvas anularia a viabilidade de grande parte das estruturas expostas do prédio em se tornarem reservatórios de mosquitos. Dessa forma, os mosquitos buscariam as armadilhas como seus reservatórios preferenciais, aumentando a taxa de captura. É interessante notar que as oscilações na captura de mosquitos são concorrentes em todas as áreas do prédio, em menor ou maior grau dependendo das intervenções realizadas. Por exemplo, houve aumento na quantidade de mosquitos capturados nas semanas 13 e 14 em relação às semanas anteriores. Esse aumento, porém, foi menor na Ala Norte (38 e 30 fêmeas coletadas nas semanas 13 e 14), que recebeu o tratamento, do que na Ala Sul (53 e 47 fêmeas coletadas nas semanas 13 e 14), mas foi similar ao aumento na Ala Central (Figura 50 e 51).

A avaliação minuciosa dos resultados das vistorias sugeriu que a maior quantidade de mosquitos era capturada no subsolo da área B do prédio. Foi também observado que nas armadilhas próximas à bebedouros e banheiros eram capturados mosquitos com maior frequência do que em corredores e escadas. Em comum, essas

armadilhas estavam posicionadas em locais com presença de ralos ou outra estrutura de passagem de água, que não estavam completamente fechados ou sem tampas. Alguns dos banheiros próximos às armadilhas, principalmente no andar superior do prédio, são pouco utilizados e frequentemente estavam com a tampa do assento sanitário aberta. As próprias bacias sanitárias desses banheiros de pouco uso poderiam ser reservatórios dos mosquitos.

Após essas análises, os ralos e caixas de passagens de água da Ala Norte começaram a ser tratados a partir da semana 12. Nas vistorias da semana 12, a maior quantidade de mosquitos foi capturada na ala norte. Possivelmente, o tratamento dos ralos repeliu os mosquitos desses criadouros fazendo com que buscassem as armadilhas para a oviposição. Apesar do alho também possuir efeito adulticida, a forma de aplicação do produto (na água) faz com que o produto provavelmente não possua esse efeito. Por outro lado, pelo seu odor forte, o produto pode ter repellido os mosquitos dos criadouros tratados, os deslocando para outros reservatórios. Na semana 13, após 2 ciclos de tratamentos nos ralos, houve maior captura na ala sul do que nas outras seções do experimento.

De fato, o efeito do tratamento começou a ser observado após a semana 13, em que a quantidade de mosquitos capturados na Ala Norte passou a ser sempre menor do que da Ala Sul, com exceção da semana 16, com reduções de 20% a 62% na quantidade de mosquitos na Ala Norte em relação à Ala Sul (maior redução na semana 18). Na semana 15 houve um aumento súbito na quantidade de chuvas, e diminuição de temperatura ambiente, após mais de três semanas sem qualquer pluviosidade. Na semana 18 também houve chuvas que precederam uma diminuição na quantidade de fêmeas capturadas na semana seguinte (Figura 50).

Diante da diferença no número de armadilhas instaladas nas diferentes seções do prédio, o IMFA (Índice Médio de Fêmeas Adultas de *Aedes aegypti*) pode representar melhor a distribuição dos mosquitos. O IMFA corrige o número de mosquitos capturados em relação à quantidade de armadilhas disponíveis. É possível observar na Figura 52 que antes da semana 10 houve oscilação acerca da região com maiores valores de IMFA, por vezes sendo a Ala Norte e em outras a Ala Sul. Após o início do tratamento da Ala Norte, o IMFA nessa região só foi maior que na Ala Sul na semana 12, quando foi iniciado o tratamento nos ralos e caixas de passagem de água. Dessa forma, é possível observar que a introdução do tratamento com o produto formulado nesta tese produziu um impacto nesta avaliação de campo. O IMFA na

semana 13 foi de 0,76 na Ala Norte, 1,02 na Ala Sul e 0,98 na Ala Central. Após a semana 12, o IMFA da Ala Norte variou de 0,2 (semana 16) a 0,76 (semana 13), de 0,18 (semana 16) a 1,12 (semana 18) na Ala Sul, e de 0,4 (semana 16) a 0,98 (semana 13) na Ala Central. Da semana 13 a 15 foi observada uma diminuição progressiva do IMFA da Ala Norte chegando a valor 35% menor ao IMFA da Ala Sul. Na semana 18 houve a maior diferença observada, IMFA 60% menor na Ala Norte em relação à Ala Sul, como também observado anteriormente com o número de capturas (Figura 50 e 51). Essa variação diminuiu nas semanas seguintes potencialmente sinalizando uma redução da atividade do produto.

O ICC se estende, em sua totalidade, por 700 metros, sendo dividido em três alas (norte, sul e central) de extensões semelhantes (aproximadamente 230 metros cada). O tratamento da Ala Norte pode também ter afetado a população de mosquitos na Ala Central (adjacente), uma vez que os estudos em laboratório sugerem que o óleo de alho também é repelente. Apesar de ter sido aplicada com foco nas formas imaturas, o odor forte da formulação pode ter afastado os mosquitos da Ala Norte. A proximidade espacial das áreas de estudo, em especial nas extremidades da Ala Central, pode causar enviesamento dos resultados e é uma limitação do estudo. Os mosquitos adultos, forma de vida monitorada no estudo, possuem raio de voo aproximado de 250 metros fazendo com que possam se locomover livremente entre as regiões de estudo. Desta maneira, um mosquito que nasceu de um criadouro na ala central pode ter sido capturado na ala norte, e vice versa.

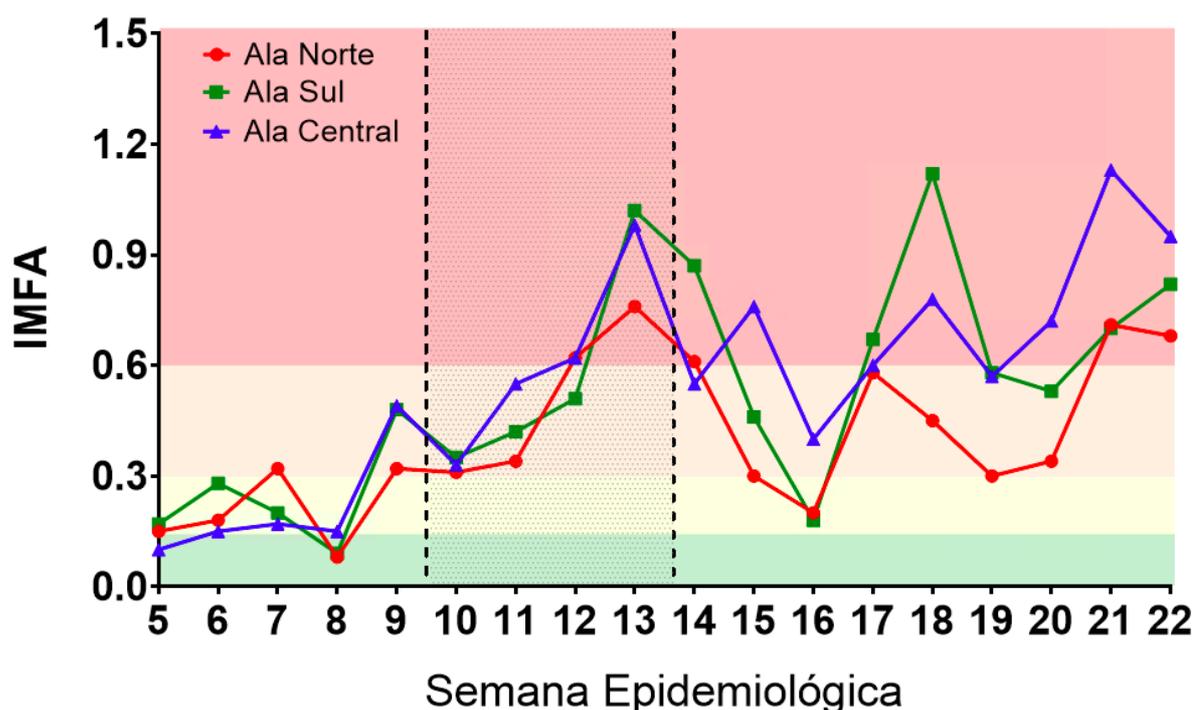


Figura 52. Variação do Índice Médio de Fêmeas Adultas de *Aedes aegypti* (IMFA) nas semanas epidemiológicas 5 a 22. A zona vermelha representa IMFA crítico (>0,6), em laranja a zona de alerta, em amarelo a zona de IMFA moderado e em verde a zona satisfatória. Tratamento feito nas semanas de 10 a 13.

O IPM (Índice de Positividade da Mosquitrap) mede a relação entre as armadilhas com mosquitos capturados e o total de armadilhas vistoriadas. Com o aumento do número de mosquitos capturados, também foi observado o aumento no número de armadilhas positivas com fêmeas de *Ae. aegypti* (Figura 53). O maior valor de IPM observado foi na Ala Central na semana 18, em que foram capturadas fêmeas de *Ae. aegypti* em 46,3% das armadilhas vistoriadas, confirmando os resultados anteriores desta semana. Na semana 14, 45% das armadilhas da Ala Norte e 44% das armadilhas da Ala Central foram positivas.

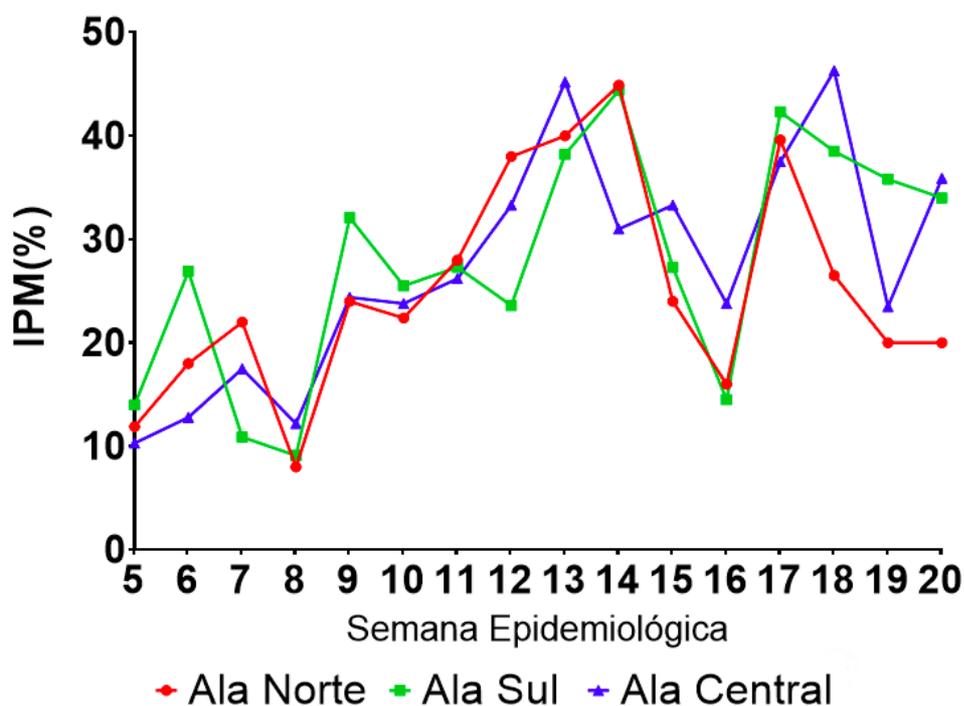


Figura 53. Variação do Índice de Positividade da Mosquitrap (IPM) nas semanas epidemiológicas 5 a 20. Tratamento realizado nas semanas de 10 a 13.

As variações do IPM ocorreram de maneira concorrente às variações dos IMFA em todas as regiões (Figura 54).

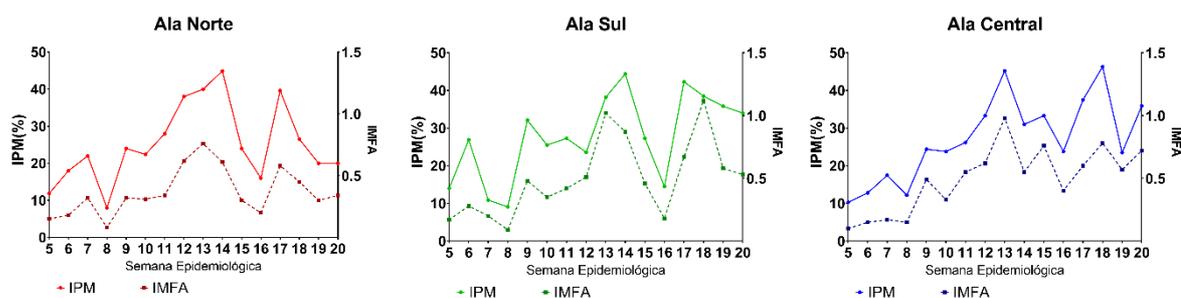


Figura 54. Variação do Índice de Positividade da Mosquitrap (IPM) e do IMFA nas semanas epidemiológicas 5 a 20. Tratamento realizado nas semanas de 10 a 13.

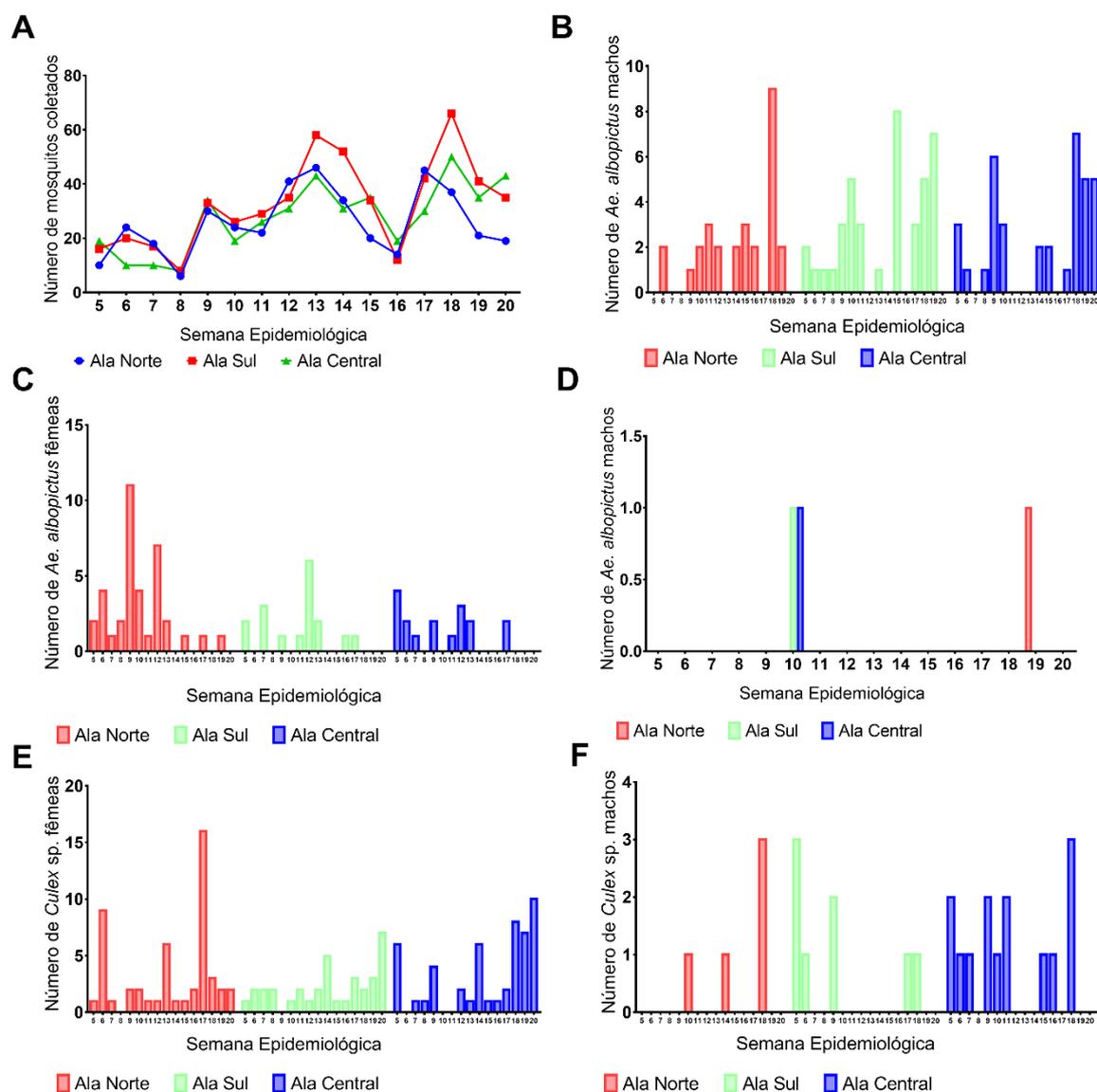


Figura 55. Variação da quantidade de mosquitos capturados durante o estudo de campo. A: todos os mosquitos; B: *Ae. aegypti* machos; C: *Ae. albopictus* fêmeas; D: *Ae. albopictus* machos; E: *Culex* sp. fêmeas; F: *Culex* sp. machos.

Apesar do foco do estudo ter sido com relação à fêmeas de *Ae. aegypti*, outros mosquitos também foram capturados. Na inspeção visual dos cartões adesivos é possível diferenciar machos de fêmeas, principalmente pelas diferenças nas antenas. É também possível diferenciar mosquitos da espécie *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, pelo padrão do desenho no *pronotum* e pela característica coloração muito escura do *Ae. albopictus*. Também pela coloração, desta vez amarronzada, é possível identificar mosquitos do gênero *Culex* sp. Por serem espécies de hábitos muito semelhantes espera-se que o tratamento de reservatórios afete todos os mosquitos que infestam

as instalações do ICC. Por outro lado, uma quantidade muito inferior desses outros mosquitos foram capturados (6,9% *Ae. aegypti* machos, 4,2% *Ae. albopictus* fêmeas, 0,4% *Ae. albopictus* machos, 9,2% *Culex* sp fêmeas e 2,1% *Culex* sp. machos). A Figura 55 mostra a quantidade de mosquitos capturados durante o estudo de campo. No total, quase 90% dos mosquitos coletados eram fêmeas, o que não é mera coincidência. Além de sobreviverem por mais tempo do que machos, as armadilhas do tipo Mosquitrap® foram desenvolvidas para atrair especificamente fêmeas de *Ae. aegypti*.

O estudo realizado no ICC contou com uma densidade de armadilhas (400 armadilhas/ km²) muito superior à utilizada no monitoramento vetorial pelos municípios, entre 16 a 64 armadilhas por km² (dados fornecidos pela Ecovec segundo o serviço ofertado pela empresa aos municípios). Portanto, a estratificação de risco utilizada pela Ecovec no monitoramento de mosquitos em municípios pode não ser adequada para este estudo. Por outro lado, a grande quantidade de mosquitos capturados no ICC, prédio histórico da UnB, pode representar um elevado risco de circulação viral, principalmente em períodos com alto número de casos de arboviroses no DF e entorno. O monitoramento viral em *Ae. aegypti* realizado no campus universitário da Universidade Federal de Minas Gerais detectou a presença de DENV e ZIKV durante 4 das 12 semanas monitoradas (EIRAS et al., 2018). Novos estudos com monitoramento viral devem ser realizados para compreensão acerca da circulação viral no campus. Os dados obtidos neste estudo sugerem que uma ação emergencial e efetiva de controle vetorial de mosquitos deve ser realizada.

Neste estudo em campo, a forma de vida adulta foi monitorada enquanto os reservatórios das formas imaturas foram tratados. Era esperado que os resultados fossem observados após algumas semanas do início do tratamento, uma vez que as intervenções afetariam as formas imaturas. De fato, o desenho experimental se confirmou na prática, em que o pico da diferença de mosquitos capturados na Ala Norte se deu na semana epidemiológica 18, 5 semanas após o fim da aplicação do produto. Os resultados do ensaio de campo até o momento sugerem que a formulação de alho aplicada por 5 semanas teve impacto na quantidade global de mosquitos na área tratada, a Ala Norte. O impacto pode ser observado pelo resultado da semana 18 em que houve uma diminuição pontual de até 60% do IMFA na Ala Norte em relação à Ala Sul.

Um estudo de campo com monitoramento de *Ae. aegypti* fêmeas na Austrália mostrou que não há diferença significativa no número de mosquitos capturados após uso de estratégias de controle livre de inseticidas, como uso de cartões adesivos ou óleo de canola, em relação à aplicação de inseticida em redes tratadas ou superfícies (HERINGER et al., 2016). Outro estudo de campo realizado na Martinica com os inseticidas spinosad, diflubenzuron, piriproxifeno e *Bti* mostraram uma brusca diminuição na quantidade de larvas após mais de 60 dias da aplicação dos tratamentos. Para cada inseticida nesse estudo, foram tratados 15 recipientes onde inicialmente foram identificadas larvas. Diferente do presente estudo de campo com formulação de alho, o resultado do estudo foi medido pela amostragem de larvas nos mesmos recipientes que foram tratados com os inseticidas (MARCOMBE et al., 2011).

Um estudo avaliou o efeito em campo de estações disseminadoras de piriproxifeno (PPF) na populações de mosquitos adultos e ovos em residências no Distrito Federal (GARCIA et al., 2020). As estações disseminadoras são recipientes contendo água e inseticida, em que fêmeas de *Ae. aegypti* são impregnadas com o larvicida e acabam levando o produto para outros criadouros. A captura de mosquitos adultos foi realizada com aspiração, e ao final de 16 meses, 4356 mosquitos foram coletados, sendo 783 *Ae. aegypti* (GARCIA et al., 2020). Foi observada redução significativa de 60% na densidade média de *Ae. aegypti* adultos após a intervenção com o PPF em relação ao período basal. Porém, não houve impacto na quantidade de ovos capturados nas ovitrampas, que ficaram instaladas nas residências ao longo de todo o estudo (GARCIA et al., 2020).

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi estudado o potencial do óleo de alho para uso em produtos inseticidas para o controle de *Ae. aegypti*. A caracterização química do óleo de alho ArboS187, adquirido da Sigma-Aldrich, revelou que os polissulfetos de dialila são os compostos majoritários, especialmente o dissulfeto, trissulfeto e tetrassulfeto. O óleo foi ativo em todas as formas de vida de *Ae. aegypti* testadas: ovo, larva, pupa e mosquito adulto, em testes no laboratório e ensaios em condições de semi-campo. A avaliação da atividade dos polissulfetos isoladamente sugeriu que o óleo de alho, é mais ativo em larvas e pupas que os compostos isolados. Modificações nas proporções de polissulfetos no óleo de alho sugeriram que a atividade global do óleo não é impactada, desde que a soma da concentração dos polissulfetos mais ativos se mantenha constante. Foi observado que a volatilização do óleo é um importante fator para a atividade inseticida, o que faz com que recipientes com diferentes razões de área/volume tenham resultados distintos. O uso de DMSO para solubilização dos polissulfetos afetou a estabilidade dos compostos, mostrando que a escolha do solvente pode afetar a atividade biológica e composição da amostra. Estudos preliminares em peixe-zebra indicam que o óleo de alho ArboS187 é menos tóxico para esse organismo não-alvo do que para larvas e pupas de *Ae. Aegypti*

A partir do potencial de uso do óleo de alho para controle de todas as formas de vida de *Ae. aegypti*, foram produzidas nanoemulsões com nanopartículas de carbono (CDot) e tensoativo não-iônico. As formulações se mantiveram estáveis por 3 meses em armazenamento à temperatura ambiente e em geladeira. O escalonamento piloto da formulação também mostrou que o sistema desenvolvido é passível de escalonamento industrial. A nanoemulsão possui baixo potencial de toxicidade, com dose letal oral e dérmica em ratos superior a 2.000 mg/kg peso corpóreo.

Estudo preliminar em campo no Instituto Central de Ciências da Universidade de Brasília com monitoramento da presença de mosquitos adultos indicam que o produto pode ter um impacto na população de mosquitos fêmeas. O produto aplicado em potenciais reservatórios de formas imaturas do mosquito, chegou a causar uma redução pontual de até 60% de fêmeas de *Ae. aegypti* na área tratada em relação à área controle. O pico de redução de mosquitos ocorreu 5 semanas após o fim da aplicação do produto. O tratamento estatístico apropriado dos dados poderá indicar o

impacto real da intervenção em campo. Os resultados encontrados até o momento reforçam o potencial do óleo de alho como um forte candidato ao desenvolvimento de um biopesticida para controle vetorial de *Ae. aegypti*.

LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

A principal limitação acerca do uso da formulação produzida a partir do óleo de alho é relacionada ao seu odor. Durante o ensaio preliminar em campo, a aplicação do produto causou desconforto à um professor que estava presente na edificação enquanto a formulação estava sendo aplicada próximo à sua sala. A situação foi reportada à reitoria pelo docente através de manifestação escrita. Este desconforto, porém, não foi manifestado por servidores responsáveis pela limpeza e segurança do edifício, quando questionados. Após este acontecido, aplicação do produto começou a ser realizada aos sábados pela tarde, quando existe pouca atividade no campus.

O desenvolvimento de novos produtos e tecnologias deve passar por validações em campo quando são identificadas as limitações. Neste contexto, observa-se a necessidade de modificação da formulação se aplicada dentro de edificações, para diminuir o desconforto dos usuários. Como perspectiva, formulações de óleo de alho contendo agentes mascarantes de odor podem ser produzidas. Ainda, as formulações com óleo de alho podem ser direcionadas para uso em locais de grande acúmulo de reservatórios de mosquitos e baixa circulação de pessoas, como ferros-velhos.

O estudo preliminar de campo no ICC foi realizado em um prédio histórico único, ambiente com características diferentes do cenário convencional de controle vetorial. O estudo foi conduzido por relativo pequeno período de tempo (5 meses), em que ocorreu variação crítica de volume de precipitação. O ensaio foi, portanto, considerado preliminar, e ensaios em maior escala por períodos mais prolongados devem ser realizados para que a efetividade de campo do produto possa ser melhor estimada. A dificuldade de acesso a todos os reservatórios, a restrição do horário de aplicação do produto (sendo aplicado no início da tarde) e o desafio de localização de todos os possíveis reservatórios podem ter reduzido o impacto do tratamento. Ainda, apesar do óleo de alho ser capaz de afetar todas as formas de vida do mosquito, a falta de residualidade do produto certamente impacta sua performance em campo. Junto a isso, os ralos e caixas de passagem, identificados como os prováveis reservatórios de maior importância, são reservatórios com frequente renovação de água. Desta forma, a aplicação de inseticidas nesses locais sem medidas que inviabilizem o acesso de novos mosquitos, como uso de tampas vedadas, pode ter impacto reduzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHEE, N. L. et al. Spatial repellents: from discovery and development to evidence-based validation. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 164, 14 maio 2012.
- ACHEE, N. L. et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006822, 3 jan. 2019.
- ADIL, M.; ONAIZI, S. A. Pickering nanoemulsions and their mechanisms in enhancing oil recovery: A comprehensive review. **Fuel**, v. 319, p. 123667, jul. 2022.
- AMONKAR, S. V.; BANERJI, A. Isolation and Characterization of Larvicidal Principle of Garlic. **Science**, v. 174, n. 4016, p. 1343–1344, 24 dez. 1971.
- AMONKAR, S. V.; REEVES, E. L. Mosquito control with active principle of garlic, *Allium sativum*. **Journal of Economic Entomology**, v. 63, n. 4, p. 1172–1175, 1970.
- ANGEL, B.; ANGEL, A.; JOSHI, V. Multiple dengue virus types harbored by individual mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 150, p. 107–110, out. 2015.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 59, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2010**, 2010. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0059_17_12_2010.html>. Acesso em: 18 jun. 2010
- ANVISA. **RESOLUÇÃO-RE Nº 686, DE 5 DE MARÇO DE 2020**, 2020. . Acesso em: 5 jul. 2022
- ANVISA, A. N. D. V. S. **Monografia farmacopeica de alho (bulbo ou bulbilho), *Allium sativum* L.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/air/analises-de-impacto-regulatorio/2015/25351-190793_2014-72-monografia-farmacopeica-de-alho-bulbo-ou-bulbilho-allium-sativum-l.pdf/view>.
- ANVISA, A. N. D. V. S. **Monografia Alho, bulbo PM005-00. Farmacopéia Brasileira 6a edição**, 2019.
- ANWAR, A. et al. How to Turn the Chemistry of Garlic into a ‘Botanical’ Pesticide. Em: JACOB, C. et al. (Eds.). . **Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 323–341.
- ANWAR, A. et al. Think Yellow and Keep Green—Role of Sulfanes from Garlic in Agriculture. **Antioxidants**, v. 6, n. 1, 2017.
- ARBACH, M. et al. Antimicrobial garlic-derived diallyl polysulfanes: Interactions with biological thiols in *Bacillus subtilis*. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, v. 1863, n. 6, p. 1050–1058, jun. 2019.
- AUERSWALD, H. et al. Broad and long-lasting immune protection against various Chikungunya genotypes demonstrated by participants in a cross-sectional study in a Cambodian rural community. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 13–13, 7 fev. 2018.
- BAKER, B. P.; GRANT, J. A. **Garlic and Garlic Oil Profile**New York State Integrated Pest Management, Cornell University, Geneva NY, , 2018. Disponível em: <<https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/56126>>
- BALDELLI, E. et al. Heterogeneous Off-Target Effects of Ultra-Low Dose Dimethyl

- Sulfoxide (DMSO) on Targetable Signaling Events in Lung Cancer In Vitro Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 2819, 10 mar. 2021.
- BANERJEE, S. K.; MUKHERJEE, P. K.; MAULIK, S. K. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 2, p. 97–106, 1 fev. 2003.
- BARREDO, E.; DEGENNARO, M. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. **Trends in Parasitology**, 17 mar. 2020.
- BAYAN, L.; KOULIVAND, P. H.; GORJI, A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1–14, jan. 2014.
- BENELLI, G. et al. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 369–386, 16 fev. 2017.
- BERRY, C. et al. Complete Sequence and Organization of pBtoxis, the Toxin-Coding Plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5082–5095, 1 out. 2002.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.
- BRADY, O. 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, 7 ago. 2012.
- BRADY, O. J. et al. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 351, dez. 2013.
- BRADY, O. J. et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 338, 2014.
- BRASIL, M. DA S., Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**, 5 ago. 2009. . Acesso em: 26 fev. 2016
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, jul. 2011.
- BYTTEBIER, B.; DE MAJO, M. S.; FISCHER, S. Hatching Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Eggs at Low Temperatures: Effects of Hatching Media and Storage Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 97–103, 1 jan. 2014.
- CAMPBELL, C. et al. Organosulphur constituents in garlic oil elicit antennal and behavioural responses from the yellow fever mosquito. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 5, p. 374–381, 1 jun. 2011a.
- CAMPBELL, C. et al. Organosulphur constituents in garlic oil elicit antennal and behavioural responses from the yellow fever mosquito. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 5, p. 374–381, 1 jun. 2011b.
- CARDONA-OSPINA, J. A. et al. Sexual transmission of arboviruses: More to explore? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 76, p. 126–127, 1 nov. 2018.

- CARVALHO, C. J. B. DE et al. **Diptera Linnaeus, 1758**. In: **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012.
- CDC, C. FOR D. C. AND P. **Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay**, 2010. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf>
- CDC, C. FOR D. C. AND P. **CONUS Manual for Evaluating Insecticide Resistance in Mosquitoes Using the CDC Bottle Bioassay Kit**, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/pdfs/CONUS-508.pdf>>
- CHAN, K.; YIN, M.; CHAO, W. Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 3, p. 502–507, 1 mar. 2007.
- CHANG, M.-M. et al. Effect of Diallyl Trisulfide on the Reproductive Behavior of the Grain Moth, *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insects**, v. 11, n. 1, 2020.
- CHANG, W.-T.; WU, C.-H.; HSU, C.-L. Diallyl trisulphide inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through lipogenesis, fatty acid transport, and fatty acid oxidation pathways. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 414–422, jun. 2015.
- CHANTAWEE, A.; SOONWERA, M. Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL BIOMEDICINE**, v. 8, n. 4, p. 217–225, abr. 2018.
- CHAPMAN, R. **The insects: Structure and function**. 4. ed. Cambridge University, United Kingdom: [s.n.].
- CHAUDHARY, S. et al. Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- CHAVES, A. V. et al. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 117, n. 2, p. 215–224, 1 set. 2008.
- CHAVES, B. A. et al. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 4, p. 563–571, 13 jul. 2018.
- CHOI, Y. et al. Carbon Dots: Bottom-Up Syntheses, Properties, and Light-Harvesting Applications. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 13, n. 6, p. 586–598, 16 mar. 2018.
- CLETON, N. et al. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191–203, 1 nov. 2012.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. et al. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006510, 13 jun. 2018.
- DA COSTA, C. F. et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 249–249, 19 maio 2017.

- DAVID, M. R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FREITAS, R. M. DE. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 927–932, 2009.
- DE CARVALHO, G. H. F. et al. Larvicidal and pupicidal activities of eco-friendly phenolic lipid products from *Anacardium occidentale* nutshell against arbovirus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 5514–5523, 1 fev. 2019.
- DE MORAES, J. C. et al. A case-control study to determine the effectiveness of a tetravalent dengue vaccine in the state of Paraná, Brazil. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 7, p. 100141, 1 mar. 2022.
- DE OLIVEIRA, W. K. et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 861–870, 26 ago. 2017.
- DE SOUSA, F. D. M. et al. Dereplication and Isolation of Larvicidal Compounds From Annonaceae Species Against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 1, p. 123–126, 1 fev. 2020.
- DEGENER, C. M. et al. Mass trapping with MosquiTRAPs does not reduce *Aedes aegypti* abundance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 517–527, 28 abr. 2015.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5979, p. 745–748, 7 maio 2010.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, set. 2016.
- DEMARQUE, D. P. et al. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1051, 23 jan. 2020.
- DIEHL, O. J. et al. Antenna regeneration as an ecotoxicological endpoint in a marine amphipod: a proof of concept using dimethyl sulfoxide and diflubenzuron. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 751–755, maio 2021.
- DUSI, R. G. et al. Potential of garlic oil as a biopesticide against all *Aedes aegypti* life stages. **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 114780, 1 jul. 2022.
- DZUL-MANZANILLA, F. et al. Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 2, p. 141–144, fev. 2016.
- EIRAS, A. E. et al. A high-risk Zika and dengue transmission hub: virus detections in mosquitoes at a Brazilian university campus. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 359, dez. 2018.
- EIRAS, A. E.; BUHAGIAR, T. S.; RITCHIE, S. A. Development of the Gravid *Aedes* Trap for the Capture of Adult Female Container-Exploiting Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 200–209, 1 jan. 2014.

EMA, E. M. A. **European Union herbal monograph on *Allium sativum* L., bulbus.** UK: [s.n.].

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Active Ingredients Eligible for Minimum Risk Pesticide Products**, [s.d.]. Disponível em:

<<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/minrisk-active-ingredients-tolerances-2015-12-15.pdf>>

EPA. **Pests and Biopesticides Used to Treat Them- Interregional Project Number 4 (IR-4)**. [s.l: s.n.].

FERREIRA-DE-BRITO, A. et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 655–658, 3 out. 2016.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 77, 1 fev. 2018.

FISHER, C. D. et al. Induction of Drug-Metabolizing Enzymes by Garlic and Allyl Sulfide Compounds via Activation of Constitutive Androstane Receptor and Nuclear Factor E2-Related Factor 2. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 6, p. 995, 1 jun. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT. Crops**, 2018.

GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317–1330, mar. 2014.

GAMA, R. A. et al. Evaluation of the sticky MosquiTRAP™ for detecting *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) during the dry season in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 294–302, abr. 2007.

GANDHI, M. R. et al. **Larvicidal and Pupicidal Activities of Alizarin Isolated from Roots of *Rubia cordifolia* Against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)** NEOTROPICAL ENTOMOLOGY CAIXA POSTAL 481, 86001-970 LONDRINA,, PR, BRAZILENTOMOLOGICAL SOC BRASIL, , ago. 2016.

GARCIA, G. DE A. et al. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006227, 12 fev. 2018.

GARCIA, K. K. S. et al. Measuring mosquito control: adult-mosquito catches vs egg-trap data as endpoints of a cluster-randomized controlled trial of mosquito-disseminated pyriproxyfen. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 352, 14 jul. 2020.

GEORGE, K. C.; AMONKAR, S. V.; EAPEN, J. Effect of garlic oil on incorporation of amino acids into proteins of *Culex pipiens quinquefasciatus* say larvae. **Chemico-Biological Interactions**, v. 6, n. 3, p. 169–175, 1 mar. 1973.

GJULLEN, C.; PETERS, R. Recent studies of mosquito resistance to insecticides in California. **Mosq. News**, v. 12, p. 1–7, 1952.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 1 dez. 2017.

- GRIECO, J. P. et al. A New Classification System for the Actions of IRS Chemicals Traditionally Used For Malaria Control. **PLOS ONE**, v. 2, n. 8, p. e716, 8 ago. 2007.
- 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.
- HEALTH CANADA. **Natural Health Product - Garlic- *Allium sativum***. [s.l: s.n.].
- HEMME, R. R. et al. Influence of Urban Landscapes on Population Dynamics in a Short-Distance Migrant Mosquito: Evidence for the Dengue Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e634, 16 mar. 2010.
- HENDERSON, CHAS. F.; TILTON, ELVIN. W. Tests with Acaricides against the Brown Wheat Mite¹². **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 2, p. 157–161, 1 abr. 1955.
- HERINGER, L. et al. Evaluation of Alternative Killing Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Gravid *Aedes* Trap (GAT). **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 4, p. 873–879, jul. 2016.
- HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, p. 99–111, 1 fev. 2019.
- HILL, S. C. et al. Emergence of the Asian lineage of Zika virus in Angola: an outbreak investigation. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1138–1147, 1 out. 2019.
- HU, X. et al. Function of *Aedes aegypti* galectin-6 in modulation of Cry11Aa toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 162, p. 96–104, jan. 2020.
- HUSTEDT, J. C. et al. Use of pyriproxyfen in control of *Aedes* mosquitoes: A systematic review. **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**, v. 14, n. 6, jun. 2020.
- ILIEVA, Y. et al. Cytotoxicity and Microbicidal Activity of Commonly Used Organic Solvents: A Comparative Study and Application to a Standardized Extract from *Vaccinium macrocarpon*. **Toxics**, v. 9, n. 5, p. 92, 21 abr. 2021.
- IQBAL, M.; ATHAR, M. Attenuation of Iron-Nitritoltriacetate(Fe-NTA)-mediated Renal Oxidative Stress, Toxicity and Hyperproliferative Response by the Prophylactic Treatment of Rats with Garlic Oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 485–495, 1 jun. 1998.
- ISMAN, M. B. A renaissance for botanical insecticides? **Pest Management Science**, v. 71, n. 12, p. 1587–1590, 1 dez. 2015.
- ISMAN, M. B. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise? **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 233–249, 7 jan. 2020.
- ISMAN, M. B.; GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 140–145, 1 mar. 2014.
- JARIAL, M. **Toxic effect of garlic extracts on the eggs of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae): A scanning electron microscopic study (vol 38, pg 446, 2001)**JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY9301 ANNAPOLIS RD, LANHAM, MD 20706 USAENTOMOL SOC AMER, , jul. 2001.

JOHN P. GRIECO et al. A NOVEL HIGH-THROUGHPUT SCREENING SYSTEM TO EVALUATE THE BEHAVIORAL RESPONSE OF ADULT MOSQUITOES TO CHEMICALS. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 4, p. 404–411, 1 dez. 2005.

JOHNSON, B. J. et al. Mosquito Age Grading and Vector-Control Programmes. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 39–51, 1 jan. 2020.

JOSEPH, P.; RAO, K.; SUNDARESH, C. Toxic effects of garlic extract and garlic oil in rats. **Indian journal of experimental biology**, v. 27, n. 11, p. 977–979, nov. 1989.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158–161, ago. 2002.

JUNNILA, A. et al. Efficacy of attractive toxic sugar baits (ATSB) against *Aedes albopictus* with garlic oil encapsulated in beta-cyclodextrin as the active ingredient. **Acta Tropica**, v. 152, p. 195–200, dez. 2015.

KANTOR, A. M. et al. Infection Pattern of Mayaro Virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Transmission Potential of the Virus in Mixed Infections With Chikungunya Virus. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 832–843, 16 abr. 2019.

KAUFFMAN, E. et al. Rearing of *Culex* spp. and *Aedes* spp. Mosquitoes. **Bio-protocol**, v. 7, n. 17, 5 set. 2017.

KERKHOF, K. et al. Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 276–292, 1 abr. 2020.

KILANI-MORAKCHI, S.; MORAKCHI-GOUDJIL, H.; SIFI, K. Azadirachtin-Based Insecticide: Overview, Risk Assessments, and Future Directions. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, 2021.

KIMBARIS, A. C. et al. Coactivity of sulfide ingredients: a new perspective of the larvicidal activity of garlic essential oil against mosquitoes. **Pest Management Science**, v. 65, n. 3, p. 249–254, 1 mar. 2009.

KLIEWER, J. W. Weight and Hatchability of *Aedes aegypti* Eggs (Diptera: Culicidae)1. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, n. 6, p. 912–917, 1 nov. 1961.

KRAEMER, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, p. e08347, jun. 2015.

KROKOVSKY, L. et al. Arbovirus Surveillance in Field-Collected Mosquitoes From Pernambuco-Brazil, During the Triple Dengue, Zika and Chikungunya Outbreak of 2015-2017. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, 2022.

KUADKITKAN, A. et al. Zika virus and microcephaly in Southeast Asia: A cause for concern? **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 1, p. 11–15, 1 jan. 2020.

LANGERAK, T. et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007640, 18 abr. 2019.

LI, Y. et al. A review on the effects of carbon dots in plant systems. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 4, n. 2, p. 437–448, 2020.

- LIU, N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 537–559, 7 jan. 2015.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 55–64, 2014.
- LYBRAND, D. B. et al. How Plants Synthesize Pyrethrins: Safe and Biodegradable Insecticides. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 12, p. 1240–1251, 1 dez. 2020.
- MACIEL-DE-FREITAS, R.; VALLE, D. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 92, n. 9, p. 685–689, 1 set. 2014.
- MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 91–98, 2016.
- MAGALHAES, N. M. G. et al. Combining chemometric and phytochemical tools to isolate and characterize activity of *Vismia gracilis* compounds against *Aedes aegypti*. **Natural Product Research**, 5 fev. 2022.
- MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. S11, 15 mar. 2011.
- MAJEWSKI, M. et al. Fresh garlic juice versus aged garlic extract. Determination of lethal concentration (LC20 and LC50) values on zebrafish (*Danio Rerio*) embryos and larvae. **Journal of Elementology**, v. 22, 1 set. 2017.
- MAJEWSKI, M.; KASICA, N. Influence of fresh garlic (*Allium sativum* L.) juice on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Developmental effects. **Journal of Elementology**, v. 22, 1 abr. 2017.
- MALJKOVIC BERRY, I. et al. **Global Outbreaks and Origins of a Chikungunya Virus Variant Carrying Mutations Which May Increase Fitness for *Aedes aegypti*: Revelations from the 2016 Mandera, Kenya Outbreak** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, , 2019.
- MALLA, R. et al. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide in garlic as novel therapeutic agents to overcome drug resistance in breast cancer. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, p. S2095177921001222, nov. 2021.
- MARCOMBE, S. et al. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 1, p. 118–126, jan. 2011.
- MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41–50, 15 nov. 2016.
- MEDONA, M. R.; NIRMALA, T. Larvicidal Activity of Five Different Plant Extracts against *Aedes Aegypti* (Linn.). **International Journal of Research and Review**, v. 3, n. 1, p. 65–72, jan. 2016.
- MESSINA, J. P. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 1 set. 2019.

MIDGLEY, C. M. et al. Structural analysis of a dengue cross-reactive antibody complexed with envelope domain III reveals the molecular basis of cross-reactivity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 10, p. 4971–4979, 15 maio 2012.

MILESI, P.; POCQUET, N.; LABBÉ, P. **BioRssay: a R script for bioassay analyses**. Milesi P, Pocquet N and Labbé P., 2013. Disponível em: <<http://www.isem.univ-montp2.fr/en/personnel/teams/genomic-adaptation/labbe-pierrick.index/>>

MITRA, S. et al. **Efficacy of Active Ingredients From the EPA 25(B) List in Reducing Attraction of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) to Humans** **JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY** JOURNALS DEPT, 2001 EVANS RD, CARY, NC 27513 USA OXFORD UNIV PRESS INC, , mar. 2020.

MOI, M. L. et al. Zika virus infection and microcephaly in Vietnam. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 805–806, 1 ago. 2017.

MONTERO, A. Chikungunya fever – A new global threat. **Medicina Clínica (English Edition)**, 2016.

MOURA, J. A. S.; SOUZA-SANTOS, L. P. Environmental Risk Assessment (ERA) of Pyriproxyfen in Non-target Aquatic Organisms. **Aquatic Toxicology**, p. 105448, fev. 2020.

MURUGAN, K. et al. Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of Citrus sinensis orange peel extract against Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1757–1769, 1 out. 2012.

MUTURI, E. J. et al. Ovicidal and Larvicidal Effects of Garlic and Asafoetida Essential Oils Against West Nile Virus Vectors. **Journal of insect science (Online)**, v. 18, n. 2, p. 43, 1 mar. 2018.

MUTURI, E. J. et al. **Amylose Inclusion Complexes as Emulsifiers for Garlic and Asafoetida Essential Oils for Mosquito Control** **INSECTS** ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND MDPI, , out. 2019.

NAYAR, J.; ALI, A. A review of monomolecular surface films as larvicides and pupicides of mosquitoes. **JOURNAL OF VECTOR ECOLOGY**, v. 28, n. 2, p. 190–199, dez. 2003.

NGRENNGARMLERT, W. et al. Physical influence on larvicidal and pupicidal activity of the silicone-based monomolecular film. **Acta Tropica**, v. 162, p. 239–244, 1 out. 2016.

NICOLE L. ACHEE et al. Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 2, p. 156–167, 1 jun. 2009.

NORRIS, E. J.; COATS, J. R. Current and Future Repellent Technologies: The Potential of Spatial Repellents and Their Place in Mosquito-Borne Disease Control. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 2, p. 124, 29 jan. 2017.

OECD. **Garlic**. [s.l.] OECD, 2017.

OLAWOYIN, O.; KRIBS, C. Coinfection, Altered Vector Infectivity, and Antibody-

Dependent Enhancement: The Dengue-Zika Interplay. **Bulletin of mathematical biology**, v. 82, n. 1, p. 13–13, 14 jan. 2020.

OLKOWSKI, S. et al. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 6, p. 1026–1033, set. 2013.

PARI, L. et al. Cytoprotective and antioxidant role of diallyl tetrasulfide on cadmium induced renal injury: An in vivo and in vitro study. **Life Sciences**, v. 80, n. 7, p. 650–658, jan. 2007.

PETERSEN, L. R.; BUSCH, M. P. Transfusion-transmitted arboviruses. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 4, p. 495–503, 1 maio 2010.

PILON, A. C. et al. Combination of GC-MS Molecular Networking and Larvicidal Effect against *Aedes aegypti* for the Discovery of Bioactive Substances in Commercial Essential Oils. **Molecules**, v. 27, n. 5, 2022.

POLLETT, S. et al. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, p. 279–295, ago. 2018.

POSSAS, C. et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, 2018.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11–17, 2013.

PRABAKARAN, G. et al. Isolation of a *Pseudomonas fluorescens* metabolite/exotoxin active against both larvae and pupae of vector mosquitoes. **Pest Management Science**, v. 59, n. 1, p. 21–24, 1 jan. 2003.

PRABAKARAN, G. et al. Di-rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* (VCRC B426). **Acta Tropica**, v. 148, p. 24–31, 1 ago. 2015.

RAJAN, T. V. et al. A double-blinded, placebo-controlled trial of garlic as a mosquito repellent: a preliminary study. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 1, p. 84–89, 1 mar. 2005.

RAMAKRISHNAN, V.; CHINTALWAR, G. J.; BANERJI, A. Environmental persistence of diallyl disulfide, an insecticidal principle of garlic and its metabolism in mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. **Chemosphere**, v. 18, n. 7, p. 1525–1529, 1 jan. 1989.

REN, R. et al. Facile and one-step preparation carbon quantum dots from biomass residue and their applications as efficient surfactants. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 627–633, 4 maio 2019.

REZENDE-TEIXEIRA, P. et al. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118983, 1 maio 2022.

RITCHIE, S. A. et al. Field Validation of the Gravid *Aedes* Trap (GAT) for Collection of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 210–219, 1 jan. 2014.

RIVERA, L. et al. Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine

- Candidate (TAK-003). **Clinical Infectious Diseases**, p. ciab864, 4 out. 2021.
- ROSEN, L. et al. **Transovarial Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes: Aedes albopictus and Aedes aegypti** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, , 1983.
- RUEDA, L. M. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. **Zootaxa; Vol 589, No 1: 3 Aug. 2004**, 2004.
- RUSSELL, R. C. et al. Mark-release-recapture study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, n. 4, p. 451–457, dez. 2005.
- SAIDU, N. E. B. et al. Comparison between the effects of diallyl tetrasulfide on human retina pigment epithelial cells (ARPE-19) and HCT116 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5267–5276, nov. 2013.
- SARMA, R. et al. Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9471, 1 jul. 2019.
- SARMA, R. et al. Twenty Essential Oils as Ovicidal Agent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **National Academy Science Letters**, 2020.
- SATOTO, T. B. T. et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti*: An impact from human urbanization? **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0218079, 24 jun. 2019.
- SATYAL, P. et al. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (*Allium sativum*) and Wild Garlic (*Allium vineale*). **Foods**, v. 6, n. 8, 2017.
- SCHRAUF, S. et al. Current Efforts in the Development of Vaccines for the Prevention of Zika and Chikungunya Virus Infections. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 592–592, 9 abr. 2020.
- SCHULTE, H. L. et al. Degradation evaluation and toxicity profile of bilobol, a promising eco-friendly larvicide. **Chemosphere**, v. 263, p. 128323, 1 jan. 2021.
- SHAHRIARI, M. et al. Oral Toxicity of Thymol, α -Pinene, Diallyl Disulfide and Trans-Anethole, and Their Binary Mixtures against *Tribolium castaneum* Herbst Larvae (Coleoptera: Tenebrionidae). **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 3, p. 213–219, set. 2016.
- SHAMSI, T. N. et al. Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. **Acta Ecologica Sinica**, v. 38, n. 5, p. 325–328, 1 out. 2018.
- SILVA, H. H. G. DA; SILVA, I. G. DA. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 349–355, 1999.
- SILVA, R. L. et al. Residual Larvicidal Activity of Quinones against *Aedes aegypti*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 17, p. 3978, 31 ago. 2020a.
- SILVA, R. L. et al. Residual Larvicidal Activity of Quinones against *Aedes aegypti*. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3978, 31 ago. 2020b.

- SILVA, R. L. et al. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Industrial Crops and Products**, v. 178, p. 114568, 1 abr. 2022.
- SILVÉRIO, M. R. et al. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, 2020.
- SOARES-PINHEIRO, V. C. et al. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 396–401, 15 ago. 2016.
- SOUTO, A. L. et al. Plant-Derived Pesticides as an Alternative to Pest Management and Sustainable Agricultural Production: Prospects, Applications and Challenges. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2021.
- STALINSKI, R. et al. Alkaline phosphatases are involved in the response of *Aedes aegypti* larvae to intoxication with *B. acillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry toxins: Alkaline phosphatases in mosquitoes challenged by Bti. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 1022–1036, mar. 2016.
- SUAREZ, G. P. et al. A generic arboviral model framework for exploring trade-offs between vector control and environmental concerns. **Journal of Theoretical Biology**, v. 490, p. 110161, abr. 2020.
- SWALE, D. R. Perspectives on new strategies for the identification and development of insecticide targets. **Special issue: 2018 INSTAR Summit**, v. 161, p. 23–32, 1 nov. 2019.
- TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, maio 2004.
- TAN, H. et al. Unique Dual Functions for Carbon Dots in Emulsion Preparations: Costabilization and Fluorescence Probing. **Langmuir**, v. 31, n. 35, p. 9537–9545, 8 set. 2015.
- THONGWAT, D.; GANRANOO, L.; CHOKCHAISIRI, R. LARVICIDAL AND PUPICIDAL ACTIVITIES OF CRUDE AND FRACTIONATED EXTRACTS OF ACACIA PENNATA (L.) WILLD. SUBSP INSUAVIS SHOOT TIPS AGAINST AEDES AEGYPTI (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). **SOUTHEAST ASIAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH**, v. 48, n. 1, p. 27–36, jan. 2017.
- TJADEN, N. B. et al. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2207, 27 jun. 2013.
- TRUONG, L. et al. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 1089–1093, nov. 2016.
- TUERHONG, M.; XU, Y.; YIN, X.-B. Review on Carbon Dots and Their Applications. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 139–150, 1 jan. 2017.
- VARGAS, H. C. M. et al. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 62, p. 54–60, mar. 2014.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. Em: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Academic Press, 2008. v. 72p. 1–76.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 2–9, 2000.

VERHEIJEN, M. et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4641, dez. 2019.

VILLARREAL, S. M. et al. Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 108, p. 1–9, 1 jul. 2018.

WANG, K. et al. Liquid sulfur as a reagent: synthesis of polysulfanes with 20 or more sulfur atoms with characterization by UPLC-(Ag⁺)-coordination ion spray-MS. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 34, n. 1/2, p. 55–66, abr. 2013.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360–363, ago. 2013.

WHO. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**, 2005. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2016

WHO. **Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM)**, 2012. Disponível em:

<<https://www.who.int/malaria/publications/atoz/gpirm/en/>>

WHO. **ZIKA Epidemiology Update**, 2019. Disponível em:

<<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf?ua=1>>

WHO. **WHO guidelines for the prevention of sexual transmission of Zika virus**, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/prevention-of-sexual-transmission-of-zika-virus>>

WHO. **Dengue and severe dengue**, jan. 2022. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 8 out. 2020

WHO. **Dengue Control strategies**, [s.d.]. Disponível em:

<http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/en/>. Acesso em: 7 out. 2020a

WHO. **Environmental management for dengue control**, [s.d.]. Disponível em:

<http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/environmental_management/en/>. Acesso em: 23 fev. 2016b

WIEGMANN, B. M. et al. Episodic radiations in the fly tree of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5690, 5 abr. 2011.

WONG, J. et al. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, p. e1015–e1015, 12 abr. 2011.

WU, C. C. et al. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. **Food and Chemical**

Toxicology, v. 39, n. 6, p. 563–569, 1 jun. 2001.

WU, C.-C. et al. Differential Effects of Garlic Oil and Its Three Major Organosulfur Components on the Hepatic Detoxification System in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 378–383, 1 jan. 2002.

XAVIER, V. et al. Impact of Botanical Insecticides on Indigenous Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 56, p. 1–13, 1 jan. 2010.

XAVIER, V. M. et al. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Botanical Insecticides to Honey Bees. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 137, 1 jan. 2015.

YANG, H. M. et al. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 8, p. 1188–1202, ago. 2009.

ZHANG, Y. et al. Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109730, 1 mar. 2020.

ZHAO, S. et al. Green Synthesis of Bifunctional Fluorescent Carbon Dots from Garlic for Cellular Imaging and Free Radical Scavenging. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 31, p. 17054–17060, 12 ago. 2015.

ZHOU, L.; CHEN, X.; ZHENG, T. Study on the ecological safety of algacides: a comprehensive strategy for their screening. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 6, p. 803–811, 1 dez. 2010.

ANEXO



Relatório de Análises 2599/2022.0.TXI

Determinação de Toxicidade Oral Aguda
Proposta Comercial: PC5336/2021.1

Data de Publicação: 01/04/2022 14:31

| Identificação Conta | |
|--|------------------------------|
| Cliente: Universidade de Brasília | CNPJ/CPF: 00.038.174/0001-43 |
| Contato: Renata Dusi | Telefone: - |
| Endereço: Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Brasília - Distrito Federal - CEP: 70910-900 - Brazil | |

| Nº Amostra: 2599-1/2022.0 - ARBO2B101 | |
|--|---------------------------------------|
| Tipo de Amostra: Desinfestante - Registro | |
| Data Recebimento: 27/01/2022 17:14 | |
| Composição Química: (%) óleo de alho: 9,5; Tween 80: 9,5; nanopêras de carbono: 9,5; água: 71,5. | Lote: 220113HTF |
| Data de Fabricação: 13/01/2021 | Data de Validade: 6 MESES |
| Quantidade de Amostra: 218 G | Quantidade de Embalagens Recebidas: 2 |
| Responsabilidade da Amostragem: Contratante | |

| Classificação de risco toxicológico agudo segundo o GHS (Globally Harmonised Classification System - OECD). | | | | | |
|---|-----------|--------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| Dose Letal Média (DL ₅₀) | ≤ 5 mg/Kg | Entre 5 - 50 mg/Kg | Entre 50 - 300 mg/Kg | Entre 300 - 2000 mg/Kg | ≥ 2000 mg/Kg |
| Classe Toxicológica | I | II | III | IV | V |
| Legendas: DL ₅₀ – Dose Letal Média / OECD – Organization for Economic Co-operation and Development | | | | | |

| Resultados Analíticos | | | | |
|---|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Toxicologia I | | | | |
| Análise | Resultado | Método de Análise | Data Início | Data de Término |
| Determinação de Toxicidade Oral Aguda | Dose Letal ≥ 2000 mg/Kg | OECD 420:2002 | 09/02/2022 15:18 | 28/02/2022 15:09 |
| Notas | | | | |
| <p>Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados. É proibida a reprodução parcial deste relatório e a reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer. A autenticidade deste relatório pode ser validada acessando o site: https://portal.mvlimsweb.com. Ao clicar na opção "Validar documento", serão solicitados: número da amostra, ano e os 6 últimos dígitos da chave de validação encontrada no final do relatório.</p> <p>Legendas: NA: Não se aplica. LQ: Limite de Quantificação. :</p> | | | | |

Relatório de Análises 2599/2022.0.TXI

Determinação de Toxicidade Oral Aguda

Proposta Comercial: PC5336/2021.1

Conclusão

INFORMAÇÕES DE PREPARO

Diluição: Puro / Dose: 2.000 / Concentração: 1.000

SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS

Nada digno de nota.

CONCLUSÕES

A substância teste apresentou Dose Letal Média (DL50), para ratos brancos, maior que 2000 mg/kg de peso vivo, quando administrada nas condições experimentais selecionadas (diluição, dose e concentração) o que permite classificar a substância teste na classe toxicológica V.



Renato Festrants Xavier
Analista Responsável CRMV-SP
14226



Tuany Miranda
Gerente Técnico CRF – SP: 72264

Chave de Validação: 0f69830c973342d4b06745392aced7b6

Relatório de Análises 2599/2022.0.TXII

Teste in Vitro de Curta Duração para Danos Oculares

Proposta Comercial: PC5336/2021.1

Data de Publicação: 01/04/2022 14:31

| Identificação Conta | |
|--|------------------------------|
| Cliente: Universidade de Brasília | CNPJ/CPF: 00.038.174/0001-43 |
| Contato: Renata Dusi | Telefone: - |
| Endereço: Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Brasília - Distrito Federal - CEP: 70910-900 - Brazil | |

| Nº Amostra: 2599-1/2022.0 - ARBO2B101 | |
|--|---------------------------------------|
| Tipo de Amostra: Desinfestante - Registro | |
| Data Recebimento: 27/01/2022 17:14 | |
| Composição Química: (%) óleo de alho: 9,5; Tween 80: 9,5; nanoesferas de carbono: 9,5; água: 71,5. | Lote: 220113HTF |
| Data de Fabricação: 13/01/2021 | Data de Validade: 6 MESES |
| Quantidade de Amostra: 218 G | Quantidade de Embalagens Recebidas: 2 |
| Responsabilidade da Amostragem: Contratante | |

Metodologia Utilizada

O método de teste de exposição a curto prazo (Short Time Exposure/STE, em inglês) é um método *in vitro* baseado em citotoxicidade, onde utiliza-se uma monocamada confluyente de células Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC), cultivadas em uma microplaca depolicarbonato de 96 poços. Após cinco minutos de exposição da cultura com uma substância teste. A citotoxicidade é medida quantitativamente através da verificação da viabilidade relativa das células SIRC, usando o ensaio MTT. A viabilidade celular diminuída é usada para prever potenciais efeitos adversos que levam a danos oculares.

METODOLOGIA

OECD, Guideline for Testing of Chemicals, Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Section 4: Health Effects, 491, 2020.

INTERPRETAÇÕES

O estudo é utilizado para a classificação e rotulagem de substâncias que induzem danos oculares graves, bem como aquelas que não necessitam de classificação para danos oculares graves ou irritação ocular, conforme definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS) das Nações Unidas (ONU).

A viabilidade celular do Item de Teste é comparada com o controle, utilizado para estimar o risco potencial do Item de Teste para os olhos.

Após condução do teste a substância teste é classificada quanto à célula a seguir:

| Viabilidade Celular | | Classificação UN GHS |
|---------------------|---------|----------------------|
| A 5% | A 0,05% | |
| > 70% | > 70% | Sem Categoria |
| ≤ 70% | > 70% | Sem Previsão |
| ≤ 70% | ≤ 70% | Categoria 1 |

Resultados Analíticos

| Toxicologia II | | | | |
|---|---------------|-------------------|------------------|------------------|
| Análise | Resultado | Método de Análise | Data Início | Data de Término |
| Teste in Vitro de Curta Duração para Danos Oculares | Sem Categoria | OECD 491 | 01/03/2022 08:52 | 01/04/2022 12:25 |

Notas

Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.

É proibida a reprodução parcial deste relatório e a reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.

A autenticidade deste relatório pode ser validada acessando o site: <https://portal.mylimsweb.com>. Ao clicar na opção "Validar documento", serão solicitados: número da amostra, ano e os 6 últimos dígitos da chave de validação encontrada no final do relatório.

Legendas:

NA: Não se aplica.

LQ: Limite de Quantificação.

:

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO RELATÓRIO

ITEM DE TESTE

O Item de Teste foi pré-diluído na proporção de 0,5 mL/Litro em água (conforme preconizado pelo patrocinador), e foi avaliada nas concentrações de 5% e 0,05% em solvente NaCl 0,9%.

RESULTADOS

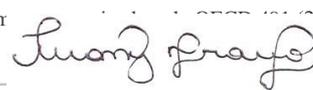
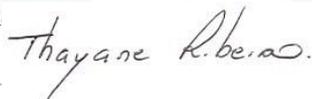
A densidade óptica do controle negativo (NaCl 0,9%) foi superior a 0,3 e a viabilidade do controle positivo (SDS 0,01%) foi entre 22,38% e 26,44%. Os dados de viabilidade celular foram analisados a partir de três repetições independentes, cada uma contendo três poços de replicata.

Tabela 1. Viabilidade celular (%) do Item de Teste pelo método STE (OECD 491, 2020).

| ITEM DE TESTE | MÉDIA 3 REPETIÇÕES |
|---------------|--------------------|
| 0,05% | 85,09 |
| 5% | 78,15 |

CONCLUSÃO

O Item de Teste não é classificada como Sem categoria, conforme o método STE (OECD 491, 2020).



Thayane Ribeiro

Analista Responsável
CrBio 97139/01-D

Tuany Miranda

Gerente Técnico
CRF - SP: 72264

Chave de Validação: 0f69830c973342d4b06745392aced7b6

| Identificação Conta | |
|---|-------------------------------------|
| Cliente: Universidade de Brasília | CNPJ/CPF: 00.038.174/0001-43 |
| Contato: Renata Dusi | Telefone: - |
| Endereço: Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde. Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Brasília - Distrito Federal - CEP: 70910-900 - Brazil | |

| Nº Amostra: 2599-1/2022.0 - ARBO2B101 | |
|---|--|
| Tipo de Amostra: Desinfestante - Registro | |
| Data Recebimento: 27/01/2022 17:14 | |
| Composição Química: (%) óleo de alho: 9,5; Tween 80: 9,5; nanoesferas de carbono: 9,5; água: 71,5. | Lote: 220113HTF |
| Data de Fabricação: 13/01/2021 | Data de Validade: 6 MESES |
| Quantidade de Amostra: 218 G | Quantidade de Embalagens Recebidas: 2 |
| Responsabilidade da Amostragem: Contratante | |

| Metodologia Utilizada | | | | | |
|--|-----------|--------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| <p>O experimento de Toxicidade Dermal Aguda para ratos é conduzido para estudar os possíveis efeitos tóxicos da substância teste. São utilizados ratos albinos (<i>Rattus norvegicus</i>) fêmeas nulas e não prenhas, da ceia Wistar, adultas com idade entre 8 a 10 semanas no início do experimento. Os animais são aclimatados às condições do laboratório pelo menos 5 dias antes do início do experimento. A dieta é constituída de ração comercial, com suplementação de água filtrada, ambos fornecidos à vontade. Os animais são distribuídos inteiramente ao acaso em caixas de polipropileno, cobertas por grade metálica e forradas com maravalha de madeira, com número máximo de 5 animais por caixa. Os animais são pesados individualmente, e então após os cálculos para se determinar as doses utilizadas, A substância teste é administrada, por via dermal em dose única, em uma das seguintes doses: 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg de PV (peso vivo). No estudo de observação, os animais são observados quanto ao tempo em que venham a óbito, alterações comportamentais, sinais clínicos e achados anatomopatológicos macroscópicos. O estudo definitivo é realizado na dose a partir dos resultados do estudo de observação. Os animais são observados diariamente e avaliados clinicamente quanto aos sinais clínicos sistêmicos e alterações de comportamento, durante 14 dias após a aplicação da substância teste, sendo anotados o início, grau e duração dos sintomas e ao final do experimento a substância teste é classificada em sua classe toxicológica conforme a tabela a seguir:</p> | | | | | |
| Classificação de risco toxicológico agudo segundo o GHS (Globally Harmonised Classification System - OECD). | | | | | |
| Dose Letal Média (DL ₅₀) | ≤ 5 mg/Kg | Entre 5 - 50 mg/Kg | Entre 50 - 300 mg/Kg | Entre 300 - 2000 mg/Kg | ≥ 2000 mg/Kg |
| Classe Toxicológica | I | II | III | IV | V |
| Legendas: DL ₅₀ – Dose Letal Média / OECD – Organization for Economic Co-operation and Development | | | | | |

| Resultados Analíticos | | | | |
|--|-------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|
| Toxicologia I | | | | |
| Análise | Resultado | Método de Análise | Data Início | Data de Término |
| Determinação da Toxicidade Cutânea Aguda | Dose Letal ≥ 2000 mg/Kg | Acute Dermal Toxicity - OECD402:2017 | 08/02/2022 13:59 | 28/02/2022 15:08 |
| Notas | | | | |
| <p>Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados. É proibida a reprodução parcial deste relatório e a reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer. A autenticidade deste relatório pode ser validada acessando o site: https://portal.mylimsweb.com. Ao clicar na opção "Validar documento", serão solicitados: número da amostra, ano e os 6 últimos dígitos da chave de validação encontrada no final do relatório.</p> <p>Legendas: NA: Não se aplica. LQ: Limite de Quantificação. :</p> | | | | |

| Conclusão |
|--|
| <p>INFORMAÇÕES DE PREPARO Diluição: Pura / Dose: 2.000/ Concentração: 1.000</p> <p>SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS Nada digno de nota.</p> <p>CONCLUSÕES A substância teste apresentou Dose Letal Média (DL₅₀), para ratos brancos, maior que 2000 mg/kg de peso vivo, quando administrada nas condições experimentais selecionadas (diluição, dose e concentração) o que permite classificar a substância teste na classe toxicológica V.</p> |

Relatório de Análises 2599/2022.0.TXI

Determinação da Toxicidade Cutânea Aguda
Proposta Comercial: PC5336/2021.1

**Renato Festrats Xavier**

Analista Responsável
CRMV-SP 14226

Tuany Miranda

Gerente Técnico
CRF - SP: 72264

Chave de Validação: 0f69830c973342d4b06745392aced7b6

Data de Publicação: 01/04/2022 14:31

| Identificação Conta | |
|--|------------------------------|
| Cliente: Universidade de Brasília | CNPJ/CPF: 00.038.174/0001-43 |
| Contato: Renata Dusi | Telefone: - |
| Endereço: Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde. Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Brasília - Distrito Federal - CEP: 70910-900 - Brazil | |

| Nº Amostra: 2599-1/2022.0 - ARBO2B101 | |
|--|---------------------------------------|
| Tipo de Amostra: Desinfestante - Registro | |
| Data Recebimento: 27/01/2022 17:14 | |
| Composição Química: (%) óleo de alho: 9,5; Tween 80: 9,5; nanoesferas de carbono: 9,5; água: 71,5. | Lote: 220113HTF |
| Data de Fabricação: 13/01/2021 | Data de Validade: 6 MESES |
| Quantidade de Amostra: 218 G | Quantidade de Embalagens Recebidas: 2 |
| Responsabilidade da Amostragem: Contratante | |

| Metodologia Utilizada |
|---|
| <p>RESUMO</p> <p>O ensaio do linfonodo local murino (LLNA) foi desenvolvido como uma alternativa aos testes de Buhler e Maximização. O teste é utilizado com o objetivo de identificar substâncias capazes de induzir dermatite de contato e tem como desfecho a quantificação celular nos linfonodos auriculares. O método BRDU-ELISA é baseado no uso da medição do conteúdo de BrdU no aumento do número de células em proliferação nos gânglios linfáticos auriculares drenantes. BrdU é um análogo da timidina e é similarmente incorporado ao DNA das células em proliferação. A incorporação de BrdU é medida pelo ELISA, que utiliza um anticorpo específico para BrdU, que também é marcado com peroxidase.</p> <p>São utilizados camundongos (<i>Mus musculus</i>) fêmeas, da linhagem CBA/J, jovens adultos, com idade entre 8 e 10 semanas. Dia 1: aplicação tópica de 25 µL no dorso de cada orelha; Dia 2: mesmo procedimento do dia 1; Dia 3: mesmo procedimento do dia 1; Dia 4: sem tratamento; Dia 5: aplicação de 0,5 mL (5 mg/animal) da solução de BrdU (10 mg/mL) por via intraperitoneal; Dia 6: pesagem dos animais, sinais clínicos, eutanásia e retirada dos linfonodos auriculares. Dois linfonodos de cada animal são desagregados mecanicamente em PBS para obtenção de uma suspensão celular. A suspensão resultante é filtrada e contada em câmara de Neubauer. São adicionadas em uma microplaca de 96 poços e a absorbância é medida em 370 nm o comprimento de onda de emissão e 492 nm o comprimento de onda de referência. O índice de ligação de BrdU do controle negativo deve apresentar absorbância entre 0,1 e 0,2. O SI do controle positivo deve ser no mínimo 1,6 vezes maior que o negativo ($SI \geq 1,6$).</p> <p>METODOLOGIA</p> <p>OECD, Guideline For Testing of Chemicals, Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM. Appendix IA: In Vivo Skin Sensitisation: The Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. Section 4: Health Effects, 442B, 2018.</p> <p>INTERPRETAÇÕES</p> <p>$SI \geq 1,6$ = Sensibilizante (positivo) $SI < 1,6$ = Não sensibilizante (negativo)</p> |

| Resultados Analíticos | | | | |
|--|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Toxicologia II | | | | |
| Análise | Resultado | Método de Análise | Data Início | Data de Término |
| Sensibilização Dérmica (LLNA) | Não Sensibilizante | OECD 442B | 17/03/2022 17:09 | 28/03/2022 15:53 |
| Notas | | | | |
| <p>Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.</p> <p>É proibida a reprodução parcial deste relatório e a reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.</p> <p>A autenticidade deste relatório pode ser validada acessando o site: https://portal.mylimsweb.com. Ao clicar na opção "Validar documento", serão solicitados: número da amostra, ano e os 6 últimos dígitos da chave de validação encontrada no final do relatório.</p> <p>Legendas: NA: Não se aplica. LQ: Limite de Quantificação. :</p> | | | | |

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO RELATÓRIO

ITEM DE TESTE

Na concentração de 100% do item de teste foi aplicado puro. Na demais concentrações do item de teste foi utilizado como veículo AOO (Acetona:Azeite de Oliva 4:1) na proporção de 50% e 25%.

Os resultados obtidos no estudo estão apresentados na tabela a seguir:

| | Concentração(%) | Resposta Linfoproliferativa | |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------|
| | | Índice MarcaçãoBRDU | Índice Estimulação(SI) |
| Item de teste | 100 | 1,617 | 1,4 |
| | 50 | 1,500 | 1,3 |
| | 25 | 1,390 | 1,2 |
| Controle Positivo | 25* | 2,022 | 1,7 |
| Controle Negativo | 100 | 1,189 | 1,00 |

Valor de EC_{1,6}: Não calculável

*25% de HCA em AOO.

Não foi necessário a realização do teste de solubilidade uma vez que a solubilidade do item de teste foi em AOO. Foram observados sinais clínicos, como tremor, nas primeiras 48 horas, do grupo do item de teste 100% e no grupo controle positivo. Nos demais grupos, não foram observados sinais clínicos relacionados à toxicidade do item de teste até 50%.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados apresentados, conclui-se que o item de teste não induziu sensibilização por contato para camundongos no Ensaio do Nódulo Linfático Local (LLNA) pela técnica de BRDU-ELISA.

Thayane Ribeiro

Analista Responsável
CrBio 97139/01-D

Tuany Miranda

Gerente Técnico
CRF - SP: 72264

Chave de Validação: 0f69830c973342d4b06745392aced7b6

Data de Publicação: 01/04/2022 14:31

| Identificação Conta | |
|--|------------------------------|
| Cliente: Universidade de Brasília | CNPJ/CPF: 00.038.174/0001-43 |
| Contato: Renata Dusi | Telefone: - |
| Endereço: Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde. Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Brasília - Distrito Federal - CEP: 70910-900 - Brazil | |

| Nº Amostra: 2599-1/2022.0 - ARBO2B101 | |
|--|---------------------------------------|
| Tipo de Amostra: Desinfestante - Registro | |
| Data Recebimento: 27/01/2022 17:14 | |
| Composição Química: (%) óleo de alho: 9,5; Tween 80: 9,5; nanoesferas de carbono: 9,5; água: 71,5. | Lote: 220113HTF |
| Data de Fabricação: 13/01/2021 | Data de Validade: 6 MESES |
| Quantidade de Amostra: 218 G | Quantidade de Embalagens Recebidas: 2 |
| Responsabilidade da Amostragem: Contratante | Metodologia Utilizada |

O estudo de irritação é realizado usando produtos químicos de proficiência recomendados nas diretrizes de teste da OCDE 439. Osteócitos de RHE são expostos topicamente a substância teste, à temperatura ambiente. Os tecidos de RHE são então enxaguados 25 vezes, com 1 mL cada, de PBS estéril sem cálcio e magnésio. Os tecidos tratados são incubados durante 42 horas a 37°C, 5% de CO₂. Cada substância é testada em triplicada. Após a subtração da DO em branco de todos os dados brutos, os valores médios de DO foram calculados utilizando nove medições por substância (três tecidos com RHE, três repetições/tecido) e a porcentagem de viabilidade celular foi expressa relativamente ao controle negativo da seguinte maneira: 100 x DOTRATADA média/DOCONTROLE média. O valor de controle negativo foi definido em 100%. SDS 5% é usado como referência irritante (controle positivo) e PBS (sem Ca⁺⁺ eMg⁺⁺) como controle negativo (CN). O valor de DP é considerado válido se for ≤ 18%. Os dados de controle positivo atendem aos critérios de aceitação se a viabilidade média, expressa em % do CN, for < 40% e o valor do desvio padrão (DP) for ≤ 18%. Uma substância é considerada não irritante quando a viabilidade estiver acima de 50% em relação ao controle, e é considerada irritante quando a viabilidade estiver abaixo de 50% em relação ao controle.

METODOLOGIA

OECD, Guideline for Testing of Chemicals, In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Section 4: Health Effects, 439, 2020.

INTERPRETAÇÕES

| Classificação | Resultado |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Média Viabilidade celular ≤ 50% | Categoria 2, Irritante (I) |
| Média Viabilidade celular > 50% | Nenhuma Categoria, Não Irritante (NI) |

Resultados Analíticos

Toxicologia II

| Análise | Resultado | Método de Análise | Data Início | Data de Término |
|------------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Irritação Dérmica "in vitro" | Nenhuma Categoria, Não Irritante (NI) | OECD 439 | 16/02/2022 09:56 | 22/02/2022 19:32 |

Notas

Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.

É proibida a reprodução parcial deste relatório e a reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolyzer.

A autenticidade deste relatório pode ser validada acessando o site: <https://portal.mylimsweb.com>. Ao clicar na opção "Validar documento", serão solicitados: número da amostra, ano e os 6 últimos dígitos da chave de validação encontrada no final do relatório.

Legendas:

NA: Não se aplica.

LQ: Limite de Quantificação.

:

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO RELATÓRIO

ITEM DE TESTE

O Item de Teste foi aplicado diluído na proporção de 0,5mL / Litro em água (conforme orientação do patrocinador)..

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Coloração:

Item de Teste: coloração arroxeadada. Controle

Negativo: coloração arroxeadada. Controle Positivo:
sem coloração.

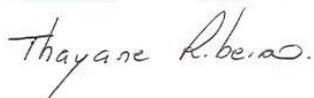
Controle Branco coloração arroxeadada.

Tabela 01. Percentagem média de viabilidade do tecido

| PERCENTAGEM MÉDIA DEVIABILIDADE DO TECIDO | |
|---|------------|
| ITEM DE TESTE | 82,71 % |
| CONTROLE NEGATIVO | 100 % |
| CONTROLE POSITIVO | 3,13 % |

CONCLUSÃO

O item de teste apresentou com coloração arroxeadada, com média de viabilidade tecidual > 50%, podendo ser classificada como Nenhuma Categoria, Não Irritante (NI).



Thayane Ribeiro

Analista Responsável
CrBio 97139/01-D



Tuany Miranda

Gerente Técnico
CRF – SP: 72264

Chave de Validação: 0f69830c973342d4b06745392aced7b6

Data de Publicação: 01/04/2022 14:31

| Identificação Conta | |
|--|------------------------------|
| Cliente: Universidade de Brasília | CNPJ/CPF: 00.038.174/0001-43 |
| Contato: Renata Dusi | Telefone: - |
| Endereço: Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde. Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte - Brasília - Distrito Federal - CEP: 70910-900 - Brazil | |

| Nº Amostra: 2599-1/2022.0 - ARBO2B101 | |
|--|---------------------------------------|
| Tipo de Amostra: Desinfestante - Registro | |
| Data Recebimento: 27/01/2022 17:14 | |
| Composição Química: (%) óleo de alho: 9,5; Tween 80: 9,5; nanoesferas de carbono: 9,5; água: 71,5. | Lote: 220113HTF |
| Data de Fabricação: 13/01/2021 | Data de Validade: 6 MESES |
| Quantidade de Amostra: 218 G | Quantidade de Embalagens Recebidas: 2 |
| Responsabilidade da Amostragem: Contratante | |

Metodologia Utilizada

O estudo de corrosão foi feito usando produtos químicos de proficiência recomendados nas diretrizes de teste da OCDE 431. É testado item de teste, o Fenol como referência corrosiva (controle positivo) e DPBS (sem Ca++ e Mg++) como controle negativo (CN). O item de teste é aplicada topicamente a um modelo tridimensional de RHE, constituído por queratinócitos epidérmicos não transformados, derivados de humanos, que foram cultivados para formar um modelo altamente diferenciado da epiderme humana em multicamadas. Consiste de camadas basais, espinhosas e granulares organizadas e de um estrato córneo multicamadas, contendo camadas lipídicas intercelulares lamelares, representando as principais classes de lipídios análogas às encontradas in vivo. O método de teste de RHE baseia-se na premissa de que substâncias químicas corrosivas são capazes de penetrar no estrato córneo por difusão ou erosão e são citotóxicas para as células nas camadas subjacentes. A viabilidade celular é medida por conversão enzimática do corante vital MTT brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, num sal de azul de formazan que é quantitativamente medido após extração de tecidos. Os valores de OD obtidos com cada produto químico de ensaio é utilizado para calcular a percentagem de viabilidade normalizada para o controle negativo, que é ajustado para 100%.

METODOLOGIA

OECD, Guideline for Testing of Chemicals, In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Section 4: Health Effects, 431, 2019.

INTERPRETAÇÕES

A classificação da corrosão é realizada de acordo com tabela a seguir:

| CLASSIFICAÇÃO | RESULTADO |
|---|---|
| Corrosivo: Subcategoria opcional 1A | Viabilidade tecidual média < 50% após 3 minutos de exposição |
| Corrosivo: Combinação opcional de subcategorias 1B e 1C | Viabilidade tecidual média ≥ 50% após 3 min de exposição E < 15% após 60 minutos de exposição |
| Não corrosivo | Viabilidade tecidual média ≥ 50% após 3 min de exposição e ≥ 15% após 60 min de exposição |

Resultados Analíticos

| Toxicologia II | | | | |
|-----------------------------|---------------|-------------------|------------------|------------------|
| Análise | Resultado | Método de Análise | Data Início | Data de Término |
| Corrosão Dérmica "in vitro" | Não corrosivo | OECD 431 | 16/02/2022 09:44 | 22/02/2022 18:22 |

Notas

Os resultados referem-se única e exclusivamente aos itens ensaiados.

É proibida a reprodução parcial deste relatório e a reprodução em partes requer aprovação por escrito da Ecolzyer.

A autenticidade deste relatório pode ser validada acessando o site: <https://portal.mylimsweb.com>. Ao clicar na opção "Validar documento", serão solicitados: número da amostra, ano e os 6 últimos dígitos da chave de validação encontrada no final do relatório.

Legendas:

NA: Não se aplica.

LQ: Limite de Quantificação.

:

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO RELATÓRIO

ITEM DE TESTE

O item de teste foi aplicado puro.

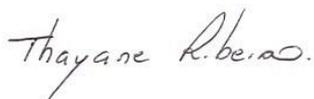
RESULTADOS

Tabela 2. Percentagem média de viabilidade do tecido

CONCLUSÃO

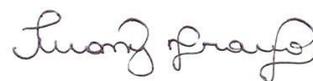
O item de teste este apresentou média viabilidade tecidual $\geq 50\%$ após 3 minutos de exposição E $\geq 15\%$ após 60 minutos de exposição, podendo ser classificada como Não corrosivo.

| PERCENTAGEM MÉDIA DE VIABILIDADE DO TECIDO | 3' | 60' |
|---|---------|---------|
| ITEM DE TESTE | 109,43% | 101,36% |
| CONTROLE NEGATIVO | 100% | 100% |
| CONTROLE POSITIVO | 12,18% | 13,07% |



Thayane Ribeiro

Analista Responsável CrBio 97139/01-D



Tuany Miranda

