



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

PATRICIA ALEXANDRIA PAIVA SILVA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO LIOFILIZADO DE
AGAVE SISALANA NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSETICIDA PARA O
AEDES AEGYPTI.**

**João Pessoa
2017**

PATRICIA ALEXANDRIA PAIVA SILVA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO LIOFILIZADO DE
AGAVE SISALANA NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOINSETICIDA PARA O
AEDES AEGYPTI.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à disciplina de conclusão de curso do Centro
de Biotecnologia na Universidade Federal da
Paraíba, como requisito para obtenção do
Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola da Cruz
Nunes

João Pessoa
2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725a Sousa, Patricia Alexandria Paiva Silva de.
Avaliação da atividade inseticida do extrato
liofilizado de Agave sisalana no desenvolvimento de um
bioinseticida para o Aedes aegypti / Patricia
Alexandria Paiva Silva de Sousa. - João Pessoa, 2017.
40 f.

Orientação: Fabíola da Cruz Nunes.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Aedes aegypti. 2. Agave sisalana. 3. Bioinseticida.
I. Nunes, Fabíola da Cruz. II. Título.

UFPB/BC



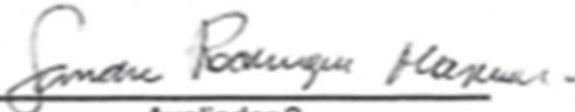
ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e dois dias do mês de novembro de 2017, às 10:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Fabíola da Cruz Nunes e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga (CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Sandra Rodrigues Mascarenhas (CBIOTEC/UFPB), a discente Patrícia Alexandria Paiva Silva de Sousa, matrícula 11225046, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Desenvolvimento de bioinseticida a partir do extrato liofilizado *Agave sisalana* contra o *Aedes aegypti***, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Fabíola da Cruz Nunes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.


Presidente da Banca Examinadora


Avaliador 1


Discente


Avaliador 2

Dedico em memória de Severino Martins de Sousa, meu avô e amigo, o maior símbolo de alegria e liderança da minha vida e em memória de Maria Helena Alexandria, minha irmã e uma das maiores referências de fé e perseverança que eu tive a honra de conviver.

AGRADECIMENTOS

Meu maior e mais sincero agradecimento a Deus. Inúmeras vezes eu quis desistir e tudo parecia um fardo, mas Deus sempre esteve ao meu lado, sempre se mostrou presente me dando forças pra continuar, e todos os que fizeram parte dessa história, que eu agora estou finalizando, são a prova do amor de Deus por mim, são os motivos pelos quais eu não desisti, pois me ajudaram a carregar os meus problemas e tornar os meus dias mais agradáveis.

“Tú Senhor, mantém acesa a minha lâmpada; O meu Deus transforma em luz as minhas trevas; Com o teu auxílio posso atacar uma tropa; Com o meu Deus posso transpor muralhas. Este é o Deus cujo caminho é perfeito.” Salmos 18: 28-30

Aos meus Pais Edvam Silva e Eliete Alexandria, por esse amor infinito e inesgotável, por todo o investimento e por sempre acreditarem em mim. A minha irmã Pamela Alexandria por todo amor, por estar sempre ao meu lado e por acreditar que tudo daria certo. A minha família que sempre me apoiaram e se fizeram presentes de alguma forma, em especial aos meus avós que são referências em minha vida.

Aos meus amigos, que sempre acreditaram em mim, muitas vezes mais do que eu mesma, por me aguentarem nas minhas crises existenciais e me fazerem enxergar sempre o melhor lado da vida, por me darem abrigo e colo quando foi preciso, obrigado por todas as risadas e por todas as lágrimas compartilhadas. Em especial gostaria de agradecer aos maiores presentes que a graduação me deu, mais que amigas verdadeiros presentes de Deus, Déborah Joanny, Louise Helena Guimarães e Renata Travassos, vocês fizeram de mim alguém melhor e isso e nunca terei como agradecer.

Agradeço a minha orientadora Fabiola da Cruz Nunes, por ter dividido comigo todo o seu conhecimento, por ter estado presente durante toda a minha graduação nos momentos em que mais precisei, fazendo muitas vezes o papel de terapeuta e amiga, sendo uma referência como profissional, mãe e mulher.

A banca examinadora Professora Sandra Mascarenhas e Professor Valdir Braga, por aceitarem o convite e por me presentear com seu conhecimento.

A todos que compõe ou que um dia fizeram parte da equipe Lapavet por terem me ajudado a concluir este trabalho e pela troca de experiências,

Agradeço a UFPB, a todos os Professores e funcionários ligados ao Curso de biotecnologia pelo empenho em tornarem os alunos grandes profissionais, por zelarem por nossa educação e por toda troca de experiência.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma pra concretização desse etapa importante da minha vida.

Descobri que não há nada melhor para o homem do que ser feliz e praticar o bem enquanto vive. Descobri também que poder comer, beber e ser recompensado pelo seu trabalho são presentes de Deus. Sei que tudo o que Deus faz permanecerá para sempre; a isso nada se pode acrescentar, e disso nada se pode tirar.

Eclesiastes 3:11-14

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de diversas doenças virais que acometem a população brasileira, tais como dengue, febre amarela, febre chikungunya e zika. Os vírus são transmitidos pela picada da fêmea do mosquito *Ae. aegypti*, adaptado e disseminado em quase todo território nacional provocando o aumento da transmissão das doenças, e epidemias, em algumas regiões mais infestadas, se tornando um problema de saúde pública. O controle dessas doenças tem o mosquito vetor como alvo principal e é feito pelos órgãos de saúde pública por meio de estratégias, que vão desde o combate às formas larvares até o mosquito adulto, principalmente através do uso de inseticidas, em conjunto a campanhas de educação popular. Com o surgimento de resistência dos mosquitos, surge à necessidade de descobrir novos inseticidas para o combate ao *Ae. aegypti*. Pesquisas prévias realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores, da Universidade Federal da Paraíba, comprovaram a atividade larvicida do extrato bruto da *Agave sisalana* contra o *Ae. aegypti*. O presente estudo teve como objetivo estudar a atividade inseticida do extrato liofilizado de *Agave sisalana* em ovos e larvas (L3) e pupas e adultos de *A. aegypti*. Como metodologia, nos ensaios de atividade ovicida, utilizou-se discos de papel filtro contendo 30 ovos, imersos em solução do extrato de *A. sisalana* liofilizado diluído em água (0,5 -1,0 mg/mL) ,observados durante 5 dias. Nos ensaios de atividade larvicida, utilizou-se 20 larvas de terceiro estágio, expostas a diferentes concentrações do extrato liofilizado de *A. sisalana* (0,2 - 1,0 mg/mL) e a mortalidade foi verificada após 24 horas. Nos ensaios de atividade pupicida, utilizou-se 10 pupas, expostas a concentração de 10 mg/mL do extrato liofilizado de *A. sisalana*) e a mortalidade foi verificada após 24 horas. A atividade adulticida foi verificada por meio dos testes de contato corporal e tarsal, além do teste da alimentação, utilizando-se a concentração de 10 mg/mL e a mortalidade foi verificada diariamente durante 5 dias. Os resultados do nosso estudo mostraram que a concentração de 10 mg/mL foi capaz de suprimir a eclosão de ovos de *Ae. aegypti*, a concentração de 0,8 mg/mL do extrato liofilizado foi capaz de matar 100% das larvas do *Aedes aegypti*, a concentração testada não foi capaz de causar mortalidade em pupas, a concentração de 10 mg/mL foi capaz de causar 100% de mortalidade em mosquitos de *Ae. aegypti* nos testes de contato tarsal e corporal, sendo este último num menor espaço de tempo. Os resultados confirmam que o extrato liofilizado de *A. sisalana* tem efeito inseticida se mostrando uma alternativa eficiente, resguardando a sua capacidade inseticida após o processo de liofilização.

Palavras chaves: Mosquito, Inseticida, Produtos Naturais, Sisal

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the primary vector of several viral diseases affecting the Brazilian population, such as dengue, yellow fever, chikungunya fever and zika. The viruses are transmitted by the bite of female mosquito *Ae. aegypti*, adapted and disseminated in most of the country leading to increased transmission of diseases and epidemics in some more infested regions, becoming a public health problem. The control of these diseases have the mosquito vector as the main target and is made by the public health agency through strategies, ranging from the fight against larval to adult mosquito, primarily through the use of insecticides together education campaigns popular. With the mosquitoes of the emergence of resistance, arises the need to find new insecticides to combat *Ae. aegypti*. Previous research conducted in Applied Biotechnology Laboratory Parasites and Vectors, of the Federal University of Paraíba, proved the larvicidal activity of the crude extract of *Agave sisalana* against *Ae. aegypti*. This study aimed to study the insecticide lyophilized extract activity *Agave sisalana* eggs and larvae (L3) and pupae and adults of *A. aegypti*. The methodology in ovicidal activity assays, It was used filter paper discs containing 30 eggs immersed in a solution of lyophilized extract *sisalana A.* diluted with water (0.5 -1.0 mg / mL) was observed for 5 days. In larvicidal activity tests, we used 20 third stage larvae exposed to different concentrations of the lyophilizate extract of *A. sisalana* (0.2 - 1.0 mg / mL) and mortality was recorded after 24 hours. In pupicida activity assays if used 10 pupa exposed to concentration of 10 mg / mL of the lyophilizate extract of *A. sisalana*) and mortality was recorded after 24 hours. The adulticide activity was verified by the body and tarsal contact tests and the test meal using the concentration of 10 mg / mL was observed for 5 days. The results of our study showed that the concentration of 10 mg / ml was able to suppress the outbreak of *Ae. aegypti* concentration of 0.8 mg / mL of the lyophilizate extract was able to kill 100% larvae of *Aedes aegypti*, the concentration tested failed to cause pupal mortality in the concentration of 10 mg / mL was capable of causing 100 % mortality in mosquito *Ae. aegypti* in the tarsal and body contact tests, the latter being a less time. The results confirm that the freeze-dried extract of *A. sisalana* has insecticidal effect is showing an efficient alternative, protecting their insecticidal capacity after the lyophilization process.

Key words: Mosquito, Insecticides, Natural Products, Sisal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mapa do índice de infestação de <i>Ae. aegypti</i> , por estado, no ano de 2016.....	12
Figura 2:	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	13
Figura 3:	Número de casos de Dengue por semana epidemiológica no período entre 2013-2015.....	14
Figura 4:	Mapeamento dos municípios com transmissão autóctone de Chikungunya, demonstrando a situação epidemiológica do Brasil.....	15
Figura 5:	Casos prováveis de zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, no Brasil, entre 2016 e 2017.....	16
Figura 6:	Relação hospedeiro/vetor do ciclo silvestre e urbano da febre amarela.....	17
Figura 7:	Plantação de sisal (<i>Agave sisalana</i>).....	20
Figura 8:	Extrato bruto líquido e liofilizado de <i>A. sisalana</i> liofilizado.....	22
Figura 9:	(a) Ovos de <i>Ae. aegypti</i> aderidos ao papel filtro; (b) Larvas de <i>Ae. aegypti</i> em diferentes estágios; (c) Pupa de <i>Ae. aegypti</i> ; (d) Mosquito <i>Ae. aegypti</i> adulto.....	23
Figura 10:	Eclosão de ovos de <i>Ae. aegypti</i> frente a exposição ao extrato liofilizado de <i>Agave Sisalana</i>	25
Figura 11:	Mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , após 24 horas de exposição ao extrato liofilizado de <i>Agave sisalana</i>	26
Figura 12:	Atividade inseticida da <i>A. sisalana</i> por contato tarsal em mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	26
Figura 13:	Tempo de ação da atividade inseticida do extrato da <i>A. sisalana</i> , por contato tarsal, em mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	27
Figura 14:	Atividade inseticida da <i>A. sisalana</i> por contato corporal em mosquitos de <i>Ae. aegypti</i>	27
Figura 15:	Tempo de ação ação da atividade inseticida, do extrato da <i>A. sisalana</i> , por contato corporal, em mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	14
2.2. Principais arboviroses transmitidas pelo <i>Ae. aegypti</i>	16
2.2.1. Dengue (DENV)	16
2.2.2. Chikungunya (CHIKV)	16
2.2.3. Zika Vírus (ZIKV)	18
2.2.4. Febre Amarela	19
2.3. Estratégias de controle do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	20
2.4. <i>Agave sisalana</i>	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. SUBSTÂNCIA TESTE	24
4.2. INSETOS	24
4.3. ENSAIO DE ATIVIDADE OVICIDA	25
4.4. ENSAIO DE ATIVIDADE LARVICIDA	25
4.5. ENSAIO DE ATIVIDADE PUPICIDA	26
4.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ADULTICIDA	26
4.6.1. TESTE DE CONTATO TARSAL	26
4.6.2. TESTE DE CONTATO CORPORAL	26
4.6.3. TESTE DA INGESTÃO	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* pertence ao filo Arthropoda, classe Hexapoda, ordem Diptera, família *Culicidae* e ao gênero *Aedes* (BRASIL, 2001). Com a destruição dos habitat naturais, devido às pressões antrópicas, uma parte da população silvestre sofreu um processo seletivo que favoreceu a disseminação e sobrevivência da espécie em aglomerados humanos (Christophers, 1960; Crovello, 1972 apud ZARA et al., 2016). O ciclo de vida do *Ae. aegypti* compreende a postura dos ovos em recipiente com água parada, quatro estágios larvares (L1, L2, L3 e L4), desenvolvendo-se em pupa, que posteriormente dará origem a fase alada, o mosquito.

Vetor de diversas doenças virais tais como dengue, febre amarela, febre chikungunya e febre zika, o *Aedes aegypti* é encontrado atualmente na maioria dos estados brasileiros, o que possibilitou o aumento da transmissão dessas doenças em quase todo território nacional. A fêmea do *Ae. aegypti* necessita do repasto sanguíneo para a maturação dos ovos, alimentando-se sucessivas vezes até estar totalmente ingurgitada. Essa característica aumenta as chances do mosquito entrar em contato com o vírus e transmiti-lo. A dengue é considerada a arbovirose mais comum no mundo e quatro sorotipos já foram descritos (DEN 1 a 4) como causadores da doença (PANNUTI, 2005). Além das dificuldades encontradas no controle da dengue, em 2014, duas novas viroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* foram identificadas no Brasil. São elas a febre Chikungunya e a febre Zika. A febre Chikungunya é causada pelo vírus CHIKV, isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1952 (HONÓRIO et al., 2015). A febre Zika é causada pelo Zika vírus (ZIKV), um flavivírus da mesma família do vírus da dengue e da febre amarela. O vírus foi identificado infectando macacos em Uganda em 1947 (HAYES, 2009). Recentemente foi descoberta a associação entre o nascimento de bebês com microcefalia e a infecção pelo zika vírus. Em Novembro de 2015 o Ministério da Saúde declarou Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN), por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil (BRASIL, 2015).

O controle do vetor é feito principalmente por estratégias dos órgãos de saúde pública, que vão desde o combate às formas larvares até o mosquito adulto, principalmente através do uso de inseticidas químicos, em conjunto a campanhas de educação popular para o combate a proliferação do mosquito. Com o surgimento de resistência do *Ae. aegypti* surge a necessidade de desenvolver novos inseticidas, compondo as várias estratégias para que o controle seja integrado, seletivo, econômico e adequado à realidade de cada região do país (BRAGA & VALLE, 2007).

O Brasil possui um alto potencial de recursos naturais para o desenvolvimento de inseticidas a partir da sua flora (SOUSA, 2014). A *Agave sisalana*, conhecida popularmente como sisal é uma planta pertencente à classe das monocotiledôneas, série liliflórea, família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea*, espécie *Agave sisalana* (TAKAHASHI, 2011). Apesar da *Agave sisalana* não ser nativa do Brasil, o país é o maior produtor e exportador mundial da fibra. O cultivo de *A. sisalana* acontece principalmente na região Nordeste em áreas de solo pobre do semiárido. Apenas 3 a 5% do peso das folhas de sisal são aproveitados, o restante, chamado de resíduo de desfibramento, constituído em média por 15% de mucilagem ou polpa, 1% de bucha

(fibras curtas) e 81% de suco ou seiva clorofilada, são desprezados (HARRISON, 1984).

A *A. sisalana* possui dentre os efeitos biológicos já conhecidos as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-helmíntica (SANTOS et al., 2009; DUNDER et al., 2010; DOMINGUES et al., 2010; BORTURA, 2013; NOGUEIRA, 2014). Esses efeitos devem-se aos diferentes compostos presentes na *A. sisalana*, que separados ou em conjunto tem um papel importante nos mecanismos de defesa da planta, bem como seu efeito biocida. Estudos prévios realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas Vetores, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, mostraram atividade larvicida do extrato bruto de *A. sisalana* contra o *Ae. aegypti*. Apesar dos importantes resultados alcançados por esta pesquisa, a utilização do extrato na forma líquida é pouco prática, pois é mais difícil de armazenar e transportar. Sendo assim, a necessidade de desenvolver uma formulação mais adequada as necessidades dos agentes de endemias, que seja de fácil manipulação e armazenamento, somada aos resultados preliminares obtidos em nossos estudos com a *A. sisalana* contra larvas de *Ae. aegypti* justificam a necessidade de testarmos a eficácia do extrato liofilizado, de forma a comprovar se o mesmo mantém a ação inseticida. Além disso, pretende-se explorar a ação inseticida em todas as fases de vida do mosquito.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* pertence ao Filo Arthropoda, classe Hexapoda, ordem Diptera, família Culicidae e ao gênero *Aedes* (BRASIL, 2001). É um mosquito diurno, de coloração preta, com listras e manchas brancas (TAVEIRA et al., 2001; NATAL, 2002). Com a degradação dos ambientes naturais devido à ação humana, houve migração e adaptação do *Ae. aegypti* para ambientes urbanos, encontrando ali condições ideais para sobrevivência e manutenção da espécie (CHRISTOPHERS, 1960 apud ZARA et al., 2016; CROVELLO, 1972 apud ZARA et al., 2016). A presença dos criadouros em ambiente de convívio com o homem favorece a rápida proliferação da espécie, e, conseqüentemente, os sorotipos virais por ele veiculados, por dois aspectos: condições ideais para reprodução e fontes de alimentação, especialmente em regiões com condições de infraestrutura deficiente (ZARA et al., 2016; NATAL, 2002; BESERRA, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (2003), no Brasil, o *Ae. aegypti* está presente nos 26 estados e no Distrito Federal (Brasil, 2003 apud BRAGA, 2007). O Levantamento Rápido do Índice de Infestação para *Aedes aegypti* (LIRAA), é um método amostral, desenvolvido e adotado a partir de 2003 pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) do Ministério da Saúde, que monitora a densidade de larvas e pupas por meio de pesquisa realizada na visita domiciliar do agente de combate às endemias (LIRAA, 2017) (Figura 1).

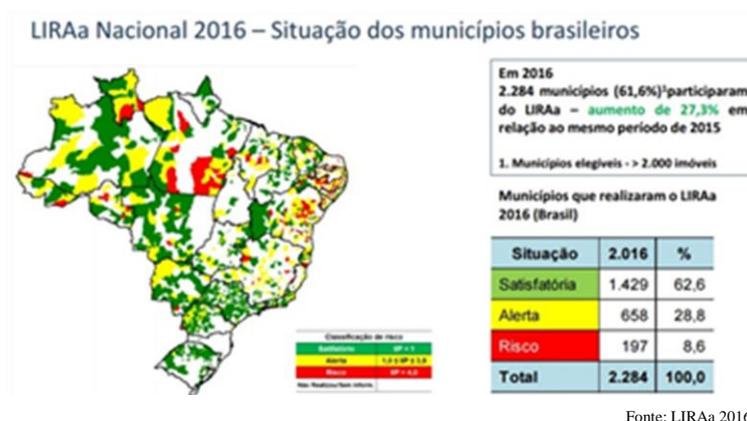


Figura 1 - Mapa do índice de infestação de *Ae. aegypti*, por estado, no ano de 2016.

O *Ae. aegypti* é capaz de transmitir, além da dengue, outras arboviroses como chikungunya, zika e febre amarela (MILLER, 1988 apud ZARA et al., 2016; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004 apud ZARA et al., 2016). Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa, e o ciclo de vida do *Ae. aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto (BRASIL, 2001) (Figura 2).

Os culicídeos na natureza se alimentam de néctar de flores e suco de frutos que são essenciais para a sobrevivência, contudo a maturação ovarial completa está necessariamente relacionada à digestão de um ou mais repastos sanguíneos (LEANDRO, 2012). O *Ae. aegypti*, mais do que qualquer outra espécie, alimenta-se

mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando perturbado antes de estar totalmente ingurgitado. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir os vírus daquelas doenças em que é vetor (BARATA, 2001).

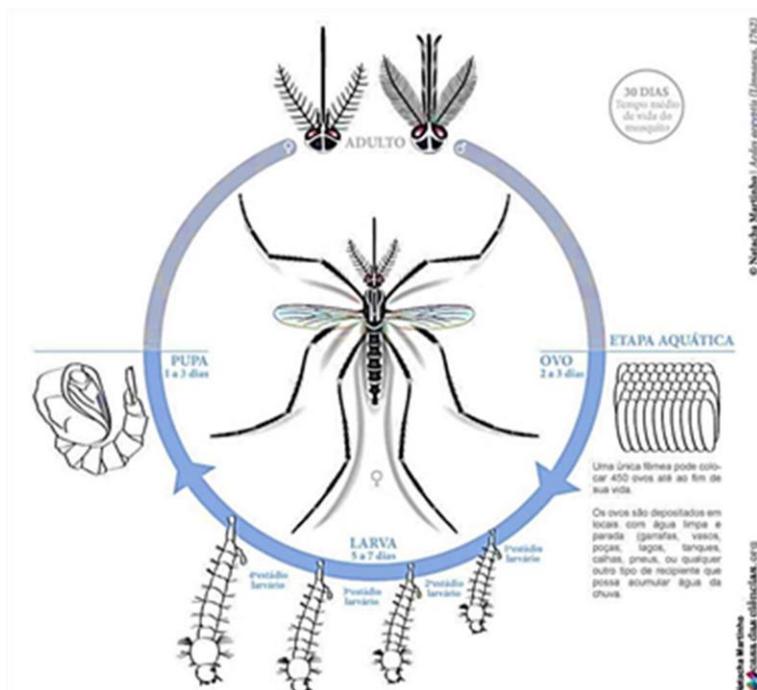


Figura 2 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

Acresce-se que a fêmea do *Ae. aegypti* é muito ágil ao picar e sempre que perturbada durante a ingestão de sangue, interrompe o processo, voa e logo após, estará novamente apta a ser atraída ao mesmo, ou a outro hospedeiro, ocasião em que deverá completar sua refeição (NATAL, 2002).

Apesar de ser na fase adulta que os mosquitos transmitem doenças, convém destacar algumas particularidades das demais fases de vida do *Ae. aegypti*, que ajudam a explicar o grau de adaptabilidade que essa espécie conquistou, no que tange a sua relação com a espécie humana (NATAL, 2002). A quiescência dos ovos permite a manutenção da viabilidade dos mesmo durante as variações climáticas sazonais, chegando até 492 dias na seca, eclodindo após contato com a água (SILVA, 1999 apud BRASIL, 2017a). As larvas possuem quatro estágios evolutivos e tendo em vista a maior vulnerabilidade nesta fase, as ações do Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* devem, preferencialmente, atuar na fase larvária (BRASIL, 2001).

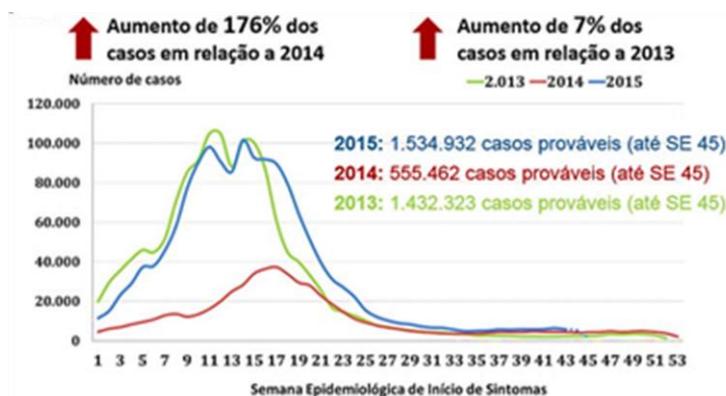
Diante dos desafios de controle do vetor e de um quadro grave e preocupante em relação às arboviroses, delineado pela expansão destes vírus em todo o mundo, torna-se imprescindível a adoção de estratégias específicas, que ofereçam suporte as ações de vigilância e controle do vetor (ZARA et al. 2016).

2.2. Principais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*

2.2.1. Dengue (DENV)

No Brasil, a dengue é caracterizada por transmissão endêmica e epidêmica determinada principalmente pela circulação simultânea dos quatro sorotipos virais: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (BRASIL, 2017a). A dengue é uma doença febril aguda, tendo como agente um arbovírus do gênero *Flavivírus* da família *Flaviviridae* (BRASIL, 2001). A infecção acontece através da picada da fêmea do *Ae. aegypti* e é caracterizada por febre e, no mínimo, dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retro-orbital, dor osteomioarticular, erupções, leucopenia ou sangramento. Quando evolui para forma grave apresenta hemorragia e/ou choque hipovolêmico e é chamada de febre hemorrágica da dengue (FHD), tendo seu risco aumentado em casos de reinfeção (XAVIER, 2014; NOGUEIRA, 2007; DALBEM, 2014). Recentemente, a empresa Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda desenvolveu uma vacina contra a doença, porém atualmente, a mesma não está disponível no sistema público de saúde e não confere 100% de proteção contra a doença (ANVISA, 2016).

Entre 2013 e o primeiro semestre de 2016, foram notificados cerca de 5 milhões de casos de dengue no Brasil, superando o total de casos registrados na década passada. Apenas em 2015 foi registrado 1,6 milhão de casos, sendo considerado, até o momento, o ano da maior epidemia da doença no País (BRASIL, 2017a) (Figura 3). As estimativas sugerem que, anualmente, ocorrem no mundo cem milhões de casos de dengue e meio milhão de casos de FHD (DALBEM, 2014).



Fonte: LIRAA 2015

Figura 3 - Número de casos de Dengue por semana epidemiológica no período entre 2013-2015.

A dengue é uma doença de notificação compulsória e os óbitos suspeitos são de notificação compulsória imediata. Entre 2013 e o primeiro semestre de 2016, foram confirmados 2.300 óbitos por dengue no Brasil, sendo o ano de 2015 o que concentrou o maior número deles, com o total de 986 óbitos por dengue grave ou com sinal de alarme (BRASIL 2017a, 2017b).

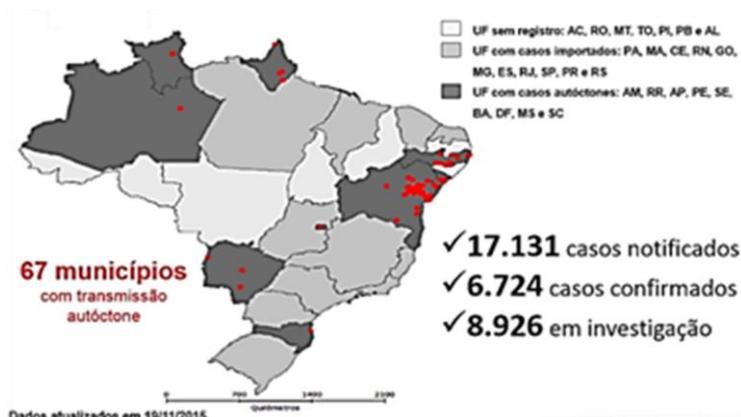
2.2.2. Chikungunya (CHIKV)

A febre chikungunya é causada por um vírus RNA, da família *Togaviridae*, do gênero *Alphavirus*, chamado de CHIKV. Esse vírus foi descrito pela primeira vez em

1950 na região que hoje corresponde à Tanzânia, durante um surto atribuído inicialmente ao vírus da dengue (DONALISIO, 2015). Na África, os vírus mantêm-se num ciclo de transmissão silvestre, entre macacos e pequenos mamíferos, e mosquitos do gênero *Aedes* (TAUIL, 2014). Na Ásia, o ciclo de transmissão é diferente e o vírus circula entre seres humanos e mosquitos, resultando em epidemias urbanas, com a participação das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* como principais vetores (TAUIL, 2014).

O cenário no Brasil é de possibilidade de grandes epidemias, em função de diversos fatores, sendo o principal deles, a ampla infestação do território brasileiro pelos dois vetores do CHIKV (PANCETTI, 2015 apud HONÓRIO, 2015).

Em agosto de 2015, a transmissão autóctone havia sido detectada em 33 países e territórios das Américas, tendo sido reportado pela América Latina quase um milhão de casos (PAHO, 2011 apud CAVALCANTI, 2017; YAKOB & CLEMENTS, 2013 apud CAVALCANTI, 2017). No Brasil, a transmissão autóctone de CHIKV foi detectada simultaneamente em setembro de 2014 em Feira de Santana (Bahia) e Oiapoque (Amapá). Durante 2014, houveram 2.772 casos confirmados de CHIKV em seis unidades da federação (MS / SVS 2014, 2016 apud CAVALCANTI, 2017; TEIXEIRA et al., 2015 apud CAVALCANTI, 2017). Em 2015, as áreas de transmissão se expandiram, com cerca de 17.000 casos notificados (Figura 4) e, atualmente, 25 das 27 unidades federadas possuem circulação autóctone do vírus (LIRAA, 2015; BRASIL, 2017a).



Fonte: LIRAA 2015

Figura 4 - Mapeamento dos municípios com transmissão autóctone de Chikungunya, demonstrando a situação epidemiológica do Brasil.

A infecção por CHIKV produz uma síndrome febril de início súbito e debilitante, que em virtude da intensidade dos sintomas articulares, deram origem ao nome Chikungunya, que, no idioma africano Makonde, significa “andar curvado” (HONÓRIO, 2015). Outros sintomas podem incluir dor de cabeça, dor muscular, inchaço nas articulações ou erupção cutânea (CDC, 2015). Como não há terapia antiviral específica para a infecção por CHIKV, o tratamento dos casos consiste em cuidados de suporte, incluindo administração de analgésicos e esteroides para aliviar os sintomas articulares. O quadro articular crônico interfere na qualidade de vida do indivíduo, com impactos socioeconômicos significativos, devido à redução da produtividade (HONÓRIO, 2015). É possível a participação do vírus CHIKV como

agente ambiental implicado no desenvolvimento de doenças autoimunes potencialmente graves. A infecção viral serviria como “gatilho” para o desenvolvimento de algumas doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, encefalite, neuropatia óptica e síndrome de Guillain-Barré (PEREIRA, 2017; CERNY, 2017).

2.2.3. Zika Vírus (ZIKV)

O vírus Zika é um flavivírus (família Flaviviridae) transmitido por *Ae. aegypti* e que foi originalmente isolado de um macaco na Floresta Zika, na Uganda, em 1947 (DICK, 1952; KARABATSOS, 1985; VASCONCELOS, 2015; BRASIL, 2017a). As infecções por ZIKV em seres humanos foram relatadas pela primeira vez em 1952 na Nigéria, e desde então se espalharam pelo mundo (SILVA JÚNIOR, 2017). Em maio de 2015, a Organização Pan-Americana da Saúde emitiu um comunicado a respeito do risco de transmissão do ZIKV entre algumas cidades nordestinas. Casos autóctones atribuídos à cepa asiática do ZIKV, provavelmente trazida ao Brasil por turistas durante a Copa do Mundo de Futebol de 2014, foram confirmados laboratorialmente, alertando para o potencial de difusão global do vírus, de maneira semelhante ao DENV e CHIKV (LUZ, 2015).

Em 2016 foram registrados 216.207 casos prováveis de Zika no Brasil, sendo 8 óbitos confirmados. Em 2017, até a trigéssima quinta semana epidemiológica, foram registrados 15.586 (MS / SVS, 2017). Os pacientes infectados pelo ZIKV apresentam sintomas como febre baixa, artralgia, mialgia, cefaleia, dor retro-orbicular, erupções cutâneas acompanhadas de coceiras, podendo ainda ocorrer dor abdominal, diarreia, constipação e pequenas úlceras na mucosa oral (VENTURA, 2016; MARTINS, 2017). Embora a doença tenda a evoluir de forma favorável, há relatos de complicações neurológicas tardias, perda auditiva neurossensorial transitória e desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré pós-infecção pelo vírus Zika (LUZ, 2015; BOAVENTURA, 2017; MARTINS, 2017).

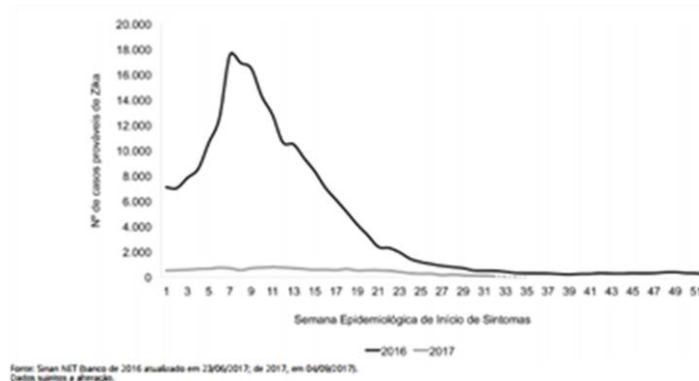


Figura 5 - Casos prováveis de zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, no Brasil, entre 2016 e 2017.

Em Novembro de 2015 o Ministério de Saúde publicou a Portaria nº 1.813, declarando Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil (BRASIL, 2015). A infecção congênita pelo vírus da Zika (ZIKAV) é reconhecida como causa de microcefalia, uma doença que pode ser acompanhada por epilepsia, paralisia cerebral,

retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e fala, além de problemas de visão e audição (PETERSEN, 2016; BOAVENTURA, 2017; CANOSSA, 2017).

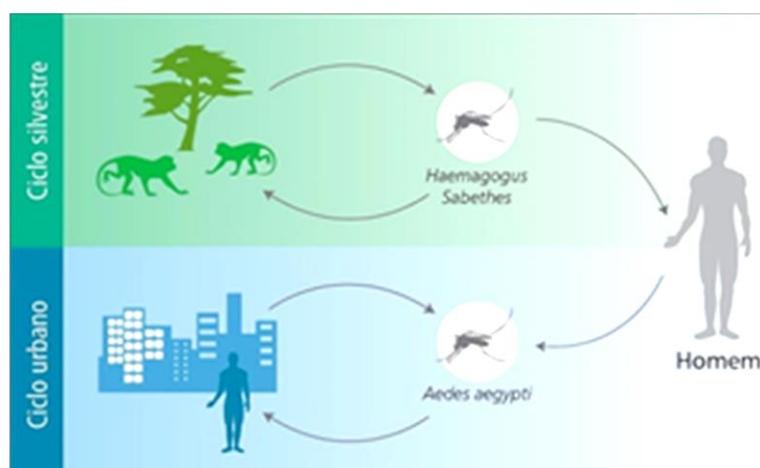
O tratamento da febre Zika inclui, basicamente, repouso, hidratação e tratamento sintomático (LUZ, 2015). Foram relatados ZIKV no plasma, na saliva, sêmen e leite materno, levantando a hipótese de transmissão vertical, tendo sido relatados transmissões por transplante de órgãos e medula óssea, por transfusão sanguínea ou via sexual e exposição laboratorial (MACEDO, 2017).

2.2.4. Febre Amarela

A febre amarela é causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, trazido da África, por ocasião do tráfico de escravos para o Brasil, juntamente com o *Ae. aegypti*. Se trata de uma doença infecciosa aguda, febril, não contagiosa, de curta duração (no máximo de 12 dias), com quadro clínico que pode variar desde assintomático até apresentações graves com extenso acometimento hepático, insuficiência respiratória e renal e fenômenos hemorrágicos, com alta letalidade (VASCONCELOS, 2015; CAVALCANTE, 2017; AVELINO-SILVA, 2017).

Desde 1942, não havia registro do ciclo urbano da febre amarela no Brasil, que apresentava apenas ocorrência endêmica, principalmente na região amazônica, com surtos esporádicos quando o vírus encontrava uma população de pessoas não vacinadas (Figura 6) (OLIVEIRA, 2017; CAVALCANTE, 2017). Desde o início da década de 2000, o Brasil vem ampliando a área de indicação da vacina contra febre amarela, sem adequada fiscalização da cobertura vacinal em pessoas que residem ou viajam para as áreas de risco (AVELINO-SILVA, 2017). Embora anteriormente fosse considerada como uma das vacinas de vírus vivo atenuado mais segura, a vacina contra febre amarela pode induzir a efeitos adversos após sua administração, classificados em três níveis: leve, moderado e grave (SAAD, 2016). A letalidade da doença pode ser considerada um indicador de sensibilidade da vigilância para detectar novos casos, bem como da gravidade da doença (VASCONCELOS, 2015).

No Brasil, a reemergência da febre amarela fora da região amazônica, a partir de 2000, reacendeu a preocupação das autoridades de saúde com a expansão das áreas de circulação viral, documentadas durante a década anterior (CAVALCANTE, 2017).



Fonte: <https://goo.gl/images/vpNsaz>

Figura 6 - Relação hospedeiro/vetor do ciclo silvestre e urbano da febre amarela.

Em dezembro de 2016 teve início um dos maiores surtos de febre amarela de transmissão silvestre da história do Brasil. Até agosto de 2017 havia sido confirmado 777 casos e 261 pessoas morreram em decorrência da doença. Mesmo sem novos casos confirmados, o Ministério da Saúde recomenda que a vacinação contra a doença deve continuar para prevenir a transmissão (CAVALCANTE, 2017; BRASIL, 2017c).

2.3. Estratégias de controle do *Aedes aegypti* no Brasil

O controle do *Ae. aegypti* tem se constituído num importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento. Aspectos relacionados a problemas de infraestrutura das cidades tais como baixas coberturas na coleta de lixo e intermitência no abastecimento de água, são fatores que comprometem a efetividade dos métodos tradicionais de controle do *Aedes* (ZARA et al., 2016). Na ausência de vacinas eficazes e disponíveis em larga escala, e na falta de tratamento específico para combater os sintomas da infecção, tem-se repetido que apenas resta concentrar esforços no vetor, trabalhando para que seja mantido em baixa densidade (VALLE, 2016).

Uma primeira campanha pública contra a febre amarela urbana, iniciada por Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (1902-1907), instituiu as brigadas sanitárias, cuja função era detectar os casos da doença e eliminar os focos de *Ae. aegypti* (BRAGA, 2007). A partir de 1996, o Ministério da Saúde colocou em prática o Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa), mas não conseguiu a necessária atuação multissetorial, o que pode ser apontado como um dos fatores responsáveis pelo insucesso na contenção do aumento do número de casos de dengue e pelo avanço da infestação do *Ae. aegypti* (BRASIL, 2017a). Em julho de 2001, a Funasa abandonou oficialmente a meta de erradicar *Ae. aegypti* do País e passou a trabalhar com o objetivo de controlar o vetor. Foi implantado o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), que focalizou as ações em municípios com maior transmissão da doença nos anos de 2000-2001 (BRAGA, 2007). Em 2002, o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) foi elaborado em função do aumento do risco de epidemias, ocorrência de casos graves de dengue e reintrodução e rápida disseminação do DENV3 no país (BRASIL, 2017a). O PNCD é composto por dez componentes principais: vigilância epidemiológica, combate ao vetor, assistência aos pacientes, integração com atenção básica, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recursos humanos, legislação, sustentação político-social e acompanhamento e avaliação do PNCD (ZARA et al., 2016).

No Brasil, os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate a Endemias (ACE), em parceria com a população, são responsáveis por promover o controle mecânico e químico do vetor. Suas ações são centradas em detectar, destruir ou destinar adequadamente reservatórios naturais ou artificiais de água que possam servir de depósito para os ovos do *Aedes* (ZARA et al., 2016). O manejo ambiental lança mão de medidas para eliminar o vetor ou seus focos, ou, ainda, para impedir o contato homem-vetor, como a eliminação de criadouros, a drenagem e a instalação de telas em portas e janelas (BRAGA, 2007).

O controle biológico é baseado na utilização de predadores ou patógenos com potencial para reduzir a população vetorial. Entre as alternativas disponíveis de predadores estão os peixes e os invertebrados aquáticos, que comem as larvas e pupas, e os patógenos que liberam toxinas, como bactérias, fungos e parasitas (ZARA et al., 2016). A confirmação de resistência a temefos, detectada em vários Municípios brasileiros, motivou sua substituição por *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti) em áreas consideradas críticas (BRAGA, 2007). Diante desse desafio, observam-se ações concretas para consolidar a utilização de novas tecnologias para o controle do *Ae. aegypti*, tal como a liberação de mosquitos geneticamente modificados ou infectados pela bactéria Wolbachia. Esse cenário impõe algumas reflexões e ponderações à utilização dessas novas tecnologias em território brasileiro (WERMELINGER, 2014). Infelizmente, os mosquitos geneticamente modificados, que geralmente têm tido um bom desempenho em laboratório, na natureza geralmente são rapidamente eliminados na competição com o mosquito “normal”, transmissor (GUIRADO, 2009).

O controle químico consiste no uso de produtos químicos, que agem por diferentes mecanismos de ação. Podem ser neurotóxicos, podem ter ação análoga a dos hormônios do crescimento do inseto, entre outras ações, que acabam por matar larvas e insetos adultos (ZARA et al., 2016). O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), pertencente ao grupo dos organoclorados. Esses inseticidas atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores. Outras substâncias utilizadas como inseticidas químicos são os carbamatos ou piretróides (BRAGA, 2007). No Brasil, em vários municípios foi detectado o desenvolvimento de resistência ao inseticida organofosforado temefós usado como larvicida, assim como ao Malathion®, utilizado para o combate aos mosquitos adultos (GUIRADO, 2009). A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte (BRAGA, 2007). Os estudos da resistência a inseticidas têm mostrado que ela é decorrente de três tipos principais de mecanismos, a redução da penetração do inseticida, devido a alterações da cutícula do inseto, o aumento do metabolismo do inseticida por ação de esterases, monooxigenases ou glutatona-transferases e por modificação do alvo do inseticida (GUIRADO, 2009). A resistência a inseticidas pode ser pensada como um processo de evolução acelerada de uma população que responde a uma intensa pressão seletiva, com a consequente sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência. A resistência é pré-adaptativa, resultado de mutações fortuitas (BRAGA, 2007).

Como uma alternativa de controle químico, alguns compostos naturais, como óleos essenciais de plantas, têm sido investigados para constatação de atividade larvicida contra o *Ae. aegypti* (ZARA et al., 2016). O Brasil possui um alto potencial de recursos naturais para o desenvolvimento de inseticidas a partir da flora (SOUSA, 2014). Essa é uma área de pesquisa que vem despertando muito interesse, tendo em vista que é necessário produzir inseticidas eficazes e seguros para a população e para o meio ambiente (BRASIL, 2017a).

2.4. *Agave sisalana*

A *Agave sisalana*, conhecida como sisal é uma planta pertencente à classe das monocotiledôneas, série liliflórea, família Agavaceae, subfamília Agavoidea, espécie *Agave sisalana*. Ocupa uma extensa área de solos pobres na região semiárida dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, em áreas com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas (SOUSA, 2014).

O Brasil é o principal produtor de fibras de sisal do mundo, e o estado da Bahia é responsável por 95,5% da produção de sisal neste país (JESUS, 2015). A *A. sisalana* é a principal fonte mundial de fibra dura, utilizada amplamente na produção de fios, cordas e artesanatos (BARRETO, 2017). A fibra de sisal é o principal produto desta cultura, mas representa apenas aproximadamente 4% do peso fresco da folha; os resíduos sólidos e líquidos constituem os outros 96% da planta, incluindo 81% de resíduos líquidos (JESUS, 2015).



Fonte: ©Du Zuppani Copyrighted | FotoNatural Fotografias

Figura 7 - Plantação de sisal (*Agave sisalana*).

A *A. sisalana* possui dentre os efeitos biológicos já conhecidos, as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-helmíntica (BOTURA, 2013; NOGUEIRA et al., 2014). Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de viabilizar o emprego de plantas com atividade inseticida no controle de pragas. (COSTA, 2014). O resíduo líquido do sisal é composto de metabólitos secundários, como alcalóides, compostos fenólicos, saponinas glicosídicas, flavonóides e taninos. Essas substâncias estão relacionadas aos mecanismos de defesa da planta e também foram associadas a atividades biocidas (JESUS, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse projeto é estudar o efeito inseticida do extrato liofilizado de *Agave sisalana* em diferentes estágios de vida do *Aedes aegypti*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividades ovicida de diferentes concentrações do extrato liofilizado de *A. sisalana* contra ovos de *Ae. aegypti*;
- Avaliar a atividades larvicida de diferentes concentrações do extrato liofilizado de *A. sisalana* contra ovoslarvas de terceiro estágio(L₃) de *Ae. aegypti*;
- Avaliar a atividades aduicida de diferentes concentrações do extrato liofilizado de *A. sisalana* contra mosquitos de *Ae. aegypti*;

4. METODOLOGIA

4.1. SUBSTÂNCIA TESTE

O extrato liofilizado de *Agave sisalana* foi fornecido pela Embrapa Algodão – Campina Grande. O extrato bruto foi obtido por meio da moagem das folhas da *Agave sisalana* em moinho manual, até a completa extração da seiva. Em seguida esse extrato líquido foi coado e acondicionado em recipiente de vidro, ao abrigo da luz e congelado a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente o extrato congelado foi submetido à pressão negativa para retirada da água e obtenção do extrato liofilizado. Para realização dos ensaios biológicos, o extrato liofilizado de *A. sisalana* foi diluído em água destilada até a obtenção da concentração desejada, imediatamente antes do início de cada experimento.

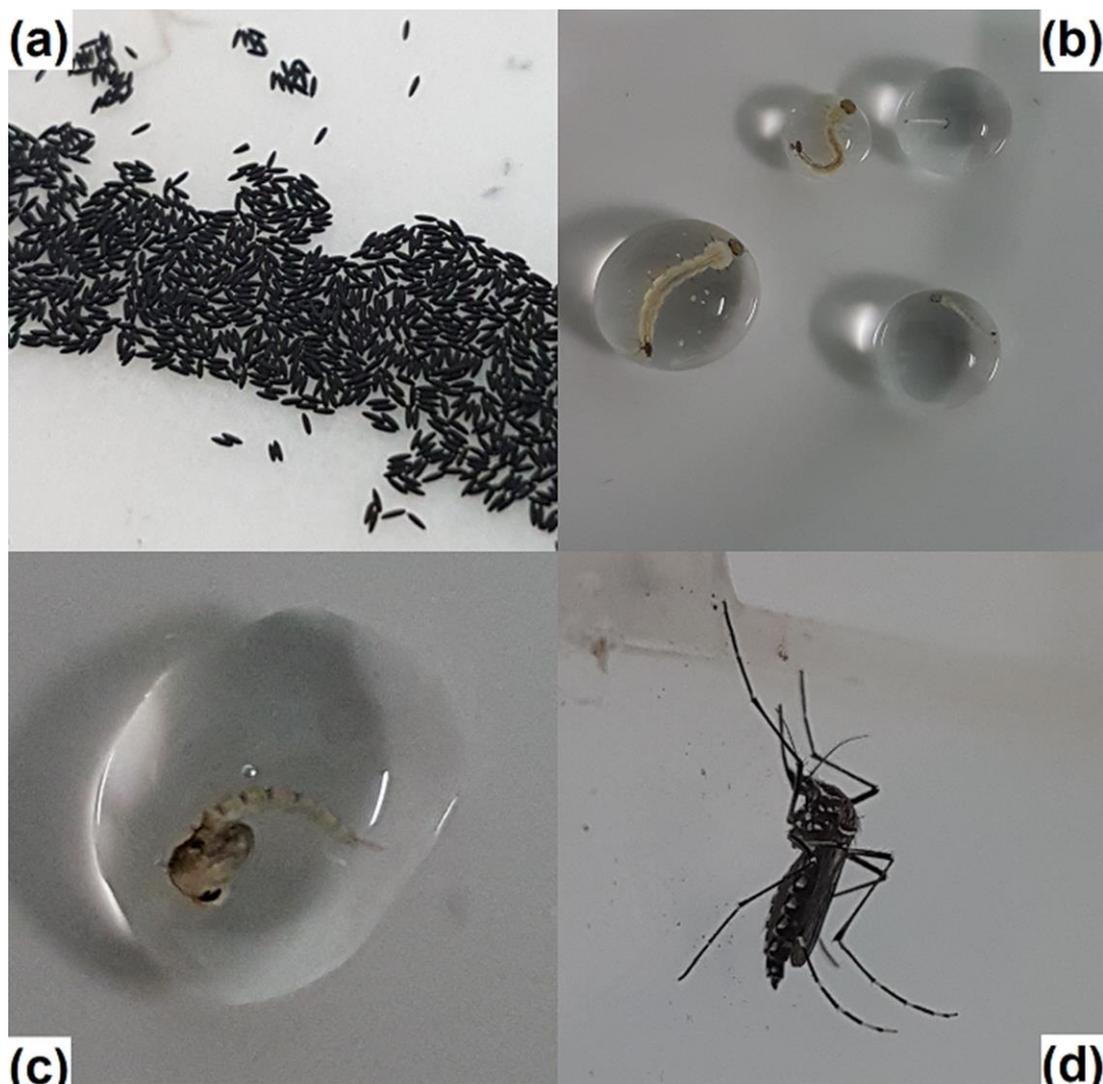


Fonte: [Fonte: Lapavet, UFPB]

Figura 8 – Extrato bruto líquido e liofilizado de *A. sisalana* liofilizado.

4.2. INSETOS

Os ovos, larvas, pupas e adultos de *Aedes aegypti* foram obtidos do insetário do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (Lapavet/CBiotec/UFPB). Ovos de *Aedes aegypti* aderidos a um papel de filtro foram colocados em uma bandeja plástica com água destilada e ração canina, onde permaneceram até a eclosão das larvas e desenvolvimento de pupas, sendo mantido a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} + 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro. As pupas foram transferidas para um copo plástico contendo apenas água e colocadas dentro de uma caixa fechada com tela até eclosão do mosquito.



[Fonte: Lapavet, UFPPB]

Figura 9 – (a) Ovos de *Ae. aegypti* aderidos ao papel filtro; (b) Larvas de *Ae. aegypti* em diferentes estágios ; (c) Pupa de *Ae. aegypti*; (d) Mosquito *Ae. aegypti* adulto.

4.3. ENSAIO DE ATIVIDADE OVICIDA

Para avaliar a atividade ovicida, utilizou-se as concentrações 0,5, 1,0 e 10 mg/mL do extrato liofilizado de *A. sisalana* diluído em água destilada. Discos de papel filtro contendo 30 ovos de *Ae. aegypti* foram colocados em placas de petri e imersos na solução teste. As placas foram mantidas em ambiente com temperatura de 28°C e observados por 5 dias para contagem de larvas eclodidas. Nos grupos controle negativos os ovos foram expostos à água destilada e nos controles positivos os ovos foram expostos ao inseticida comercial Straik Mata Larvas®, produto à base de Piriproxifem a 0,05%. Os testes foram feitos em triplicata.

4.4. ENSAIO DE ATIVIDADE LARVICIDA

Vinte larvas de terceiro estágio (L3) foram transferidas para placas de petri contendo solução do extrato liofilizado de *A. sisalana* diluída em água destilada, em diferentes concentrações (0,25 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,7 mg/mL,

0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL e 1,0 mg/mL). A mortalidade das larvas foi verificada após 24 horas. Os grupos controles negativos foram compostos por 20 larvas (L3) expostas apenas à água destilada e nos grupos controle positivos as larvas foram expostas ao inseticida comercial Straik Mata Larvas®, produto à base de Piriproxifem a 0,05%. Os ensaios foram realizados e mantidos por 24 h na temperatura de 28 °C . Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5. ENSAIO DE ATIVIDADE PUPICIDA

Dez pupas de *Aedes aegypti* foram colocadas em tubos de ensaio contendo solução do extrato liofilizado de *Agave sisalana* , diluída em água destilada, na concentração de 10 mg/mL. A mortalidade das pupas foi verificada após 24 horas. Os grupos controle negativos foram compostos por 10 pupas expostas apenas a água destilada. O experimento foi realizado e mantido por 24 h na temperatura de 28° C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6. ENSAIO DE ATIVIDADE ADULTICIDA

Para avaliação da atividade adulticida, os mosquitos foram submetidos a três diferentes metodologias e observados quanto a mortalidade frente a exposição da concentração de 10mg/mL do extrato liofilizado de *Agave sisalana* em água destilada.

4.6.1. TESTE DE CONTATO TARSAL

Dez mosquitos adultos foram transferidos com o auxílio de um capturador de castro para um copo telado, cuja superfície foi previamente tratada com a solução de 10mg/mL do extrato liofilizado de *Agave sisalana*. Nos grupos controle negativos, a superfície do copo foi tratada apenas com água destilada. A mortalidade dos adultos foi verificada após 24 h e os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.2. TESTE DE CONTATO CORPORAL

Dez mosquitos adultos foram anestesiados pelo frio e posteriormente receberam 10 µL da solução de *A. sisalana* liofilizada, diluído em água destilada na concentração de 10mg/mL. Os ensaios foram feitos em triplicata. Nos grupos controle negativos os mosquitos receberam 10 µL de água destilada.

4.6.3. TESTE DA INGESTÃO

Trinta mosquitos adultos foram colocados em caixas entomológicas, onde foram mantidos por 2 dias. Para avaliar o efeito da ingestão da solução de *A. sisalana*, utilizou-se um dispositivo de alimentação confeccionado com um absorvente interno feminino, o qual foi embebido na solução de *A. sisalana* liofilizada na concentração 10 mg/mL e fixado na tampa da caixa entomológica . Essa era a única fonte de alimentação dos mosquitos. Nos grupos controle, a alimentação foi feita da mesma forma, porém o dispositivo de alimentação foi embebido numa solução de mel em água (10%).

5. RESULTADOS

Para avaliar os efeitos do extrato liofilizado de *Agave sisalana* sobre as diferentes fase de vida do *Ae. aegypti*, foram realizados os testes de atividade ovicida, larvicida, pupicida e adulticida. Os resultados mostraram que o extrato liofilizado de *Agave sisalana* possui atividade inseticida contra ovos, larvas e adultos de *Ae. aegypti*, não apresentando efeito contra a fase de pupa, na concentração testada.

Nos ensaios de atividade ovicida os resultados mostraram que as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL diminuíram a viabilidade de ovos de *Ae. aegypti* em 22,4 e 25,7 %, respectivamente , quando comparado com o controle negativo (Figura 10). Quando aumentou-se essa concentração para 10 mg/mL eclodibilidade foi completamente inibida, durante os 15 dias de observação. Dessa forma, supõe-se que o extrato liofilizado de *A. sisalana* é capaz de suprimir completamente ou ao menos retardar a eclosão de ovos de *Ae. aegypti*.

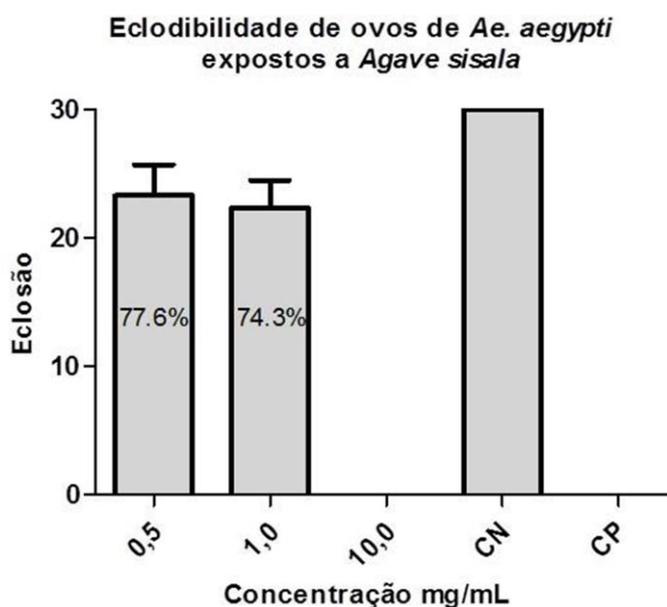


Figura10 – Eclosão de ovos de *Ae. aegypti* frente a exposição ao extrato liofilizado de *Agave Sisalana*. (CN) Controle negativo. (CP) Controle positivo.

Ao avaliar a atividade larvicida, do extrato liofilizado de *A. sisalana* os resultados mostraram que as concentrações de 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL e 0,8 mg/mL foram capazes de causar mortalidade de 1,6; 11,5; 80,0; 90,0 e 100 % das larvas de *Ae. aegypti*, respectivamente (Figura 11).

No ensaio de atividade pupicida a concentração testada não foi capaz de causar mortalidade nas pupas de *Ae. aegypti*.

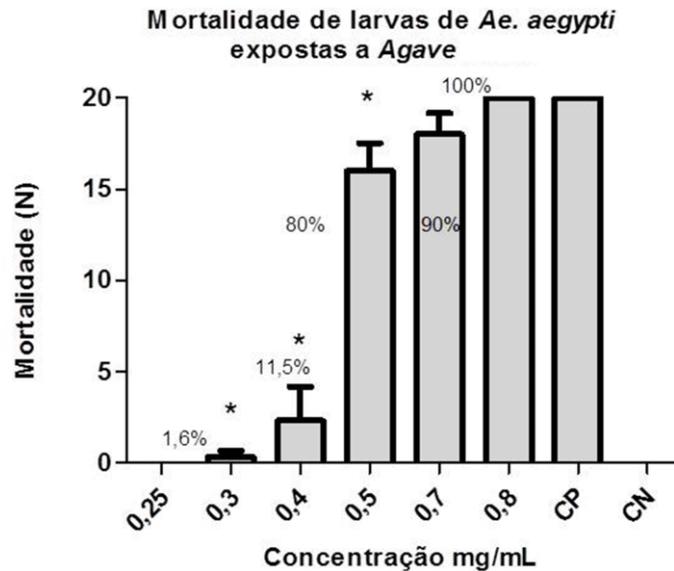


Figura 11 – Mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, após 24 horas de exposição ao extrato liofilizado de *Agave sisalana*. (CN) Controle negativo. (CP) Controle positivo.

A atividade aduicida da *Agave sisalana* foi explorada através dos testes de contato tarsal, corporal e de ingestão da substância teste. Nos resultados obtidos no teste de contato tarsal, que simula a utilização de inseticidas intradomiciliares, a concentração de 10 mg/mL foi capaz de causar 100% de mortalidade no período de 5 dias (Figura 12), enquanto o grupo controle não apresentou mortalidade.

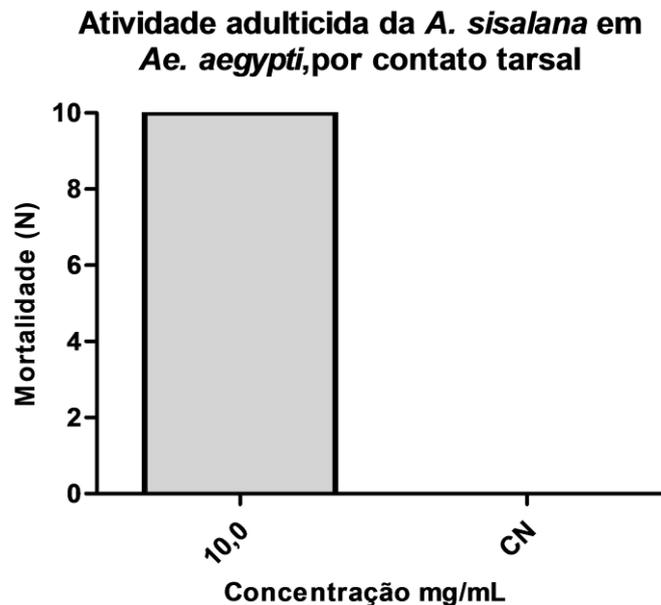


Figura 12 – Atividade inseticida da *A. sisalana* por contato tarsal em mosquitos de *Ae. aegypti*. (CN) Controle negativo.

Já o teste de contato corporal, que simula a aplicação direta do inseticida sobre o mosquito, mostrou que após 5 dias as concentrações de 5 e 10 mg/mL foram capazes de causar, respectivamente, 93% e 100% de mortalidade (Figura 14).

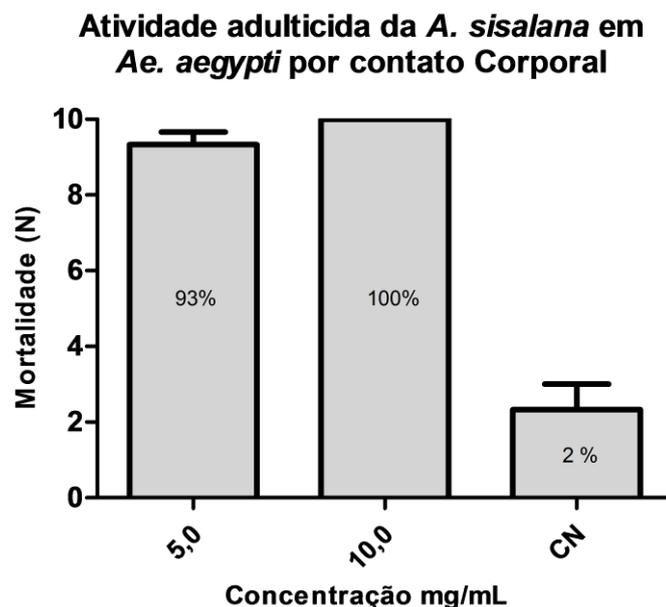


Figura 14 - Atividade inseticida da *A. sisalana* por contato corporal em mosquitos de *Ae. aegypti*.

Quando observamos o tempo vemos que a *A. sisalana* no teste de contato tarsal tem um pico de atividade de 66,6% em 48 horas (Figura 13), enquanto no teste corporal o pico de atividade ocorre em 24 horas e é de 90% (Figura 15).

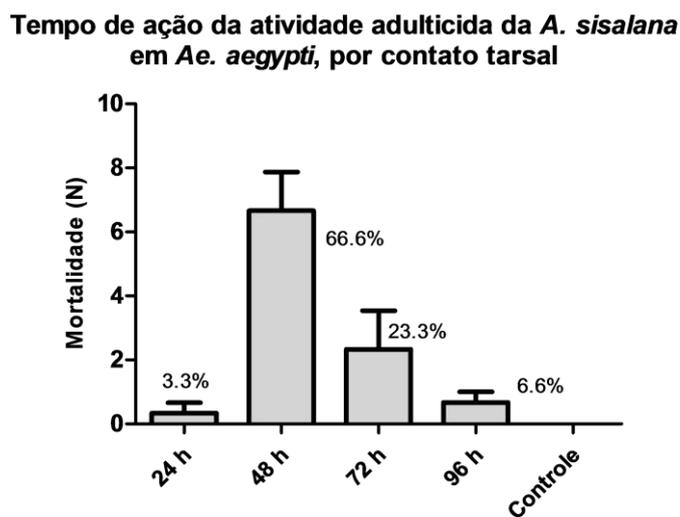


Figura 13 – Tempo de ação da atividade inseticida de *A. sisalana*, por contato tarsal, em mosquitos *Ae. aegypti*.

**Tempo de ação da atividade adulticida da
A. sisalana por contato corporal**

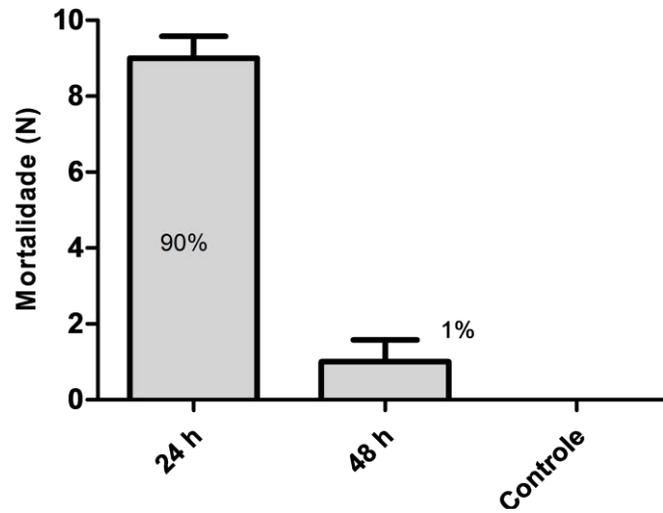


Figura 15 – Tempo de ação da atividade inseticida, do extrato da *A. sisalana*, por contato corporal, em mosquitos *Ae. aegypti*.

O teste da ingestão da substância teste não apresentou mortalidade na concentração testada.

6. DISCUSSÃO

Como principal achado, esse estudo mostrou que o extrato liofilizado de *Agave sisalana*, resguarda as características inseticidas do extrato líquido demonstrado por Nunes et al. (2014) em seu estudo. Em relação ao gênero *Agave*, relatam propriedades larvicidas contra espécies dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*, na Índia (Schacke & Menon, 1983 apud Consoli et al., 1988). Kajla et al. (2016) demonstrou que o extrato líquido ou pó de *Agave angustifolia* possui efeito larvicida. A *Agave sisalana* possui dentre os efeitos biológicos já conhecidos as atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-helmíntica (Santos, 2009; Dunder, 2010; Domingues, 2010; Nogueira et al., 2014). Pizarro (1999) já havia demonstrando que o extrato bruto desidratado do *A. sisalana* era letal para *Ae. aegypti*, causando mortalidade de 95% das larvas na concentração de 1.343ppm. Como podemos observar no presente estudo, a concentração de 0,8 mg/mL foi capaz de matar 100% das larvas de *Aedes aegypti*, dose muito inferior a que Nunes et al. (2014) mostrou em seu estudo, onde o extrato líquido da *Agave sisalana* foi capaz de causar 100% de mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* na concentração de 20 mg/mL. Botura et al (2013) relatou em seu estudo que o extrato aquoso de *A. sisalana* quando usado no tratamento de larvas infecciosas de nematoides gastro-intestinal em cabras, levava a uma significativa redução do número dos mesmos, comprovando a atividade anti-helmíntica, sendo que esse efeito aumentava significativamente quando se utilizava doses maiores.

Foi possível perceber que o extrato de *A. sisalana* liofilizado também tem poder inseticida efetivo para outros estágios do ciclo de vida do *Ae. aegypti*, como foi demonstrado pela diminuição da viabilidade dos ovos no período de 15 dias, onde o controle negativo demonstrou total eclodibilidade dos ovos, enquanto os ovos expostos a concentração de 10 mg/mL não obtiveram eclosão. Dessa forma, supõe-se então que o extrato liofilizado de *A. sisalana* é capaz de suprimir ou retardar a eclosão de ovos de *Ae. aegypti*. Nogueira et al. (2014) observou que após 14 dias de tratamento com *Agave sisalana*, houve uma importante redução de ovos de parasitas intestinais de ovelhas. Leal (2016) afirmou que resíduos frescos e secos de *A. sisalana* tem efeito inseticida sobre ovos e larvas de *Ceratitis capitata*.

Os resultados também mostraram o efeito inseticida contra o mosquito adulto, quando em contato com o tarso ou o corpo, sendo a concentração de 10 mg/mL capaz de matar 100% dos mosquitos. As metodologias usadas nos ensaios ovicida e adulticida, teste tarsal e corporal, são semelhantes as usadas por Govindarajam & Sivakumar (2014) e Salmeron (2002). O teste de contato corporal se mostrou mais efetivo, matando os mosquitos num tempo menor se comparado ao teste de contato corporal como podemos observar nos gráficos 5 e 6. Esse efeito já era esperado, pois segundo Salmeron (2012), o método é mais sensível, embora a técnica possa não refletir a forma pela qual os insetos são expostos a campo. Ainda assim, a metodologia utilizada é um meio de garantir que doses idênticas do inseticida sejam aplicadas em cada inseto.

Tempo de ação da atividade adulticida da *A. sisalana* em *Ae. aegypti*, por contato tarsal

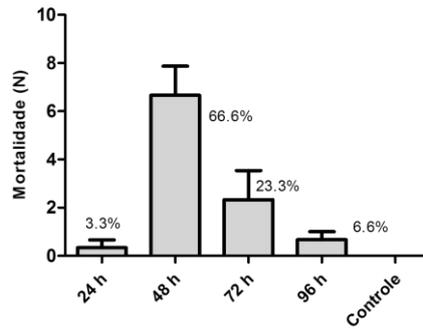


Figura 13 - Tempo de ação da atividade inseticida do extrato da *A. sisalana*, por contato tarsal, em mosquitos *Ae. aegypti*.

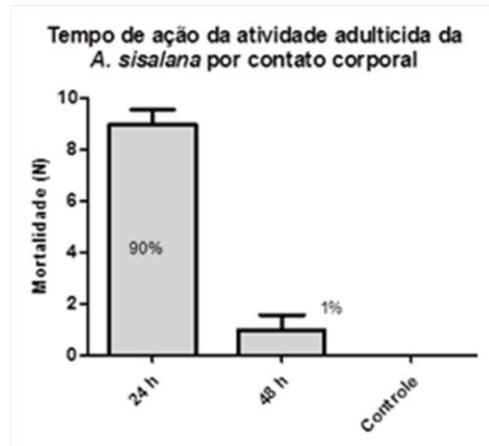


Figura 15 - Tempo de ação da atividade inseticida, do extrato da *A. sisalana*, por contato corporal, em mosquitos *Ae. aegypti*.

O controle do *Aedes aegypti* enfrenta uma ameaça devido ao surgimento de resistência a inseticidas sintéticos. O piriproxyfen utilizado para o controle positivo é um eficaz larvicida, sendo utilizado nas fórmulas de diversos produtos comerciais e com diferentes apresentações (Spray, fumegantes e outros), porém Maoz et al. (2017) fez uma compilação de estudos que relatam a resistência dos insetos a este inseticida. O controle vetorial é o único método amplamente utilizado para prevenção e controle primário das diversas doenças que o *Ae. aegypti* transmite. Inseticidas de origem botânica podem servir como técnicas de biocontrole alternativas e efetivas. Esses inseticidas naturais derivados de plantas vêm cada vez mais sendo estudados no Brasil, devido a rica flora distribuída por todo o extenso território brasileiro, resultando em inseticidas mais adequados a realidade de cada região.

Costa et al. (2014) realizou a triagem fitoquímica do extrato bruto líquido da *Agave sisalana*, e observou a presença de triterpenoides, taninos e saponinas. As saponinas apresentam importantes funções ecológicas e agronômicas, contribuindo para defesa de culturas de plantas contra pragas, patógenos e predadores, podendo afetar a palatabilidade das plantas para os animais, inclusive humanos (OSBOURN et al., 2011 apud COSTA et al., 2014). Nunes et al. (2015) relatou que a partir de 12 horas de

exposição das larvas (L4) em concentração subletal para as larvas, do extrato bruto de *A. sisalana*, os hemócitos dessas larvas começam a sofrer 21 % mais necrose celular que nos hemócitos do grupo controle. Esse fator pode estar ligado as propriedades biológicas das saponinas, que devido ao seu comportamento anfifílico e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas, fosfolipídeos de membranas, tem ação sobre membranas celulares, alterando a permeabilidade da membrana e causando sua destruição (COSTA et al., 2014). Oliveira et al. (2016) corrobora esta suspeita afirmando que o efeito larvicida está ligado a diminuição de óxido nítrico (NO) pós-exposição ao extrato de *A. sisalana*, uma vez que o NO está envolvido nas funções imunológicas da larva, tal fato leva a larva a morte .

Vinayaka et al. (2010) detectaram a presença de taninos e esteroides no extrato metanólico do macrolíquen *Parmotrema pseudotinctorum* e constataram que eram os responsáveis pela atividade inseticida contra larvas de segundo estágio de *Aedes aegypti*. Tal fato pode explicar a atividade inseticida observada na *A. sisalana*, uma vez que estes compostos foram encontrados em sua composição (Vinayaka et al.,2010; apud COSTA et al., 2014). O efeito inseticida deve-se provalmente, aos diferentes compostos presentes na *Agave sisalana*, que separados ou em conjunto tem um papel importante nos mecanismos de defesa da planta, bem como seu efeito biocida.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a *A. sisalana* possui ação inseticida contra ovos, larvas e adultos do mosquito *Ae. aegypti*. Além disso, o processo de liofilização além de tornar o transporte, manipulação e armazenamento do extrato mais prático, preservou a atividade inseticida da *Agave sisalana*. Sendo a *A. sisalana*, uma planta amplamente cultivada no Brasil, sobretudo na região nordeste, seu extrato se configura numa matéria prima abundante e de baixíssimo custo para a produção de inseticidas. Além disso, pode agregar enorme valor a cultura do sisal, que está em franco declínio, ajudando a fixar o homem do campo em sua região de origem, contribuindo para uma melhor qualidade de vida do mesmo. Outra questão relevante diz respeito à sustentabilidade e cuidado com o meio ambiente, uma vez que a utilização do extrato, que atualmente é completamente desperdiçado, poderá contribuir com a diminuição do resíduo gerado pela indústria sisaleira.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) DENGUE: Vacina contra dengue tem preço definido. Publicado: 25/07/2016 18:01 Acesso em: terça-feira, 10 de outubro de 2017. http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-contradengue-tem-preco-definido/219201
2. AVELINO-SILVA, V. L.; RAMOS, J. F. Arboviroses e políticas públicas no Brasil. *Revista ciências em saúde*, Itajubá, v. 7, n. 3, p. 1-2, jul./set. 2017.
3. BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; CHIARAVALLI, F. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*, v. 35, n. 3, p. 237-42, 2001.
4. BARRETO, S. M. A. G. Utilização do subproduto do beneficiamento do sisal (*Agave sisalana* Perrine): desenvolvimento de nanoemulsões cosméticas e avaliação da segurança e eficácia. Dissertação de Mestrado. Brasil. 2017.
5. BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; SOUSA, J. T.; FREITAS, E. M.; SANTOS, K. D. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, v. 39, n. 6, p. 1016-1023, 2010.
6. BOAVENTURA, V. S.; VINHAES, E. S.; DIAS, L.; ANDRADE, N. A.; BEZERRA, V. H.; DE CARVALHO, A. T. Infecção pelo Vírus da Zika Pode Causar Perda Auditiva Transitória em Adultos. *ATUALIZAÇÃO DE TEMA*, v. 64, n. 5, p. 36, 2017.
7. BOTURA, M. B.; SANTOS, J. D. DOS; SILVA, G. D. DA; LIMA, H. G. DE; OLIVEIRA, J. V. DE; ALMEIDA, M. A. DE; BATATINHA, M. J.; BRANCO, A. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Vet Parasitol.* 18;192(1-3):211-7. 2013.
8. BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 16, n. 4, p. 179-293, dez. 2007.
9. Brasil (2017a). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Saúde Brasil 2015/2016: uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti* [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 386 p. Modo de acesso: World Wide Web: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2015_2016.pdf ISBN 978-85-334-2454-8
10. BRASIL (2017b). PORTAL DA SAÚDE. Óbitos por Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2016. Acesso em: terça-feira, 10 de outubro de 2017. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf>

11. BRASIL (2017c). Brasil está livre do surto de febre amarela. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/09/brasil-esta-livre-do-surto-de-febre-amarela>>. Acesso em: 20 out. 2017.
12. BRASIL (2017d) Ministério da Saúde. Febre do Zika Vírus. Portal da Saúde. Ministério da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/zika>
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf
14. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. IDB 2003 Brasil: Indicadores E Dados Básicos Para a Saúde. Brasília: OPAS/RIPSA, 2003.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 1.813, DE 11 DE NOVEMBRO DE 2015. Declara Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil. 2015. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt1813_11_11_2015.html
16. CANOSSA, G. C. C.; STELUTE, L. B.; CELLA, D. ZIKA VÍRUS. **Revista Interface Tecnológica**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 21, jul.ISSN 2447-0864. 2017.
17. CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 26, n. 3, p. 617-620, set. 2017.
18. CAVALCANTI, Luciano Pamplona de Góes; FREITAS, André Ricardo Ribas; BRASIL, P.; CUNHA, R. V. Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: from dengue to chikungunya. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 583-585, Aug. 2017.
19. CDC. Centers for Disease Control and Prevention, Chikungunya nowcast for the Americas. Nowcast: Chikungunya in the Americas. Atlanta: CDC; 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/modeling/index.html>
20. CERNY T.; SCHWARZ M.; SCHWARZ U.; LEMANT J.; GÉRARDIN P.; KELLER E. The Range of Neurological Complications in Chikungunya Fever. *Neurocrit Care*. 2017.
21. CHRISTOPHERS S. R. *Aedes aegypti* (L.): the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure [Internet]. London: Cambridge University Press; 1960.
22. CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. ISBN 85-85676-03-5. 228 p. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.
23. CONSOLI, R. A.; MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SANTOS, B. D. S.; LAMOUNIER, M. A. Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevivência das larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz)(Diptera&58; Culicidae) em laboratório Larvicidal properties of plant extracts against *Aedes fluviatilis* (Lutz)(Diptera&58; Culicidae) in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 83, n. unknown, p. 87-93, 1988.

24. COSTA M. F.; OSUNA J. T. A.; BRANDÃO H. N.; HARAGUCHI M.; LEDO C. A. S. Composição química e toxicidade foliar de extratos do resíduo líquido de sisal. ISSN 2236 – 4420 Magistra, Cruz das Almas – BA, V. 26, n.3, p. 372 - 384, Jul./Set. 2014.
25. COSTA, M. F.; OSUNA, J. T. A.; BRANDÃO, H. N.; HARAGUCHI, M.; LEDO, C. A. DA S. Composição química e toxicidade foliar de extratos do resíduo líquido de sisal. Magistra, Cruz das Almas – BA, V. 26, n.3, p. 372 - 384, Jul./Set. 2014.
26. CROVELLO T. J.; HACKER C. S. Evolutionary strategies in life table characteristics among feral and urban strains of *Aedes aegypti* (L.). *Evolution*. jun;26(2):185-96. 1972.
27. DALBEM, A. G.; HERLING, J. D.; VIEIRA, R. G.; DE SOUZA, V. A. I. Dengue clássica e febre hemorrágica da dengue: etiologia, fisiologia, epidemiologia e fatores de risco. *Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina - Número 1. Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT (Cáceres). jan.-jul. (p.18-36). 2014.*
28. DICK G. W. A., KITCHEN S. F.; HADDOW A. J. Zika virus I. Isolation and serological specificity. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*;46(5):509-20. 1952.
29. DOMINGUES, L. F.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. F. G.; YUKI, C.; SILVA, G. D.; COSTA, M. S.; MURPHY, G.; MOREIRA, E. L. T.; MENESES, I. D. S.; ALMEIDA, M. G. A. R.; BRANCO, A.; ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M. J. M. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 19, pp. 270-272. 2010.
30. DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo , v. 18, n. 1, p. 283-285, Mar. 2015.
31. DUNDER R. J.; QUAGLIO A. E. V.; MACIEL R. P.; LUIZ-FERREIRA A.; ALMEIDA A. C. A.; TAKAYAMA C.; DE FARIA F. M.; SOUZA-BRITO A. R. M. Anti-inflammatory and analgesic potencial of hydrolysed extract of *Agave sisalana* perrine ex engelm., asparagaceae. *Ver. Bras. Farmacogn.*, v.20, p.376-381, 2010.
32. GOVINDARAJAN M.; RAJESWARY M. Potencial ovicida e adulticida de folhas e extrato de sementes de *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Família: Fabaceae) contra *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* maio; 114 (5): 1949-61. 2015.
33. GOVINDARAJAN, MARIMUTHU; SIVAKUMAR, RAJAMOHAN. Ovicidal, larvicidal and adulticidal properties of *Asparagus racemosus* (Willd.)(Family: Asparagaceae) root extracts against filariasis (*Culex quinquefasciatus*), dengue (*Aedes aegypti*) and malaria (*Anopheles stephensi*) vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, v. 113, n. 4, p. 1435-1449, 2014.
34. GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. D. C. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Online)*, São Paulo, v. 6, n. 64, abr. 2009

35. HARRINSON, D. G. Subprodutos del sisal como alimentos para los ruminates. *Revue Mondiale de Zootechnie*, p. 25-31, 1984.
36. HAYES, EDWARD B. “Zika Virus Outside Africa.” *Emerging Infectious Diseases* 15(9), p.1347–1350, 2009.
37. HONORIO, N. A.; CAMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 5, p. 906-908, May 2015 .
38. JESUS, F. N.; DAMASCENO, J. C. A.; BARBOSA, D. H. S. G.; MALHEIRO, R.; PEREIRA, J. A.; SOARES, A. C. Control of the banana burrowing nematode using sisal extract. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 783. Springer Paris. ISSN1774-0746 Online ISSN1773-0155. 2015.
39. KAJLA, M.; BHATTACHARYA, K.; GUPTA, K.; BANERJEE, U.; KAKANI, P.; GUPTA, L.; KUMAR, S. Identification of the Temperature Induced Larvicidal Efficacy of *Agave angustifolia* against *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* Larvae. *Front Public Health*. 2016 Jan 12;3:286. doi: 10.3389/fpubh.00286. eCollection 2015.
40. KAJLA, M.; BHATTACHARYA, K.; GUPTA, K.; BANERJEE, U.; KAKANI, P.; GUPTA, L.; KUMAR, S. identification of the Temperature induced larvicidal efficacy of *Agave angustifolia* against *Aedes*, *Culex*, and *Anopheles* larvae. *Frontiers in public health*, v. 3, p. 286, 2016.
41. KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3rd ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1147 p. 1985.
42. LEAL, T. T. B. Bioatividade do resíduo de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) sobre *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)(Diptera: Tephritidae) e *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905)(Hymenoptera: Braconidae). 2016.
43. LEANDRO, R. S. Competição e dispersão de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: culicidae) em áreas de ocorrência no município de João Pessoa - PB [dissertação]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciência e Tecnologia; 2012.
44. LIRAA. Boletim Entomológico. Coordenadoria de Promoção e Proteção à Saúde | Núcleo de Vigilância Epidemiológica | Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. 2017. Disponível em: file:///C:/Users/PatiA_000/Downloads/boletim_entomologico_1_liraa_10_04_2_017.pdf
45. LIRAA. Microcefalia, dengue, chikungunya, zika. Boletim Entomológico. Secretarias estaduais e municipais de saúde. Ministério da Saúde. Brasil. Novembro de 2015
46. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; DE FILIPPIS, A. M. B.; FAILLOUX, A. B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses.

- Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.
47. LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V. DOS; VIEIRA, R. DE M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 785-788, Dec. 2015.
 48. MACEDO, N. V.; SILVA, C. I. B.; RAMOS, M.; FACCO, P. U.; CIACCIA, M. C.; RULLO, V. E. V. A ocorrência da transmissão do Zika vírus através do leite materno. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 14, n. 34, p. 135-141, 2017.
 49. MAOZ, D.; WARD, T.; SAMUEL, M.; MÜLLER, P.; RUNGE-RANZINGER, S.; TOLEDO, J.; BOYCE, R.; VELAYUDHAN, R.; HORSTICK, O. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 17;11(7):e0005651. Jul 2017.
 50. MARTINS, O. R.; RODRIGUES, P. L. D. A.; SANTOS, A. C. M. D.; RIBEIRO, E. Z.; NERY, A. F.; LIMA, J. B.; SILVEIRA, A. R. O. Otological findings in patients following infection with Zika virus: case report. *Audiology-Communication Research*, v. 22, 2017.
 51. MILLER, B.R.; BALLINGER, M.E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 3, p. 476-477, 1988.
 52. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/preparacao_resposta_virus_chikungunya_brasil.pdf
 53. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 32, 2016. *Boletim Epidemiológico* [Internet]. 47(33): 1-10. 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/16/2016-028---Dengue-SE32.pdf>.
 54. MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. *Boletim Epidemiológico* [Internet]. v. 48, n. 29, p.1-13. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/15/2017-028-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-35.pdf>
 55. NATAL, D. Bioecologia do *aedes aegypti*. *Biológico*, São paulo, v. 64, n. 2, p. 205-207, jul./dez. 2002.
 56. [NOGUEIRA, M. S.](#); [BRAGA, V. A.](#); NUNES, F. C. In Vivo antihelminthic activity of *Agave Sisalana* liquid waste in sheeps. *Bothalia (Pretoria)*, J v. 44, p. 2-8, n. 2014.

57. NOGUEIRA, R. M.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*, Washington. 22(5):358-63. 2007.
58. NUNES, F. C.; LEITE, J. A.; OLIVEIRA, L. H. G.; SOUSA, P. A. P. S.; MENEZES, M. C.; MORAES, J. P. S.; MASCARENHAS, S. R.; BRAGA, V. A. The larvicidal activity of *Agave sisalana* against L4 larvae of *Aedes aegypti* is mediated by internal necrosis and inhibition of nitric oxide production. *Parasitology research*, v. 114, n. 2, p. 543-549, 2015.
59. NUNES, F.; GUIMARÃES, L.; LACERDA, D.; MASCARENHAS, S.; BRAGA, V. Larvicidal activity of *Agave sisalana* against *Aedes aegypti* mosquito, the dengue vector. *BMC Proceedings*. Vol. 8. No. 4. BioMed Central, 2014.
60. OLIVEIRA, L. H. G. DE; SOUSA, P. A. P. S. DE; HILARIO, F. F.; NASCIMENTO, G. J.; MORAIS, J. P. S.; MEDEIROS, E. P. DE; SOUSA, M. F. DE; NUNES, F. DA C. *Agave sisalana* extract induces cell death in *Aedes aegypti* hemocytes increasing nitric oxide production. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, ISSN: 2221-1691, v. 6, n. 5, p. 396-399, mai. 2016.
61. OLIVEIRA, W. A. Febre amarela no Brasil: um risco para a saúde pública. *Revista de saúde da Fiaciplac*, Brasília, v. 4, n. 1, p. 36-38, jan./jul. 2017.
62. OSBOURN, A.; GOSS, R. J. M.; FIELD, R. A. The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Natural Product Reports*, v. 28, p. 1261–1268. 2011.
63. PAHO - Pan American Health Organization. Preparedness and Response for Chikungunya virus: introduction in the Americas. Washington (DC): PAHO; 2011. 161 pp.
64. PANCETTI, F. G. M.; HONÓRIO, N. A.; URBINATTI, P. R.; LIMA-CAMARA, T. N. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*; 48:87-9. 2015.
65. PANNUTI, C. S. Dengue. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 5, p. 313-314, Oct. 2005.
66. PEREIRA, F. R.; MARQUES, R. F. O.; MARQUES, F. A.; ANTELO, N. R. Lúpus eritematoso sistêmico grave após infecção pelo vírus chikungunya. *Revista Brasileira de Reumatologia*, Volume 57, Supplement 1, 2017.
67. PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, A. M.; HONEIN, M. A. Zika Virus. *N Engl J Med*. 21;374(16):1552-63. Apr 2016.
68. PIZARRO, A. P. B.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T.; SANTOS, C. E. D; LIMA, P. R. Utilization of the waste of sisal industry in the control of mosquito larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(1):23-29, jan-fev, 1999.
69. PRATHIBHA, K. P.; RAGHAVENDRA, B.S.; VIJAYAN, V. A. Larvicidal, ovicidal, and oviposition-deterrent activities of four plant extracts against three mosquito species. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21(10):6736-43. May 2014.

70. SAAD, L. D. C.; BARATA, R. B. Surtos de febre amarela no estado de São Paulo, 2000-2010. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília , v. 25, n. 3, p. 531-540, set. 2016.
71. SALMERON, ELOISA. Subsídios para o manejo da resistência de *Blattella germanica* (L., 1767)(Diptera: Blattellidae) a inseticidas. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
72. SANTOS J.D.G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *Afr. J. Biotechnol.*, v.8, p.6181-6184, 2009.
73. SHAKTU N. S. D.; MENON P. K. M. Larvicidal Property of Three species of genus *Agave* (Fam: Amaryllidaceae). *Journal of Communication Disorders* 15:135-137, 1983.
74. SILVA JÚNIOR, J. V. J.; LOPES, T. R. R.; OLIVEIRA-FILHO, E. F. D.; OLIVEIRA, R. A. D. S.; GIL, L. H. V. G. Perspectives on the Zika outbreak: herd immunity, antibody-dependent enhancement and vaccine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 59, 2017.
75. SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. 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*, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 349-355, jul./ago 1999.
76. SOUSA, P. A. P. S.; OLIVEIRA, L. H. G.; LOPES, E. C. S.; NUNES, F. C. Efeitos do resíduo líquido da *Agave sisalana*. sobre pupas do mosquito *Aedes aegypti*. *Revista Saúde & Ciência Online*, v. 3, n. 3, p. 275-278, 2014.
77. TAKAHASHI, R.; PEREIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, D. R.; FUJIYAMA, R. T. Fabricação de mantas de fibras de sisal e de curauá para fabricação de material composto. *Cobenge*, Blumenau, p.111-222, 201./out. 2017.
78. TAUIL, P. L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília , v. 23, n. 4, p. 773-774, dez. 2014
79. TAVEIRA, L.A., FONTES, L.R., NATAL, D. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto. Secretaria de Saúde. Divisão de Controle de Vetores e Animais Peçonhentos, 2001.
80. TEIXEIRA, M. G.; ANDRADE, A. M. S.; COSTA, M. DA C. N.; CASTRO, J. S.M.; OLIVEIRA, F. L. S.; GOES, C. S. B.; MAIA, M; SANTANA, E. B.; NUNES, B. T. D.; VASCONCELOS, PEDRO F.C. East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis.* 21(5): 906–907. May 2015.
81. VALLE, DENISE. Sem bala mágica: cidadania e participação social no controle de *Aedes aegypti*. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília , v. 25, n. 3, p. 629-632, Sept. 2016.
82. VASCONCELOS, P. F. DA C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. *Rev Pan-Amaz Saude*, Ananindeua , v. 6, n. 2, p. 9-10, jun. 2015.

83. VASCONCELOS, P. F. DA C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua* , v. 5, n. 3, p. 9-10, set. 2014
84. VENTURA, C. V.; MAIA, M.; VENTURA, B. V.; LINDEN, V. V. D.; ARAÚJO, E. B.; RAMOS, R. C.; ROCHA, M. A. W.; CARVALHO, M. D. C. G.; RUBENS, B. JR.; VENTURA, L. O. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol.* 79(1):1-3. 2016.
85. VINAYAKA, K. S.; KUMAR, S. V. P.; MALLIKARJUN, N.; KEKUDA, T. R. P. Studies on Insecticidal activity and Nutritive composition of a macrolichen *Parmotrema pseudotinctorum* (des. Abb.) Hale (Parmeliaceae). *Drug Invention Today*, v. 2, p. 102-105. 2010.
86. WERMELINGER, E. D.; FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. The use of modified mosquitoes in Brazil for the control of *Aedes aegypti*: methodological and ethical constraints. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro* , v. 30, n. 11, p. 2259-2261, Nov. 2014.
87. XAVIER, A. L. R.; FREITAS, M. S.; LOUREIRO F.M.; BORGHI, D. P.; KANAAN, S. Manifestações clínicas na dengue: diagnóstico laboratorial. *J Bras Med.* 102(2):7-14. 2014.
88. YAKOB, L.; CLEMENTS, A. C. A. A. Mathematical model of Chikungunya dynamics and control: the major epidemic on Reunion Island. *PLoS ONE.* 8(3): e-57448. 2013.
89. YVOKE, N.; OGBONNA, P.C.; EKEH, F.N.; EZENWAJI, N.E.; ATAMA, C.L.; EJERE, V.C.; ONOJA, U.S.; EYO, J.E. Effects of grapefruit (*Citrus paradisi* MACF)(Rutaceae) peel oil against developmental stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 44, n. 6, p. 970, 2013.
90. ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V.; SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(4):569-72. Jun 2015.
91. ZARA, A. L. de S. A.; Santos, S. M. dos; Fernandes-Oliveira, E. S.; Carvalho, R. G.; Coelho, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília* , v. 25, n. 2, p. 391-404, June 2016.
92. ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M. D.; OLIVEIRA, E. S. F.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E.; OLIVEIRA, R. L.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A. M. B.; FAILLOUX, A. B. *Aedes aegypti* in Brazil: Genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98(1):43-54. Jan 2004.