



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

TAINÁ MARIA SANTOS DA SILVA

***Indigofera suffruticosa* MILL (FABACEAE): estudo da biologia reprodutiva
de machos de *Aedes aegypti***

Recife
2019

TAINÁ MARIA SANTOS DA SILVA

***Indigofera suffruticosa* MILL (FABACEAE): estudo da biologia reprodutiva
de machos de *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Área de Concentração: Morfologia e Inovação Tecnológica

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite**

Coorientador: **Prof.^o Dr.^o Wendel José Teles Pontes**

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Tainá Maria Santos da
Indigofera suffruticosa MILL (FABACEAE): estudo da biologia reprodutiva de machos de *Aedes aegyptis* / Tainá Maria Santos da Silva - 2019.

55 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sônia Pereira Leite

Coorientador: Wendel José Teles Pontes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo.

1. *Aedes aegyptis* 2. Biologia reprodutiva 3. Oviposição
I. Leite, Sônia Pereira (orient.) II. Pontes, Wendel José Teles (coorient.) III. Título

595.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-156

TAINÁ MARIA SANTOS DA SILVA

Indigofera suffruticosa* MILL (FABACEAE): estudo da biologia reprodutiva de machos de *Aedes aegypti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em:26/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sônia Pereira Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Francisca Janaína Soares Rocha (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho, com todo meu amor,
aos meus avós Beatriz e Severino (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

Início os meus agradecimentos àquele que é dono da vida, que foi e é o meu sustento, que mesmo sem eu merecer me permite chegar onde jamais imaginei. Obrigada meu Deus!

A minha mãe que é um exemplo de garra, determinação e amor, agradeço pela sua vida, que é a minha maior fonte de inspiração.

Ao meu pai, pelo cuidado, compreensão, paciência e amor, que muito lutou para que eu hoje estivesse aqui.

Ao meu irmão pela ajuda, incentivo e amor.

A minhas avós Beatriz (*in memoriam*) pela constante ajuda mesmo distante fisicamente e Terezinha pelo incentivo e amor.

A minha orientadora Profa. Dra. Sônia Pereira Leite, pela oportunidade da vivência acadêmica desde o início da graduação, pelos conselhos e todo incentivo.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wendel José Teles Pontes, pela dedicação e empenho.

A minha sobrinha Taylla pelos momentos de distração, afeto e amor.

A toda minha família, especialmente minha prima Thaís pelas inúmeras impressões, e incentivo, e minha prima Taline pelos sorrisos.

A meu amigo Josadaky pela ajuda e apoio.

A minha amiga Camila por escutar meus desabafos.

A meus amigos da graduação, em especial Thaynara, Geryticia, M^a Isabel, Daffany, Roberta e Anderson pela ajuda, incentivo, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e companheiros de laboratório Renatha, Marcos e Willams por estarem sempre dispostos a me ajudar e tornarem esses anos mais leves e sorridentes.

A Izabela Rangel e Jéssica de Andrade pela ajuda e apoio.

A minha turma da Morfotecnologia, pelas brincadeiras e sorrisos.

Ao laboratório de Cancerologia Experimental da Prof^a Dr^a Ivone Antônia de Sousa e seus alunos, pela disponibilidade.

Aos meus amigos Olávio Campos e Wellington pela ajuda nos experimentos e incentivo, e a todos do Laboratório de Microscopia Eletrônica- ME do LIKA.

As meninas do LEA, pela partilha e momentos de distração.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia.

Porque dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; Glória, pois, a Ele eternamente. Amém.

Bíblia. NT. Romanos 11:36

RESUMO

A *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos, sem relatos de efeitos colaterais nocivos ao ser humano. Diversas atividades biológicas são comprovadas como: antiinflamatória, anticâncer, antitumoral, protetor do fígado e baixa toxicidade são relatadas para esta planta. Foi demonstrado que o extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (EAFIs) inibem o desenvolvimento da eclosão dos ovos, a ecdise das larvas e o efeito deterrente na oviposição de mosquitos de *Aedes aegypti*. Com base nisso, o objetivo do estudo foi investigar a fragilidade osmótica, propriedade citotóxica e avaliar a biologia reprodutiva dos machos de *Ae. aegypti* expostos ao EAFIs. Para assegurar que o EAFIs não possui toxicidade foi realizado dois experimentos preliminares: o ensaio de fragilidade osmótica com sangue de carneiro e efeito citotóxico no ensaio *Allium cepa*. Para o experimento da biologia reprodutiva de *Ae. aegypti* foi investigado o desenvolvimento reprodutivo utilizando larvas de último instar (L4) que foram expostas a diferentes concentrações do EAFIs (50µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 1000µg/mL), tendo água destilada como controle, após a emergência foi retirado o aparelho reprodutor para realizar medições. Para o experimento do comportamento reprodutivo foram utilizados adultos machos virgens, onde foram separados em três grupos: grupo A – machos sem exposição do EAFIs; grupo B – machos após a exposição de 24h do EAFIs foi realizado a cópula - grupo C – machos após a exposição de 24h do EAFIs + presença do EAFIs na gaiola durante a cópula, a concentração utilizada foi a de 500µg/mL. Após completar a exposição, um macho e seis fêmeas foram colocados na gaiola durante vinte minutos para observar o tempo e número de cópula. O resultado dos experimentos preliminares para a fragilidade osmótica eritrocitária apresentou baixo nível de hemólise e para a avaliação citotóxica frente a *Allium cepa* não foram identificadas anormalidades cromossômicas. O desenvolvimento reprodutivo dos testículos e glândulas do *Ae. Aegypti* em a presença EAFIs quando comparado ao controle não apresentaram diferença significativa. O comportamento reprodutivo dos machos de *Ae. Aegypti* do grupo C apresentou aumento significativo no número de cópulas, porém, resultou em uma drástica diminuição no número de ovos colocados pelas fêmeas. Os grupos A e B não apresentaram alterações na cópula e oviposição. Diante disso, o EAFIs

demonstrou baixo nível de toxicidade. No estudo da biologia reprodutiva de *Ae. aegypti* em presença dos voláteis do EAFIs, não foram encontradas alterações morfológicas no aparelho reprodutor, porém, afetou o comportamento no processo de cópulas.

Palavras-chave: Cópulas. Aparelho reprodutor. Machos. Oviposição.

ABSTRACT

The *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) occurs in abundance in northeastern Brazil and has intense popular use in the treatment of infections, inflammation and other processes, without reports of harmful side effects to the human being. Several biological activities are proven as: anti-inflammatory, anticancer, antitumoral, liver protector and low toxicity are reported for this plant. It was demonstrated that the aqueous extract of Leaves of *I. suffruticosa* (AELIs) inhibit the development of egg hatching, the larvae ecdysis and the deterrent effect on oviposition of *Aedes aegypti* mosquitoes. Based on this, the objective of this study was to investigate the osmotic fragility, cytotoxic property and to evaluate the reproductive biology of *Ae. Aegypti* exposed to AELIs. To ensure that the AELIs has no toxicity, two preliminary experiments were performed: The osmotic fragility assay with lamb blood and cytotoxic effect in the *Allium cepa* assay. For the experiment of the reproductive biology of *Ae. aegypti* was investigated the reproductive development using larvae of last urge (L4) that were exposed to different concentrations of AELIs (50 M g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 M g/ml), having distilled water as control, after the emergence was removed the The reproductive apparatus to perform measurements. For the reproductive behavior experiment, virgin male adults were used, where they were separated into three groups: Group A – males without eafis exposure; Group B- Males after 24h exposure of the AELIs was performed the copula-group C-males after the exposure of 24h of the AELIs + presence of the AELIs in the cage during copula, the concentration used was of 500 M g/ML. After completing the exposure, a male and six females were placed in the cage for twenty minutes to observe the time and number of copula. The results of the preliminary experiments for erythrocyte osmotic fragility showed low levels of hemolysis and for cytotoxic evaluation against *Allium cepa* no chromosomal abnormalities were identified. The reproductive development of the testes and glands of the *Ae. aegypti* in the presence of AELIs when compared to the control showed no significant difference. The reproductive behavior of *Ae. aegypti* in group C showed a significant increase in the number of copulas, but resulted in a drastic decrease in the number of eggs placed by females. Groups A and B did not present alterations in the copulation and oviposition. Therefore, the Eafis showed a low level of toxicity. In the study of the reproductive

biology of *Ae. Aegypti* in the presence of volatile AELIs, no morphological alterations were found in the reproductive tract, however, it affected the behavior in the process of copulas.

Keywords: Copulas. Reproductive system. Males. Oviposition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Espécime <i>Indigofera suffruticosa</i>	27
Figura 2 –	Avaliação qualitativa de hemólise, tratamentos após centrifugação	28
Figura 3 –	Espécimes expostas as concentrações do extrato e grupo controle	30
Figura 4 –	Larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i> expostas a concentrações do extrato (50µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 1000µg/mL) e grupo controle (água destilada)	31
Figura 5 –	Esquema das medições do aparelho reprodutor de <i>Ae. aegypti</i>	32
Figura 6 –	Gaiola contendo machos expostos a solução aquosa, e fêmea sem exposição ao extrato	33
Figura 7 –	Curva dose-resposta mostrando porcentagens hemolíticas de eritrócitos em presença do EAFIs	36
Figura 8 –	Fotomicrografias das células das radículas de <i>Allium cepa</i> em presença do EAFIs	37
Figura 9 –	Efeito do EAFIs durante o desenvolvimento dos testículos nas larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i>	39
Figura 10 –	Assimetria dos testículos durante a fase larval de <i>Ae. aegypti</i> submetidos a diferentes concentrações do EAFIs	39
Figura 11 –	Volume das glândulas acessórias direita e esquerda de durante a fase larval <i>Ae. aegypti</i> submetidos a diferentes concentrações do EAFIs	40
Figura 12 –	(1,2) Comportamento reprodutivo do <i>Ae. Aegypti</i> exposto aos voláteis do EAFIs	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Avaliação da ação hemolítica do EAFIs	35
Tabela 2 –	Efeito citológico do extrato EAFIs durante o processo de divisão celular da raiz de <i>Allium cepa</i>	37
Tabela 3 –	Efeitos do EAFIs sobre o crescimento das raízes de <i>Allium cepa</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Ae.	Aedes
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEASA	Centro de Abastecimento Alimentar de Pernambuco
EAFIs	Extrato aquoso de <i>Indigofera suffruticosa</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HO-1	Heme oxigenase
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	18
2.1.1	Família Fabaceae	19
2.2	<i>Indigofera suffruticosa</i> MILL	19
2.3	PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE <i>Indigofera suffruticosa</i>	20
2.4	<i>Aedes aegypti</i> BIOLOGIA E REPRODUÇÃO	21
2.5	EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE A MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO EM INSETOS	23
2.6	PLANTAS MEDICINAIS SOB <i>Aedes aegypti</i>	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	COLETA DE <i>Indigofera suffruticosa</i>	27
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Indigofera suffruticosa</i> (EAFIs)	27
3.3	EXPERIMENTOS PRELIMINARES	28
3.3.1	Ensaio de fragilidade osmótica	28
3.3.2	Ensaio <i>Allium cepa</i>	29
3.4	ESTUDO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Aedes aegypti</i>	30
3.4.1	Efeitos de <i>I. suffruticosa</i> no desenvolvimento físico do aparelho reprodutor de machos de <i>Ae. aegypti</i>	30
3.4.2	Ação de <i>I. suffruticosa</i> no comportamento reprodutivo de machos de <i>Ae. aegypti</i>	32
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS	35

4.1	EXPERIMENTOS PRELIMINARES	35
4.1.1	Ensaio de fragilidade osmótica	35
4.1.2	Ensaio <i>Allium cepa</i>	36
4.2	ESTUDO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Aedes aegypti</i>	38
4.2.1	Efeitos de <i>I. suffruticosa</i> no desenvolvimento físico do aparelho reprodutor de machos de <i>Ae. aegypti</i>	38
4.2.2	Ação de <i>I. suffruticosa</i> no comportamento reprodutivo de machos de <i>Ae. aegypti</i>	40
5	DISCUSSÃO	42
5.1	EXPERIMENTOS PRELIMINARES: ENSAIO DE FRAGILIDADE OSMÓTICA E ENSAIO <i>Allium cepa</i>	42
5.2	ESTUDO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>Aedes aegypti</i>	43
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A- FICHA CATALOGRÁFICA HERBÁRIO UFP-UFPE	55

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a forma mais difundida de controle do *Aedes aegypti*, presente nos programas de controle de vetores, é por meio do uso de inseticidas sintéticos. Porém, esses apontam algumas desvantagens: baixa seletividade, danos ecológicos e a seleção de populações de insetos resistentes (GARCEZ et al., 2013).

Para contornar estes problemas, é fundamental detectar novas alternativas de controle com diferentes formas de ação a fim de ampliar as opções disponíveis de inseticidas de uso na saúde pública. O inseticida ideal deve ser eficaz, correto ecologicamente, sustentável e rentável e apresentar baixa toxicidade aos mamíferos. Além disso, não deverão alterar consideravelmente as características da água (DIAS e MORAES, 2014).

Dessa forma, segundo Isman e Grieneisen (2014), pesquisas referentes ao desenvolvimento de inseticidas botânicos, como uma alternativa de controle de vetores, são indispensáveis. Plantas nativas e invasoras podem ser utilizadas na redução da fecundidade, repelência e mortalidade de diferentes artrópodes, com resultados promissores.

A planta arbustiva *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae) ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos, sem relatos de efeitos colaterais nocivos ao ser humano. Os estudos farmacológicos mostraram que extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* apresentam atividades: anti-inflamatória (LEITE et al., 2003), embriotóxica sobre embriões de camundongos (LEITE et al., 2004), antimicrobiana (LEITE et al., 2006), antitumoral e citotóxica (VIEIRA et al., 2007) embriotóxica sobre ovos e larvas de *Ae. aegypti* e atuante na oviposição e efeitos repelente nos mosquitos de *Ae. aegypti* (VIEIRA et al., 2012).

O estudo da biologia reprodutiva de machos de *Ae. aegypti* é fundamental para o estabelecimento e aprimoramento de técnicas de esterilização para o controle populacional do inseto em regiões que sofrem epidemias (OLIVA et al., 2014), especialmente utilizando produtos naturais bioativos que possuam propriedades esterilizantes (ISMAN, 2006), como alternativa à resistência fisiológica e comportamental que inúmeros vetores têm desenvolvido ao longo do tempo (CHAREONVIRIYAPHAP et al., 2013).

Com base nisso, o objetivo do estudo foi avaliar a biologia reprodutiva dos machos de *Aedes aegypti* expostos ao extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* na biologia reprodutiva de machos de *Aedes aegypti*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar a fragilidade osmótica e propriedade citotóxica do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*;
- Elucidar os efeitos de *I. suffruticosa* no desenvolvimento físico do aparelho reprodutor de machos de *Ae. aegypti*;
- Avaliar a ação de *I. suffruticosa* no comportamento reprodutivo de machos de *Ae. aegypti* expostos ao extrato;
- Verificar o efeito de *I. suffruticosa* na oviposição de fêmeas copuladas com machos expostos ao extrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil é detentor da maior diversidade do mundo, com cerca de 60 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e possui imensa tradição do uso das plantas medicinais ligada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. O número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente, nos últimos 20 anos, mesmo com toda riqueza da flora brasileira (FONSECA, 2012).

Planta Medicinal de acordo com a ANVISA é toda planta ou partes dela que possuam as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela atividade terapêutica (BRASIL, 2010).

De acordo com Ferreira et al. (2016), a utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos perdura como uma das mais antigas formas utilizadas pela humanidade na prevenção, tratamento e cura de doenças, e, sendo assim, os recursos oferecidos pela natureza persistiram sob um caráter popular, disseminados milenarmente com propriedades terapêuticas. Logo, esses organismos vegetais com propriedades terapêuticas são importantes na comunidade tradicional, mesmo não tendo uma informação sólida/científica das peculiaridades químicas na maioria das vezes, é o principal meio obtenção de cura de determinada doença.

Contudo, com as melhorias ocorridas no âmbito da ciência, novas formas de tratar e curar as doenças foram aparecendo, como o uso dos medicamentos industrializados, gradualmente introduzidos no cotidiano das pessoas que prometiam curar as mais diversas doenças. Mesmo com o progresso dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como alternativa de tratamento em diversas partes do mundo, considerando nas últimas décadas a valorização de preparações à base de plantas para várias finalidades terapêuticas (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Destaca-se, dentre as que apresentam grande potencial em seus metabólitos, representantes da Família Fabaceae.

2.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae é uma grande família, com mais de 14.000 sp. É a terceira família mais numerosa dentre as angiospermas. A espécie dessa mesma família possui hábitos variados, como arbustos, subarbustos, lianas e árvores, que habitam diferentes ambientes. Destaca-se por apresentar folhas normalmente compostas, podendo ocorrer folhas simples, pinadas, bipinadas, trifoliales ou digitadas, com estípulas que ocasionalmente se transformam em espinhos, alternas e poucas vezes opostas (AGUIAR, 2013).

A espécie foi introduzida no Brasil e cultivada para a extração do corante anil natural, utilizado na indústria têxtil, considerado o mais importante corante azul para a humanidade desde a época pré-histórica. Na década de 80 foi substituído pelo anil produzido artificialmente (SALVADOR et al., 2010).

Família com maior diversidade de espécies dentre as angiospermas ocorrentes no Brasil, apresentando taxa de endemismo de 54,1%, no bioma Mata Atlântica é a segunda família com maior diversidade, atrás somente de Orchidaceae (FORZZA et al., 2010). Nas espécies da família Fabaceae que ocorrem na Caatinga, à dormência tegumentar aparece como o tipo de dormência mais observada das sementes que são produzidas nesse ecossistema semiárido, possuindo tegumento impermeável em suas sementes (MEIADO et al., 2012). Recentemente, muitos estudos tem dado destaque ao potencial de ação nos compostos presentes na espécie *Indigofera suffruticosa*.

2.2 *Indigofera suffruticosa* MILL

O gênero *Indigofera*, pertence à família Fabaceae, primeiramente descrito por Linnaeus em 1737, apresenta cerca de 700 espécies distribuídas em regiões tropical e subtropical. No Brasil há 15 espécies de *Indigofera*, podendo ser encontradas nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Paraná e algumas espécies são achadas em todo território brasileiro (MOURA, VILEGAS e SANTOS, 2011). A planta arbustiva da espécie *Indigofera suffruticosa* Mill, popularmente conhecida "anil" - nome dado à coloração azul extraída das suas folhas – oriunda das Antilhas e América Central, pertence à família Fabaceae e possui facilidade de adaptação em

diferentes solos, inclusive em solos pedregosos (SALVADOR et al., 2010), quer dizer, podem se adaptar em locais de baixa produtividades e, além disso, são caracterizadas como organismos invasores e durante o período de intensa chuva, essa planta se reproduz rapidamente, permanecendo verde durante toda a estação (FIGUEIREDO et al., 2012). A espécie se destaca pelo seu intenso uso popular em processos infecciosos e inflamatórios.

2.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE *Indigofera suffruticosa*

A comunidade científica tem demonstrado grande interesse em validar as propriedades farmacológicas das plantas utilizadas na medicina popular, principalmente para produção de novos fármacos que trazem benefícios para a indústria e a população brasileira.

De acordo com estudos desenvolvidos por Figueiredo et al. (2012), o extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa*, apresentou atividade hemolítica que consiste no rompimento da hemácia e como consequência a liberação da hemoglobina no plasma sanguíneo. O estudo demonstrou que o extrato provoca anemia hemolítica e hemoglobinúria em bovinos e, experimentalmente, anemia sem hemoglobinúria em cobaias. Sendo um resultado positivo, levantou-se a hipótese de o pigmento responsável pelo princípio ativo da hemólise seja a anilina ou algum metabólito dessa substância e que a anilina seja o princípio ativo responsável pela hemólise causada por *Indigofera suffruticosa*.

Outra propriedade bastante importante é a anti-inflamatória, que em plantas medicinais são frequentemente confirmadas na pesquisa científica. Esse processo é resultante da defesa do organismo contra a invasão de "corpos estranhos" em uma lesão tecidual. Tanto o extrato aquoso como o extrato etanólico de *Indigofera suffruticosa* demonstrou ter uma forte propriedade anti-inflamatória, já que diminuíram as expressões dos mediadores pró-inflamatórios diminuindo a ativação de NF-kB induzida por LPS (lipopolissacarídeo) e indução da expressão de HO-1 em macrófagos (CHEN et al., 2013).

As relevâncias dos fitoterápicos se inserem não somente no desenvolvimento de drogas, fonte natural farmacológica, mas também como fontes de matérias-primas para base e síntese de produtos farmacológicos eficazes.

Novos fármacos fitoterápicos estão sendo bastante estudados no meio científico, apresentando resultados positivos e promissores. Pesquisas com a *Indigofera suffruticosa* mostraram que a fração alcalóide isolada das folhas na dose de 25 mg/kg, obtida do extrato aquoso apresentou atividade protetora no fígado através de análise histomorfológica de animais que foram submetidos à quimioterapia com o extrato aquoso das folhas da *Indigofera suffruticosa* (grupo que possuía sarcoma e foi tratado com a fração), mostrando que não houve alterações na estrutura do fígado e capilares dos animais (LIMA et al., 2014).

Além do já exposto, também se estudou a atividade de proteção renal, e foi comprovada através de estudo realizado por Santana et al. (2015), após a análise histomorfométrica dos tecidos renais de camundongos com sarcoma 180 submetidos ao tratamento diário no período de sete dias com extrato aquoso das folhas, apresentou que a arquitetura renal foi preservada, sugerindo uma ação antitumoral do extrato.

Graças aos resultados promissores sobre a ação repelente ou inseticida de *Indigofera suffruticosa* (VIEIRA et al., 2011), estudos voltados para testar seus efeitos em espécies de insetos de ampla importância na saúde pública são desejosos, em especial ao combate de espécies vetoras de doenças, como *Aedes aegypti*.

2.4 *Aedes aegypti* BIOLOGIA E REPRODUÇÃO

O *Ae. aegypti* pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Aedes* e tribo Aedini. Os mosquitos apresentam o corpo revestido com exoesqueleto e visivelmente dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça tem formato ovoide, sendo a maior parte coberta por olhos compostos, consistindo de um conjunto de 350 a 500 omátideos. Ainda na cabeça, encontram-se cinco apêndices, sendo duas antenas, dois palpos maxilares e uma probóscide (conjunto de peças bucais, que são do tipo sugador) (ALMEIDA, 2011), os machos e fêmeas são semelhantes em aparência, diferenciam-se no tamanho e forma das antenas (os machos têm antenas plumosas), palpos maxilares (fêmeas têm palpos mais curtos), abdome, garras e marcações de escala (BAR e ANDREW, 2013).

Diferentemente do adulto, a larva, nas regiões do tórax e abdômen, é composta de tecidos moles e membranosos e apresenta na região da cabeça placas

esclerotizadas. Esses tecidos moles permitem o movimento das larvas (RUEDA, 2008). As larvas passam por quatro instares (I, II, III e IV, respectivamente) com crescimento e mudanças de forma e tamanho ocorrendo durante o seu desenvolvimento. O primeiro instar a larva tem cerca de 1 mm de comprimento, no quarto estágio atinge um comprimento de aproximadamente 8 mm (SCHAPER e HERNANDEZ-CHAVARRIA, 2006; BAR e ANDREW, 2013). O crescimento e o desenvolvimento das larvas são dependentes da temperatura, no entanto, interações complexas com outros fatores, como disponibilidade de recursos e densidade, também contribuem para a variação na taxa de desenvolvimento (COURET e BENEDICT, 2014). Em temperaturas frias (cerca de 15°C), as larvas de *Ae. aegypti* podem permanecer em um instar por meses, desde que o suprimento de água seja suficiente (BRADY et al., 2013).

Os mosquitos para produzir novas gerações utilizam a reprodução sexual. Em cerca de 2-3 dias após emergência, já pode ocorrer o acasalamento, posteriormente as fêmeas fazem uma refeição de sangue que é necessária para desenvolvimento de ovos (LEHANE, 1991). As duas atividades frequentemente ocorrem e forma simultânea, os machos são atraídos tanto pelo hospedeiro vertebrado quanto pelas fêmeas, facilitando acasalamento (NELSON, 1986).

Durante o acasalamento, o macho segura a ponta do abdômen da fêmea com sua terminália e insere seu edeago na câmara genital (*bursa copulatrix*). A câmara é preenchida pelo ejaculado, que por sua vez é transmitido via espermatóforo. Os espermatozoides são alojados na espermateca, onde eles ficarão armazenados até a fertilização dos ovos (NELSON, 1986).

As fêmeas de *Ae. aegypti* geralmente acasalam apenas uma vez, já que um único evento de inseminação possibilita esperma suficiente para ser armazenado dentro do espermatóforo e a fertilização de todos os ovos que uma fêmea irá desenvolver durante a sua vida. Além disso, as proteínas do fluido seminal do macho durante o acasalamento tornam as fêmeas não receptivas e refratárias à cópula (SIROT et al., 2008; ÁVILA et al., 2011). Dessa forma, uma vez acasalada, as fêmeas de *Ae. aegypti* geralmente não são responsivas a acasalamentos adicionais durante a um ou mais ciclos de postura (CATOR et al., 2009).

No entanto, resultados dos estudos de laboratório revelaram que 14% das fêmeas estão envolvidas em múltiplos acasalamentos (poliandria) dentro de um

período de 48 horas (HELINSKI et al., 2012), se o espermatozóide não é preenchido adequadamente.

Do ponto de vista biológico, a condição fisiológica e o tempo necessário para as fêmeas realizarem a digestão de uma refeição de sangue, a maturação dos folículos e a subsequente oviposição constitui uma estratégia de competição reprodutiva entre as fêmeas pelos recursos necessários para a reprodução (WHEELER, 1996).

O ciclo gonotrófico inclui a busca pelo hospedeiro, a ingestão de uma refeição de sangue, a digestão do sangue, a maturação dos ovários. É completado com a colocação de ovos, uma vez que as fêmeas encontraram um local de oviposição apropriado (BEKLEMISHEV, 1940).

2.5 EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE A MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO EM INSETOS

Pela busca de alternativas seguras para o controle de pragas de insetos, vários estudos estão sendo desenvolvidos com extratos vegetais para verificar a capacidade dos mesmos de interferir nos processos de desenvolvimento e reprodução em insetos-alvo, que irão possivelmente ajudar a descobrir substâncias promissoras no controle de pragas de insetos.

Extratos e voláteis de plantas podem ter um efeito comportamental ou diretamente sobre o potencial reprodutivo de insetos. Receptores odoríferos presentes nas antenas também se encontram associados à mobilidade espermática, e contribuem ativamente na funcionalidade do sistema reprodutor masculino, em *Anopheles* (mosquito-prego) (PITTS et al., 2014). Em *Aedes*, a cópula induz a produção acelerada de proteínas específicas, através de RNA mensageiro transferidas diretamente pelos machos (AFFONSO-PARRA et al., 2016).

Extratos de folhas e sementes de *Azadirachta indica* (conhecida popularmente por nim) e *Catharanthus roseus* (vinca) demonstraram forte atividade perturbadora no desenvolvimento de *Spodoptera litura* (lagarta da folha do algodão), causando uma deformação na genitália externa tanto em machos como em fêmeas (SUMMARWAR, 2016).

Extratos de *Zingiber officinalis* (gengibre) e *Aframomum melegueta* (grão-do-paraíso) apresentaram atividade inibitória da reprodução do *Aphis craccivora* (pulgão-

preto) (OFUYA e OKUKU, 1994). Assim como o extrato de *Acorus calamus* resultou em diminuição do potencial reprodutivo em *Tribolium castaneum* (besouro castanho) (JOSEPH et al., 1994). *Callosobruchus chinensis* (besouro) apresentou inibição de oviposição tratados com *Andrographis paniculata* (HERMAWAN et al., 1993).

Concentrações subletais de extratos de óleo de *Thevetia peruviana* (chapéu-de-napoleão), *Datura stramonium* (zabumba) e *Acacia sp.* causam alterações no ovário de *Culex pipiens* (pernilongo), potencial reprodutivo reduzido, alterações na fecundidade, vitelogênese, síntese protéica e conteúdo de carboidratos e lipídios comprometidos (HUSSEIN, 1999).

Estudo sugere que o extrato de folhas de *Annona squamosa* (fruta-do-conde) interfere na reprodução da fêmea adulta *Oryctes rhinoceros* (besouro-rinoceronte), desenvolvimento anormal de oócitos e vitelogênese pode levar a anormalidades reprodutivas incluindo esterilidade. Maturação oocitária retardada, vitelogênese, coriogênese e desenvolvimento defeituoso de tecidos somáticos ovarianos (que têm papel significativo vitelogênese) designam a eficiência quimioesterilizante das plantas (SREELATHA et al., 2008).

Pesquisas durante a última década trouxe à luz, propriedades repelentes, anti-alimentantes, inibidoras do crescimento e inibitórias reprodutivas de extrato de sementes de *Azadiractha indica*. Os efeitos cumulativos do extrato de nim em insetos levaram ao surgimento de um novo inseticida potencial. Mais de 150 espécies de insetos mostram efeito deterrente, 30 espécies apresentou inibição na oviposição, 70 inibição de crescimento e reprodução quando submetidos à a extratos alcoólicos/aquosos de *Azadiractina* (KARNAVAR, 1987).

Dessa forma, extratos de origem vegetal, se apresentam como alternativa no controle de insetos, principalmente atuando na biologia reprodutiva.

2.6 PLANTAS MEDICINAIS SOB *Aedes aegypti*

Na expectativa de desenvolver produtos no controle de pragas, especialmente que transmitam doenças, o uso de plantas com atividade inseticida e larvicida tem se mostrado promissor, devido a serem ricas em substâncias bioativas, principalmente oriundas do metabolismo secundário, que são exclusivas para cada espécie, ou seja, não apresentam distribuição generalizada (RODRIGUES, 2012).

As características dos grupamentos químicos estruturais dessas substâncias ou a combinação entre eles podem acarretar aumento ou redução da atividade larvívora. Essa área de pesquisa vem crescendo e despertando interesse de muitos pesquisadores, considerando-se que é necessário produzir inseticidas eficazes e seguros para a população e para o meio ambiente (SANTOS et al., 2010). Vale destacar que esses novos compostos devem apresentar além de efeito larvívora, devem demonstrar um efeito residual prolongado nos depósitos/locais onde são aplicados. De acordo com Santos et al., (2011), essa característica é importante para a adoção de um determinado composto em atividades de campanha de saúde pública.

Dentre os estudos realizados com espécies pertencentes à família Fabaceae, verificou-se que a *Amburana cearensis* (imburana-de-cheiro) (FARIAS et al., 2010) e *Bauhinia cheilantha* (pata de vaca) (LUNA et al., 2005) apresentaram expressiva atividade larvívora sobre o *Ae. aegypti*. Valloto et al. (2011) ao avaliarem a ação do diterpeno labdano isolado da *Copaifera reticulata* (copaíba-branca) em larvas do *Ae. aegypti*, observaram significativas alterações na região do intestino médio, grande vacuolização citoplasmática, desorganização e degeneração celular.

A *I. suffruticosa* apresentou efeito deterrente ou repelente, onde reduziu significativamente a postura de ovos em fêmeas que tinham o seu substrato embebido com extrato aquoso da espécie em questão, como também embriotoxicidade causando um retardo de desenvolvimento em *Ae. aegypti* no meio contendo extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (VIEIRA et al., 2012).

Se o papel do macho, além de transferir espermatozoides, é de acionar fisiologicamente modificações fundamentais no trato reprodutivo feminino, a descoberta de um extrato que venha a tornar deficiente a produção de espermatozoides ou de produtos das glândulas acessórias torna-se uma alternativa viável e eficiente de esterilização de adultos.

Assim como extrato de *I. suffruticosa* tem o efeito repelente sob as fêmeas de *Aedes aegypti*, resultando em baixa oviposição, acredita-se que este mesmo extrato possa ter efeito sobre a produção espermática em machos, morfologia testicular e possivelmente efeitos adversos no comportamento reprodutivo. Esta dissertação vai testar as hipóteses de que 1) machos que se desenvolveram em meio com extratos de *I. suffruticosa* apresentam deformações morfológicas nos testículos e glândulas acessórias, 2) que machos expostos aos voláteis de *I. suffruticosa* apresentam

alterações comportamentais na redução da duração de cópula, e 3) fêmeas copuladas com machos expostos a *I. suffruticosa* tem sua fecundidade reduzida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE *Indigofera suffruticosa*

A espécie *Indigofera suffruticosa* foi coletada em um terreno baldio no Bairro da Várzea na cidade do Recife, em março de 2018 (Figura 1). A coleta foi realizada no período da tarde, numa temperatura e umidade média de 28°C e 65%, respectivamente. Foi catalogada no Herbário UFP – Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o número 83424 no Centro de Biociências UFPE.

Figura 1. Espécime *Indigofera suffruticosa*.



3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Indigofera suffruticosa* (EAFIs)

A obtenção do extrato foi realizada através do método de maceração descrito por Leite *et al.* (2003). As folhas secas recém-coletadas (300 g) foram reduzidas a pequenos fragmentos. O processo de extração ocorreu em temperatura ambiente por 72 horas com água destilada numa proporção 1:100, e após esse período o

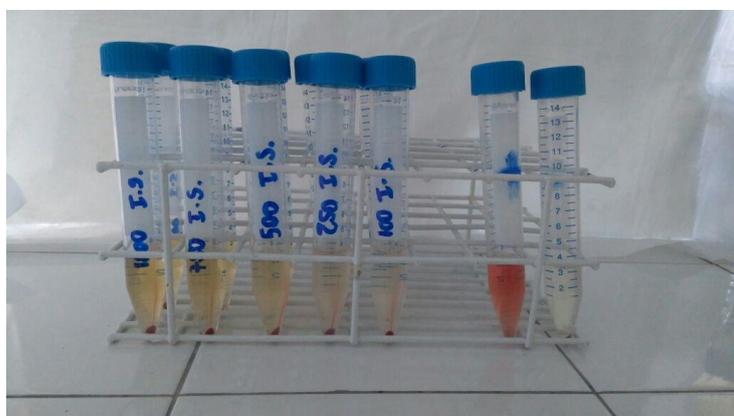
extrato foi filtrado e submetido à liofilização a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $13,3\text{ Pa}$ para obtenção do liofilizado ($2,38\text{g} = 0,79\%$).

3.3 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

3.3.1 Ensaio de fragilidade osmótica

A técnica de fragilidade osmótica seguiu os procedimentos metodológicos descritos por Dacie e Lewis (1975). Amostras de sangue de carneiro comercial foram adquiridas da empresa Laborclin® ($25\text{ }\mu\text{L}$). Foi distribuído 5 mL de solução salina NaCl $0,9\%$ em 7 tubos. No tubo 0, foi adicionado $25\text{ }\mu\text{L}$ de sangue de carneiro e encubado por $30'$. Os tubos seguintes, de 1 a 6 receberam as respectivas concentrações do extrato aquoso em análise: $50\mu\text{g/mL}$, $100\mu\text{g/mL}$, $250\mu\text{g/mL}$, $500\text{ }\mu\text{g/mL}$, $750\text{ }\mu\text{g/mL}$, e $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$. Em seguida, cada tubo recebeu $25\text{ }\mu\text{L}$ de sangue de carneiro e forma encubados por $30'$. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação a força de $3\ 500\text{ G}$ durante $15'$ (Figura 2). Em seguida, o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro Bioplus com comprimento de onda 540nm , para obter a absorvância resultante. O percentual de hemólise baseou-se na fórmula: $\% = \frac{Ab. \cdot 100\%}{1,49}$.

Figura 2. Avaliação qualitativa de hemólise, tratamentos após centrifugação.



Para controle negativo utilizou-se solução isotônica de cloreto de sódio $0,9\%$ e o controle positivo com água destilada, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos empregados nas amostras testes. O ensaio foi realizado em triplicata

e o percentual hemolítico foi definido com controle positivo sendo designado como 100%. O grau de hemólise foi avaliado, qualitativamente, pela tonalidade avermelhada (hemólise) no sobrenadante obtido após a centrifugação. Foram atribuídas em relação à intensidade de hemólise, onde uma cruz (+) indica ligeira hemólise, duas cruces (++) hemólise significativa e três cruces (+++) indicam hemólise intensa.

3.3.2 Ensaio *Allium cepa*

O experimento foi realizado seguindo os procedimentos metodológicos de (Guerra & Souza, 2002) com adaptações. Bulbos de cebola foram obtidos em um mercado local e escolhidos de acordo com seu tamanho (aproximadamente 3,5 diâmetro cm) e aparência. Os catáfilos externos e raízes antigas foram removidas com cuidado, e os bulbos foram lavados, secos e mantidos em geladeira a 4 °C até a início do experimento. O tratamento foi simultâneo, para cada concentração, incluindo o controle positivo, cinco bulbos foram usados. Eles foram colocados em frascos cheios com solução de EAFIs nas concentrações de 50 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml, com 5 repetições cada, o controle negativo foi realizado com água destilada (Figura 3). Avaliação do comprimento das raízes foi realizada durante 96hs. Três maiores raízes foram medidas por bulbo com auxílio de um paquímetro, coletadas, lavadas em água destilada, hidrolisadas com HCl a 1mol/L por 10 minutos. Elas foram então esmagadas e colocadas em laminas com uma gota de ácido acético a 45% durante 5 min. As raízes eram depois coradas com 15% de hematoxilina por 15 min para cada concentração do extrato e controle, dez preparações foram analisadas (1000 células por concentração e controle) um teste “cego” com ampliação de x1000. O cálculo de índice mitótico (IM), que foi estabelecido relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para o IM foi realizada a seguinte equação:

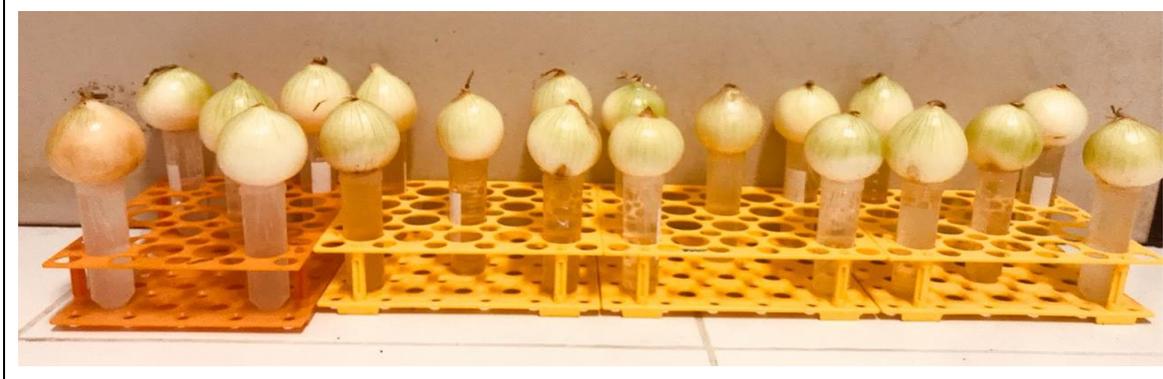
$$IM = \frac{NCM}{NTC} \times 100$$

NCM: número de células em mitose

NTC: número total de células contabilizadas

A partir dos valores obtidos na equação acima, é possível avaliar o potencial citotóxico das amostras, em inibir ou aumentar a proliferação celular.

Figura 3. Espécimes expostas as concentrações do extrato e grupo controle.



3.4 ESTUDO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Aedes aegypti*

3.4.1 Efeitos de *I. suffruticosa* no desenvolvimento físico do aparelho reprodutor de machos de *Ae. aegypti*

Para a realização dos ensaios biológicos utilizaram-se larvas no quarto ínstar do *Ae. aegypti*, provenientes de uma colônia estabelecida no Laboratório de Cancerologia Experimental, da Universidade Federal de Pernambuco, a partir de ovos da linhagem Rockefeller, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores (LAFICAVE), da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro. Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada com média temperatura de 27°C e umidade média de 70%.

Larvas de instar L4 foram individualizadas em recipientes de 10 mL, com solução aquosa em diferentes concentrações do EAFIs (50µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL), tendo água destilada como controle (Figura 4). Foram utilizadas 30 repetições para cada concentração do extrato, da mesma forma no grupo controle.

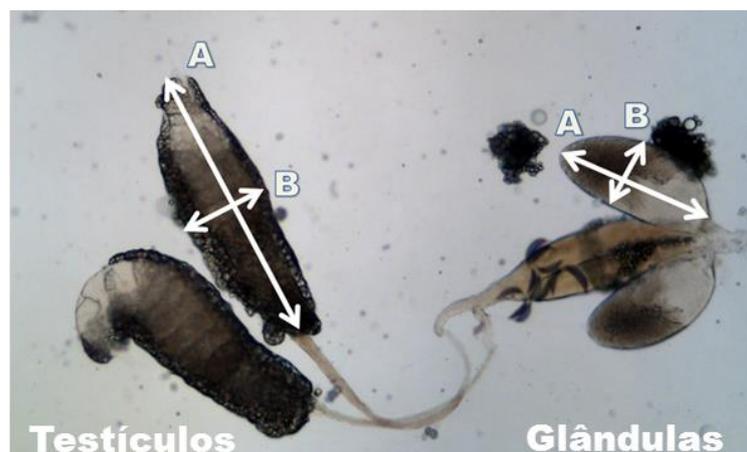
Figura 4. Larvas L4 expostas a concentrações do EAFIs (50µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) e grupo controle (água destilada).



Após 36 a 48 horas da emergência, os machos foram individualizados e dissecados com auxílio de uma lupa para retirada de seu aparelho reprodutor. Os testículos e as glândulas acessórias foram realizados micrografias com microscópio óptico com câmera acoplada ZEISS Axio Imager 2 for Materials Research Your Motorized Microscope Platform, do Laboratório de Microscopia Eletrônica (ME), no LIKA, Fiocruz-PE. As medidas de comprimento e largura das glândulas e testículos foram feitas utilizando-se o software ImageJ com a escala 1,29µm, padronizada para todos os grupos analisados. Considerou-se como comprimento a maior distância entre a extremidade do testículo e sua ligação com o vaso deferente, e largura a maior distância entre as extremidades perpendiculares ao comprimento (Fig. 5). Quando a posição do testículo e/ou glândula não estava linear, foram realizadas mais de uma medida para obtenção de um valor mais preciso. Para se calcular o volume dos testículos e glândulas, foi assumido que suas formas espaciais são a de um elipsoide. A fórmula original do volume de um elipsoide é dada por $\frac{4}{3}\pi abc$, sendo a=comprimento, b=largura e c=altura. Nas medições realizadas, assumiu-se que as distâncias para a largura (b) e a altura (c) são as mesmas, de forma que consideramos $b = c$. Então, a fórmula foi adaptada para $\frac{4}{3}\pi ab^2$.

Para avaliar o impacto das concentrações do extrato sobre o desenvolvimento testicular de *Ae. aegypti*, utilizou-se os dados de volume de cada um dos testículos e calculou-se a assimetria entre eles, com base na diferença de volume do maior para o menor. Neste cálculo, a ausência de assimetria entre os testículos é igual à zero, e o aumento da assimetria é representada por números crescentes.

Figura 5. Esquema das medições do aparelho reprodutor de *Ae. aegypti*.



As setas que indicam a medida de comprimento estão representadas pela letra "A". As setas que indicam a medida de largura estão representadas pela letra "B".

3.4.2 Ação de *I. suffruticosa* no comportamento reprodutivo de machos de *Ae. aegypti*

Para a realização do comportamento reprodutivo utilizaram-se adultos virgens (machos/fêmeas) *Ae. aegypti*. Foi testada na concentração de 500µg/mL e utilizou-se gaiola experimentais para observação das cópulas. Para cada tratamento foram utilizados 40 adultos (entre 6 e 10 dias de idade) de *Ae. aegypti* (20 machos e 20 fêmeas) (Figura 6). Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada com média temperatura de 27°C e umidade média de 70%. Vinte (20) machos foram separados para cada tratamento: grupo A – machos sem exposição do EAFIS; grupo B – Machos, após a exposição de 24hs do EAFIs foi realizado a cópula - grupo C – Machos, após a exposição de 24hs do EAFIS + presença do EAFIs na gaiola durante a cópula.

Foram observados durante 20 minutos o comportamento das cópulas de um macho e seis fêmeas. Na sequência do tratamento após o tempo determinado cada macho foi substituído, totalizando 6 substituições, em seguida seis fêmeas foram substituídas com réplica do tratamento. Todas as observações foram realizadas entre 12:00h e 16:00h, horário de maior atividade do mosquito. O experimento de observação ocorreu a partir da colocação do macho na gaiola, o início das cópulas e o número de cópulas foram registrados. As fêmeas foram separadas e colocadas em uma gaiola por tratamento com um pequeno funil de papel filtro no fundo com um

pouco de água, como sítio de oviposição. Os ovos das fêmeas de cada tratamento foram contados.

Figura 6. Gaiola contendo machos expostos a solução aquosa, e fêmea sem exposição ao extrato.



3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Ensaio preliminares:

A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA, seguido de teste T, com nível de probabilidade <0.05 foi considerado significativo estatisticamente, utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.

Análise do desenvolvimento físico do aparelho reprodutor:

Os dados foram testados para normalidade com o teste de Shapiro-Wilks e homogeneidade da variância. Na hipótese que nenhum desses dois parâmetros fossem contemplados foram utilizados testes não paramétricos. Nesta situação, as análises foram feitas utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM). Nos casos que houve sobre dispersão dos dados, novos modelos foram criados com a devida correção. Para dados de contagem (número de ovos) assumiu-se a distribuição de Poisson.

Para o desenvolvimento do sistema reprodutor foi calculado a média do volume e assimetria dos testículos e volume das glândulas acessórias em relação aos tratamentos.

Análise do comportamento reprodutivo:

Para os dados de comportamento foi calculada a média do tempo de cópulas, a média do número de cópulas, e a função da média do número de cópulas pelo tempo de cópulas. Foi avaliada a relação entre o número de cópulas com o tempo médio de cópulas, em função dos machos virgens sem exposição ao EAFIs, machos virgens com exposição ao EAFIs 24 horas antes dos testes comportamentais e machos virgens com exposição ao EAFIs 24 horas antes e durante os testes comportamentais.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.1.1 Ensaio de fragilidade osmótica

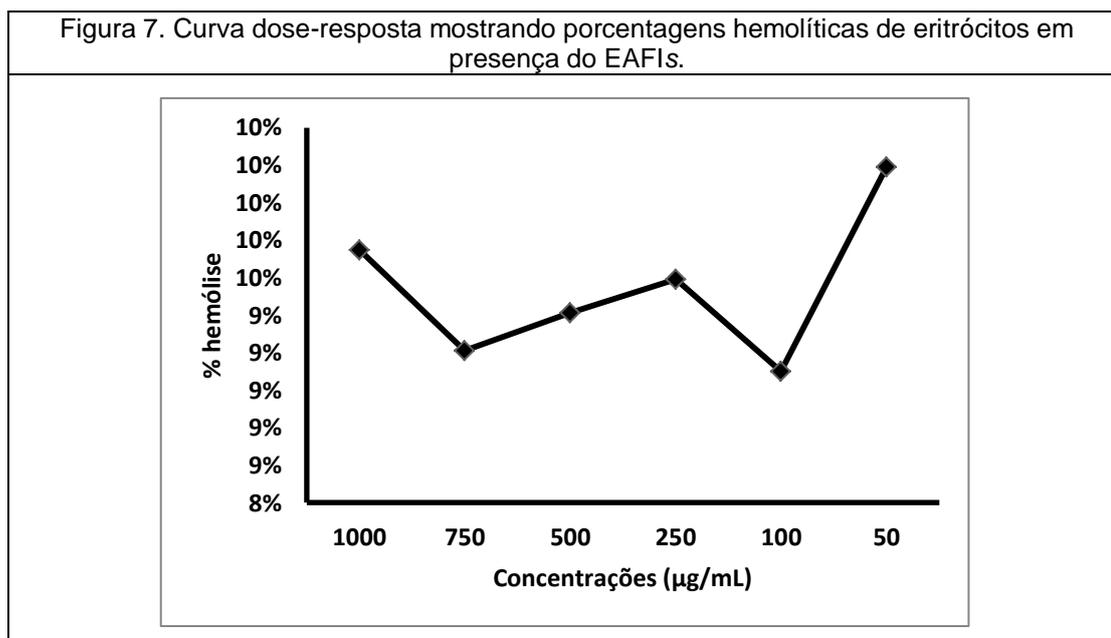
A tabela 1 representa o efeito do EAFIs nas diferentes concentrações (50µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL, 1000µg/mL), submetido ao ensaio da fragilidade osmótica frente a sangue de carneiro. O resultado do efeito do EAFIs nas concentrações repetidas sobre sangue de carneiro foi avaliado qualitativamente, a ação hemolítica no sobrenadante que permaneceu transparente enquanto que no precipitado não apresentou hemólise das células, caracterizando integridade das hemácias, sendo similar ao controle negativo. Em relação ao controle positivo, sobrenadante apresentou tonalidade avermelhada caracterizando ação hemolítica.

Tabela 1: Avaliação da ação hemolítica do EAFIs.

Tratamento	Concentrações (µg/mL)	Hemólise
EAFIs	1000 µg/mL	-
EAFIs	750 µg/mL	-
EAFIs	500 µg/mL	-
EAFIs	250 µg/mL	-
EAFIs	100 µg/mL	-
EAFIs	50 µg/mL	-
Controle (+)	Água destilada	++
Controle (-)	Cloreto de sódio 0,9 %	-

Legenda (-) ausência de hemólise, (+) ligeira hemólise, (++) hemólise significativa, (+++) hemólise intensa.

A figura 7 expressa a curva resposta nas diferentes concentrações (50µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL, 1000µg/mL) do EAFIs na leitura do espectrofotômetro onde o sobrenadante permaneceu entre 9-10% apresentando baixas porcentagens de hemólise. Caracterizando que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas.



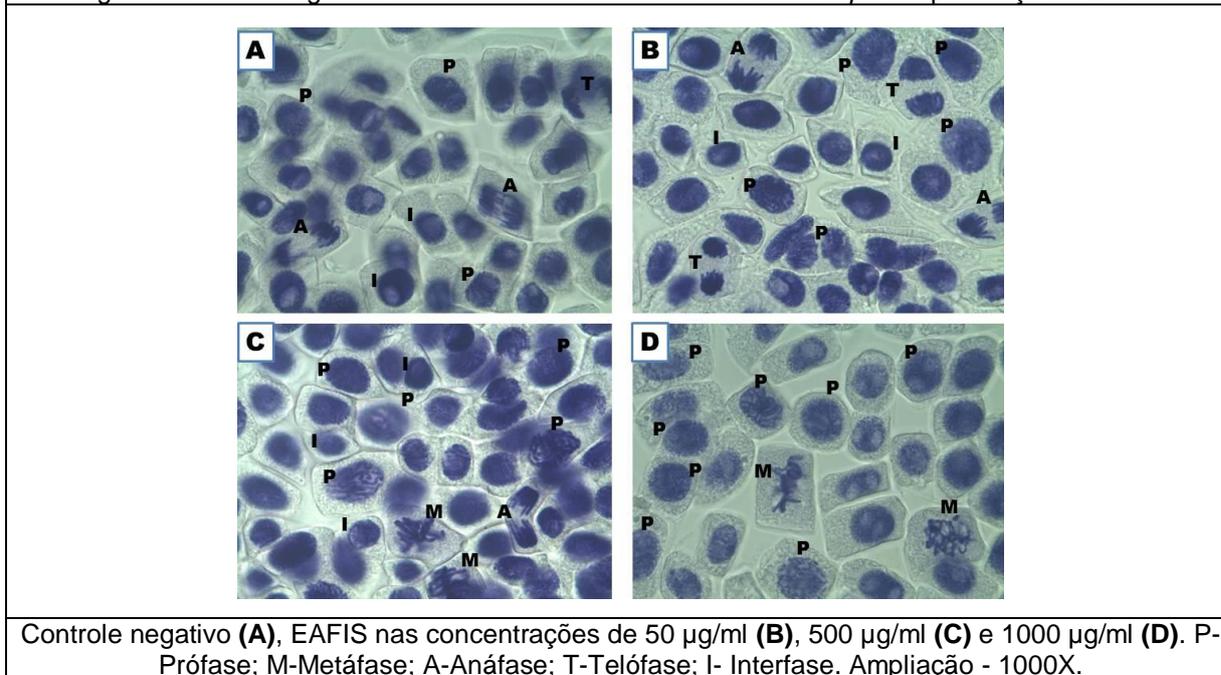
4.1.2 Ensaio *Allium cepa*

Além dos parâmetros da citologia comum, tais como índice mitótico e anormalidade dos cromossomos, o parâmetro macroscópico do crescimento radicular de *Allium cepa* foi também investigado. A Tabela 2 mostra os resultados do índice mitótico, atividade mitótica e anormalidades cromossômicas que não foram encontradas no meristema de *Allium cepa* sobre os diferentes tratamentos. A análise estatística não indicou nenhuma mudança na atividade mitótica. O efeito citológico examinado do grupo controle durante o processo da divisão celular apresentou percentuais: prófase (8,8%), metáfase (1,8%), anáfase (1,9%), telófase 0,8%), em relação às concentrações de 50 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL do EAFIs nas durante a divisão celular: prófase (13,5%;19,8; 16,3); metáfase (2,4 %; 1,4%; 1,0%) anáfase (0,9%; 09 %; 0,2%) e telófase (0,7; % 0,6%; 0,3%) respectivamente. Por sua vez o índice mitótico não apresentou diferença entre os percentuais dos tratamentos: controle (13,3%) e EAFIs nas concentrações de 50 µg/mL (17,2%), 500 µg/mL (22,7%) e 1000µg/mL (17,8%).

Tabela 2 - Efeito citológico do EAFIs durante o processo de divisão celular da raiz de *Allium cepa*.

Tratamento	Total de células examinadas	Total mitose	MI %	Prófase e %	Metáfase %	Anáfase e %	Telófase %	Total de interfase
Controle	1000	113	13,3	8,8	1,8	1,9	0,8	877
50 µg/mL	1000	175	17,5	13,5	2,4	0,9	0,7	878
500 µg/mL	1000	227	22,7	19,8	1,4	0,9	0,6	806
1000µg/mL	1000	188	17,8	16,3	1,0	0,2	0,3	804

Observações citológicas das células durante as fases de divisão celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) das raízes de *Allium cepa* do controle em relação às diferentes concentrações do EAFIs foram similares. Não foi encontrada nenhuma anormalidade cromossômica ou alteração nas fases das divisões celulares (Figura 8).

Figura 8. Fotomicrografias das células das radículas de *Allium cepa* em presença do EAFIs.

A tabela 3 mostra os resultados do efeito do EAFIs no crescimento das raízes de *Allium cepa*. A análise estatística indicou que houve diferença entre os grupos tratados e controle. O crescimento das raízes do controle negativo ($4,06 \pm 0,85$), quando comparado com o extrato na concentração de 50 µg/mL ($4,68 \pm 1,85$) não

apresentou diferença significativa. Contudo em relação às concentrações de 500 µg/mL ($1,23 \pm 0,37$) e 1000 µg/mL ($0,7 \pm 0,33$) apresentou inibição do crescimento ($p > 0,05$). Por outro lado a de 50 µg/mL ($4,68 \pm 1,85$) apresentou crescimento similar ao controle ($4,06 \pm 0,85$) sugerindo baixo nível de citotoxicidade. Contudo o extrato na concentração de 50 µg/mL em relação às 500 µg/mL e 1000 µg/mL apresentou um desenvolvimento radicular.

Tabela 3. Efeitos do EAFIs sobre o crescimento das raízes de *Allium cepa*.

Tratamento	Comprimento médio da raiz (+ SD) no tempo:96 hs
Controle	$4,06 \pm 0,85$
50 µg/mL	$4,68 \pm 1,85$
500 µg/mL	$1,23 \pm 0,37$
1000 µg/mL	$0,7 \pm 0,33$

4.2 ESTUDO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *AEDES AEGYPTI*

4.2.1 Efeitos de *I. suffruticosa* no desenvolvimento físico do aparelho reprodutor de machos de *Ae. aegypti*

O resultado do desenvolvimento dos testículos durante a fase larval de *Ae. aegypti* em presença do EAFIs nas diferentes concentrações (50µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) encontram-se expressos na figura 9 e 10.

O volume dos testículos na fase larval de *Ae. aegypti* em a presença do EAFIs ($0,046 \pm 0,003$; $0,059 \pm 0,006$; $0,076 \pm 0,009$; $0,057 \pm 0,004$, respectivamente) quando comparado ao controle ($0,058 \pm 0,007$) não houve diferença significativa entre os tratamentos, $p > 0,05$. A assimetria dos testículos na fase larval de *Ae. aegypti* em presença do EAFIs ($0,021 \pm 0,004$; $0,029 \pm 0,008$; $0,033 \pm 0,009$; $0,022 \pm 0,005$, respectivamente) quando comparado ao controle ($0,026 \pm 0,009$) não houve diferença significativa entre os tratamentos, $p > 0,05$.

Figura 9. Efeito do EAFIs durante o desenvolvimento dos testículos nas larvas L4 de *Ae. aegypti*.

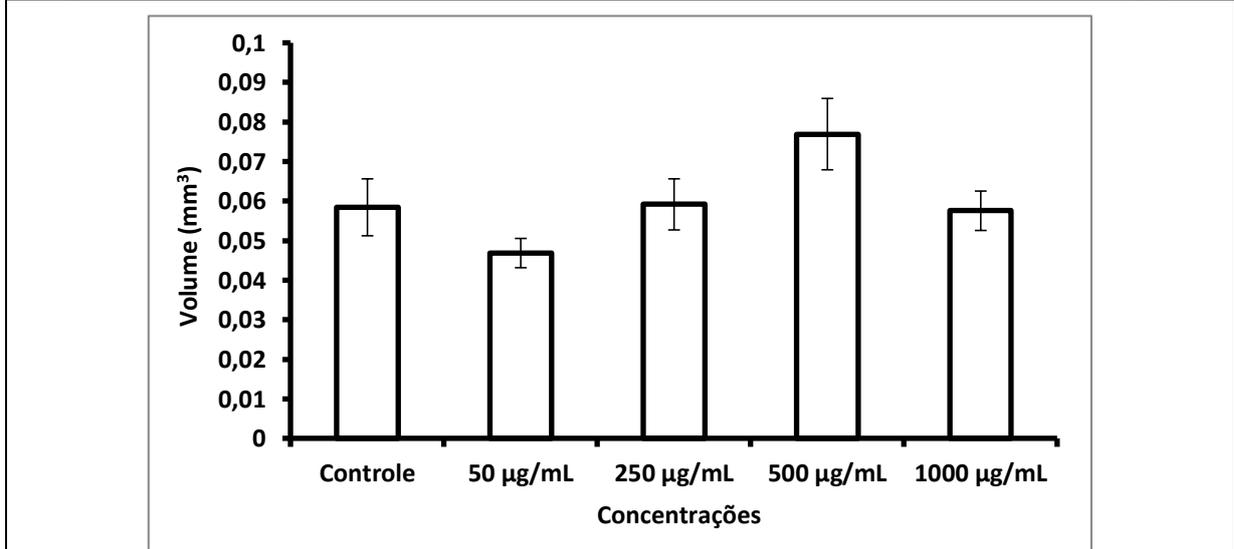
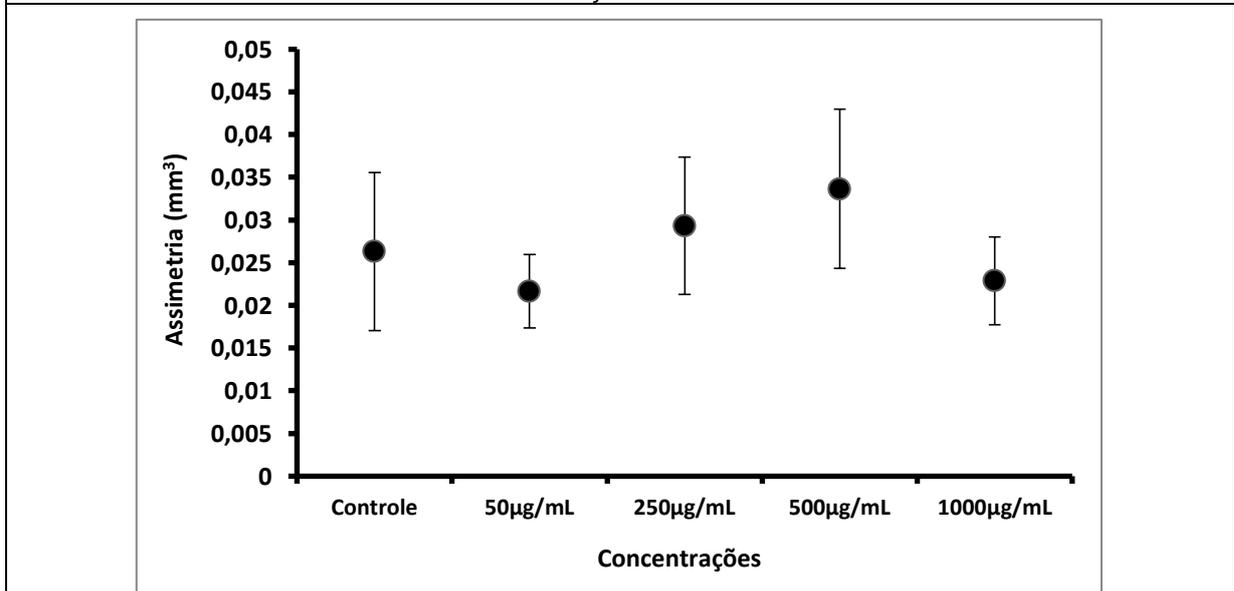
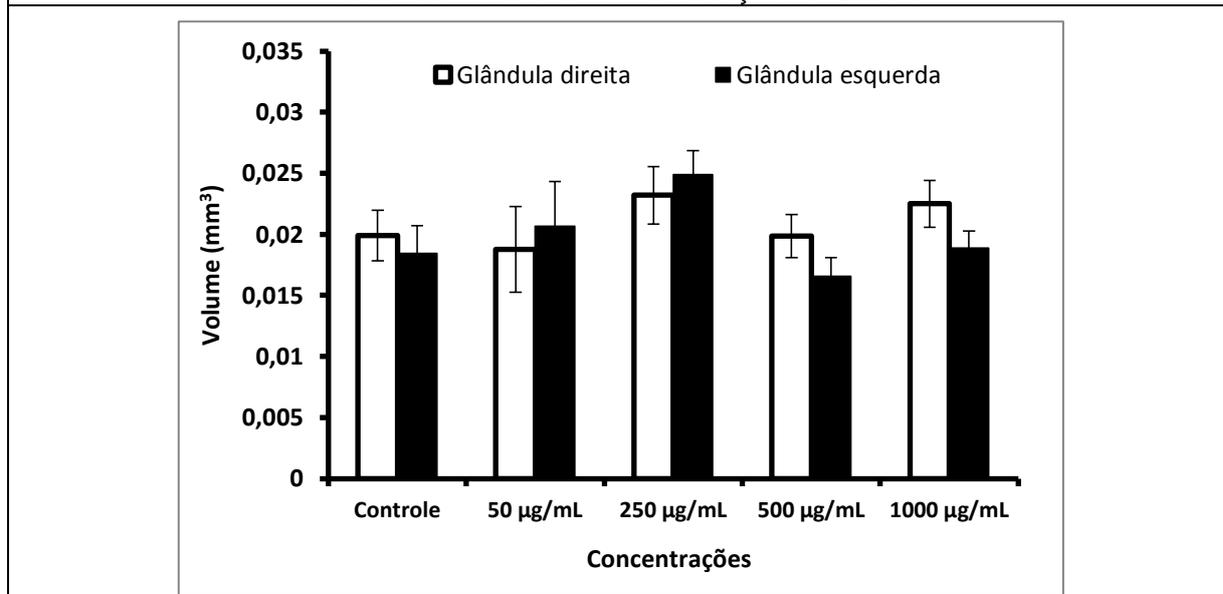


Figura 10. Assimetria dos testículos durante a fase larval de *Ae. aegypti* submetidos a diferentes concentrações do EAFIs.



O resultado do desenvolvimento das glândulas durante a fase larval de *Ae. aegypti* em presença do EAFIs nas diferentes concentrações (50µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) encontram-se expressos na figura 11. O volume das glândulas durante a fase larval de *Ae. aegypti* em presença do EAFIs (0,019±0,002; 0,024±0,001; 0,018±0,001; 0,020±0,001, respectivamente) em relação ao controle (0,019±0,001) não apresentaram diferença significativa no volume entre os tratamentos, $p>0,05$.

Figura 11. Volume das glândulas acessórias direita e esquerda de durante a fase larval *Ae. aegypti* submetidos a diferentes concentrações do EAFIs.



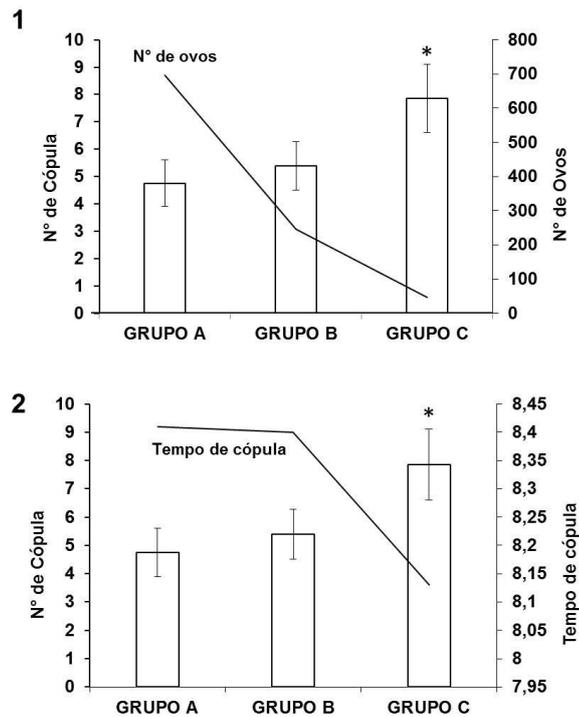
4.2.2 Ação de *I. suffruticosa* no comportamento reprodutivo de machos de *Ae. aegypti*

Os resultados do comportamento reprodutivo do *Ae. aegypti* em presença do EAFIs na concentração de 500 µg/mL com diferentes formas de tratamentos estão expressos na figura 12 1 e 2. Grupo A – machos sem exposição do EAFIs; grupo B – Machos, após a exposição de 24hs do EAFIs foi realizado a cópula - grupo C – Machos, após a exposição de 24hs do EAFIS + presença do EAFIs na gaiola durante a cópula.

A presença dos voláteis do extrato (Grupo B e C) gerou aumento significativo no número de cópulas (Figura 12.1) nos tratamentos onde os machos foram expostos ao extrato antes e durante dos eventos copulatórios ($p= 0,0004$). Contudo, a exposição ao extrato, no Grupo B e C, não alterou o tempo de duração de cópula, em comparação com o Grupo A ($p= 0,9$) (Figura 12.2).

O aumento significativo do número de cópulas no grupo C resultou em uma drástica diminuição no número de ovos colocados pelas fêmeas (12.2). A quantidade de ovos totais colocados pelo Grupo A, Grupo B e Grupo C foi de 696, 245 e 46 respectivamente (Figura 12.2).

Figura 12 (1,2). Comportamento reprodutivo do *Ae. Aegypti* exposto aos voláteis do EAFIs.



Grupo A – machos sem exposição do EAFIs; grupo B – Machos, após a exposição de 24hs do EAFIs foi realizado a cópula - grupo C – Machos, após a exposição de 24hs do EAFIs + presença do EAFIs na gaiola durante a cópula. (1) Número de cópulas e oviposição. (2) Número de cópulas e tempo de cópula. (*) Indica diferença significativa ($p < 0.05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES: ENSAIO DE FRAGILIDADE OSMÓTICA E ENSAIO *Allium cepa*

O resultado do efeito do EAFIs nas concentrações repetidas sobre o sangue de carneiro foi avaliado qualitativamente sua ação hemolítica, com relação ao sobrenadante os valores ficaram entre 9-10%, com baixo índice de hemólise, enquanto no precipitado não apresentou hemólise das células, caracterizando integridade das hemácias, sendo similar ao controle. De acordo com Rangel *et al.*, (1997), o percentual de hemólise entre 0-40% é caracterizado como baixo, entre 40-80% considerado moderado e acima de 80% considerado como alto. No presente estudo a porcentagem de hemólise foi considerada baixa, visto que, não passou de 10%, sugerindo integridade da membrana celular.

Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar as concentrações e o tempo de exposição necessário para que os agentes tóxicos possam produzir efeitos adversos sobre os organismos (BRAGA *et al.*, 2015). É comumente utilizado o teste *Allium cepa* em ensaios toxicológicos, em estudos utilizando extratos vegetais, para avaliação de parâmetros macroscópicos como alteração da cor, formato, tamanho da raiz como também parâmetros microscópicos como alterações durante o processo de divisão das células meristemáticas de cebola (LONGHIN, 2008).

Os parâmetros como o índice mitótico e anormalidade dos cromossomos das células durante o processo de divisão celular das radículas do *Allium cepa* não indicou nenhuma mudança na atividade mitótica em relação aos grupos controle e o tratado com o extrato. Como também não apresentou diferença significativa entre o índice mitótico. Não foi encontrada nenhuma anormalidade cromossômica ou alteração nas fases das divisões celulares. O parâmetro macroscópico do crescimento radicular de *Allium cepa*, nas maiores concentrações (500 µg/mL e 1000 µg/mL) do extrato apresentou inibição do desenvolvimento das raízes, quando comparado com a menor concentração (50 µg/mL) que apresentou crescimento das radículas similar ao do controle. Sugerindo um desenvolvimento radicular com baixo nível de toxicidade.

Em estudo relatado na literatura sobre a toxicidade aguda com camundongos albinos *swiss* utilizando extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*, demonstrou baixa

ordem de toxicidade (Leite et al., 2003). Embriões de camundongos cultivados na presença de 5mg/mL de extrato apresentaram desenvolvimento do estágio de mórula e blastocisto representando 73,03% de formas viáveis, quando comparado com de 10mg/mL, os quais não apresentaram desenvolvimento embrionário a partir de dois blastômeros (Leite et al., 2004). Camundongos portadores de sarcoma 180 apresentaram inibição tumoral com baixa ordem de toxicidade quando tratados com o extrato na dose de 50 mg/kg (ip) por infusão (64,53%) e maceração (62,62%) (Vieira et al., 2007).

5.2 ESTUDO DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Aedes aegypti*

O estudo do efeito do EAFIs nas diferentes concentrações quando expostos na fase larval (L4) dos mosquitos de *Ae. aegypti* não apresentou alterações morfológicas no aparelho reprodutor. Foi constatado que o volume e assimetria dos testículos, como também o volume das glândulas acessórias não apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$).

Extratos vegetais podem apresentar efeitos esterilizantes em insetos, especialmente afetando a morfologia e volume testicular (NAIR e THOMAS 2001; ARORA e DIMAN, 2018). Extratos de *I. suffruticosa* apresentaram efeitos sobre a oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti*, e as principais causas são atribuídas a seu efeito em interrupção da divisão celular (VIEIRA et al., 2012). Testículos afetados por extratos vegetais, como o nim, apresentam-se reduzidos em função do crescimento desorganizado do conteúdo celular, com a consequente redução de espermátocitos e espermatogônias (GHAZAWI et al., 2007). Apesar do efeito que *I. suffruticosa* apresenta no desenvolvimento ovariano em fêmeas, o extrato não influencia o crescimento testicular ou do crescimento das glândulas acessórias, uma vez que não houve diferenças no volume ou crescimento assimétrico em larvas L4 expostas aos extratos brutos.

Os voláteis do extrato são capazes de afetar o comportamento reprodutivo e a oviposição de *Ae. aegypti*. Os machos adultos expostos aos voláteis do extrato por 24h e durante a cópula apresentaram um número significativamente maior de cópulas do que o grupo controle e do que adultos que foram expostos ao extrato por 24h antes da cópula. Os voláteis produzidos pelo extrato não influenciam no comportamento se ele não está presente no momento da cópula. O aumento do

número de cópulas na presença dos voláteis pode ter induzido um comportamento atípico, onde o macho aumenta sua frequência de cópulas diante de um ambiente adverso (presença de voláteis do extrato), de forma a tentar otimizar seu sucesso reprodutivo. Esse fenômeno, onde há estimulação da “performance” de um organismo por pequenas exposições a agentes que seriam prejudiciais ou tóxicos a níveis altos de exposição, é conhecido como hormese (FORBES, 2000). A hormese é baseada no Princípio de Alocação (SIBLY e CALOW, 1986). Esse princípio diz que há trocas na alocação de fontes entre diferentes processos fisiológicos, ou seja, o incremento de algum processo é contraposto a uma diminuição da alocação de recursos energéticos de outro.

Quando casais estiveram expostos ao extrato de *I. suffruticosa*, houve drástica redução na oviposição. Há duas hipóteses para explicar este resultado, uma baseada nos efeitos do volátil sobre o macho, e outra sobre a fêmea. Se o efeito do volátil afetou o macho, então pode-se supor que o volátil afetou a transferência de espermatozoides no ejaculado durante a cópula. Proteínas produzidas nas glândulas acessórias (mRGPs para proteínas de glândulas reprodutivas masculinas) de *Ae. aegypti* e transferido para fêmeas durante o acasalamento, influenciam o comportamento reprodutivo e alimentar (KLOWDEN, 1999). Estas proteínas podem induzir refratariedade, aumento na taxa de produção de ovos, e alteração no comportamento de alimentação e longevidade de fêmea de *Drosophila* (WIGBY e CHAPMAN, 2005; CARVALHO et al., 2006); estimular a ovulação (HEIFETZ et al., 2000); ou comprometer a qualidade do armazenamento de espermatozoides (MUELLER et al., 2007). Os voláteis do extrato também podem ter influenciado os produtos da glândula acessória, afetando a produção das proteínas do fluido seminal masculino que auxiliam no deslocamento do espermatozóide (FIUMERA, DUMONT e CLARK, 2007; MUELLER, 2008).

Se os voláteis afetaram as fêmeas, pode ter comprometido a escolha da fêmea em utilizar os espermatozoides transferidos para fecundação, resultando em uma menor taxa de oviposição. As proteínas sintetizadas no trato reprodutor masculino desempenham um papel na regulação da fisiologia pós-acasalamento das fêmeas em outros artrópodes, incluindo moscas, mariposas e carrapatos (NELSON et al., 1969; WEISS e KAUFMAN, 2004). Óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais são capazes de interferir na fecundidade e fertilidade das fêmeas, reduzindo a eclosão de ovos e a oviposição (BENELLI, 2015). O efeito do

volátil na fecundidade da fêmea permaneceu mesmo depois da exposição, e seus efeitos ainda se mantiveram mesmo depois do repasto sanguíneo, visto que, a oviposição foi dada em ambiente onde não havia extrato disponível.

Estes conhecimentos poderão auxiliar no emprego de táticas de controle, reduzindo os custos de produção e o impacto negativo de táticas de controle agressivas ao meio ambiente e ao homem. Estudos a respeito das estruturas reprodutoras e do processo de reprodução podem contribuir para ampliação dos conhecimentos sobre biologia, comportamento e técnicas de manejo de uma praga (PARRA, 2000).

6 CONCLUSÕES

Concluindo-se que o EAFIs demonstrou baixo índice de hemólise e ausência de anormalidade cromossômica ou alteração nas fases das divisões celular, sugerindo integridade da membrana celular e baixo nível de toxicidade.

O estudo do efeito do EAFIs nas diferentes concentrações quando expostos na fase larval (L4) dos mosquitos de *Ae. aegypti* não apresentou alterações morfológicas no aparelho reprodutor.

Com relação ao comportamento as exposições do EAFIs aos machos os afetam, de forma que, as fêmeas copuladas com ele tem sua fecundidade reduzida. Quando adultos estão expostos aos voláteis do extrato, há uma maior frequência de cópula por parte dos machos, mas que se traduz numa baixa fecundidade nas fêmeas.

REFERÊNCIAS

- ALFONSO-PARRA, C., AHMED-BRAIMAH Y. H., DEGNER, E. C., AVILA, F. W., VILLARREAL, S. M., PLEISS, J. A., WOLFNER, M. F., HARRINGTON, L. C. Mating-Induced Transcriptome Changes in the Reproductive Tract of Female *Aedes aegypti*. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 10, p. 01-24, 2016.
- ALMEIDA, G., PAULO, A. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal, desafios para o século XXI. **Acta Medica Portuguesa**. v. 24, n. 6, p. 961-974, 2011.
- ARORA, Pooja, DHIMAM, S. C. Effect of two plant extracts, *Azadirachta indica* A. Jugs and *Ocimum sanctum* L. on morphohistology of reproductive organs of *Odontopus nigricornis* Stal. **International Journal of Research in Applied**. v. 6, n. 7, p. 19-26, 2018.
- AVILA, F. W., SIROT, L. K., LAFLAMME, B. A., RUBINSTEIN, C. D., WOLFNER, M. F. Insect seminal fluid proteins: Identification and function. **Annual Review of Entomology**. v. 56, p. 21–40, 2011.
- BAR, A., ANDREW, J. Morphology and morphometry of *Aedes aegypti* larvae. **Annual Review and Research in Biology**. v. 3, n. 1, p. 01-21, 2013.
- BEKLEMISHEV, W. N. Gonotrophic rhythm as a basic principle of the biology of *Anopheles*. **Vopr Fiziol Ekol Malar Komara**. v. 1, p. 3-22, 1940.
- BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology research**. v. 114, n. 8, p. 2801-2805, 2015.
- BRADY, O. J., JOHANSSON, M. A., GUERRA, C. A., BHATT, S., GOLDING, N., PIGOTT, D. M., DELATTE, H., GRECH, M. G., LEISNHAM, P. T., FREITAS, R. M., STYER, L. M., SMITH, D. L., SCOTT, T. W., GETHING, W. P., HAY, S. I. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. **Parasit Vectors**. v. 6, pp. 351, 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução** – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.
- CARVALHO, G. B., KAPAHI, P., ANDERSON, D. J., BENZER, S. Allocrine modulation of feeding behavior by the Sex Peptide of *Drosophila*. **Current Biology**. v. 16, n. 7, p. 692–696, 2006.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T., BANGS, M. J., SUWONKERD, W., KONGMEE, M., CORBEL, V., NGOEN-KLAN, R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. **Parasites & Vectors**. v. 6, p. 01-28, 2013.

CHAMBERS, J. **Software for data analysis: programming with R**. Springer Science & Business Media. 2008.

CHEN, TZY-YEN., SUN, HAI-LUN., YAO, HSIEN-TSUNG., LII, CHONG-KUEI., CHEN, HAW-WEN., CHEN, PEI-YIN., LI, CHIEN-CHUN., LIU, KAI-LI. Suppressive effects of *Indigofera suffruticosa* Mill extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**. v. 55, p. 257-264, 2013.

COURET, J., BENEDICT, M. Q. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **BioMed Central Ecology**. v. 14, n. 3, p. 1-15, 2014.

DIAS, C. N., MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**. v. 113, n. 2, p. 565- 592, 2014.

FARIAS, D. F., CAVALHEIRO, M. G., VIANA, M. P., QUEIROZ, V. A., ROCHABEZERRA, L. C. B., VASCONCELOS, I. M. Extratos de sementes de leguminosas brasileiras como fontes ricas de compostos larvicida contra *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 82, n. 3, 585-594, 2010.

FERREIRA, A. L., COLA, M., BASBASTEFANO, V., SILVA, E. F., CALVO, T. R., ALMEIDA, A. B. A., PELLIZZOND, C. H., LIMA, C. A. H., VILEGAS, W., BRITO, A. R. M. S. *Indigofera suffruticosa* Mill as new source of healing agent: Involvement of prostaglandin and mucus and heat shock proteins. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, n. 1, p. 192–198, 2011.

FIGUEIREDO, A. P. M., MEDEIROS, R. M. T., DANTAS, F. P. M., LEITE, A. L. D., FIGHERA R. A., CORREA, F. R. Intoxicação experimental por *Indigofera suffruticosa* em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 2, p. 126-130, 2012.

FIUMERA, A. C., DUMONT, B. L., CLARK, A. G. Associações entre competição espermiática e variação natural em genes reprodutivos masculinos no terceiro cromossomo de *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. v. 176, n. -, p. 1245-1260, 2007.

FONSECA, M. C. M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Mediciniais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

FORBES, V. E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**. v. 14, n. 1, p. 12-24, 2000.

FORZZA, R. C. BAUMGRATZ, J. F. A., BICUDO, C. E. M., CARVALHO JR., A. A., COSTA, A., COSTA, D. P., HOPKINS, M., LEITMAN, P. M., LOHMANN, L. G., MAIA, L. C., MARTINELLI, G., MENEZES, M., MORIM, M. P., COELHO, M. A. N., PEIXOTO, A. L., PIRANI, J. R., PRADO, J., QUEIROZ, L. P., SOUZA, V. C., STEHMANN, J. R., SYLVESTRE, L. S., WALTER, B. M. T., ZAPPI, D. (Orgs.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. v.2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, 875p.

GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., SILVA, L. M. G. E., SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvídica contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**. v. 5, p. 363-393, 2013.

GHAZAWI, A. N., EL-SHRANOUBI, E. D., EL-SHAZLY, M. M., ABDEL-RAHMAN, A. Efeitos da mortalidade por azadirachtinon e sistema reprodutivo do gafanhoto, *Heteracris littoralis* Rambo. (Orthoptera: Acrididae). **J. Orthoptera Res.** v. 16, p. 57-65, 2007.

HEIFETZ, Y., LUNG, O., FRONGILLO JR, E. A., WOLFNER, M. F. The *Drosophila* seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary. **Current Biology**. v.10, n. 2, p. 99–102, 2000.

HELINSKI, M. E., HARRINGTON, L. C. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. **Journal of medical entomology**. v. 48, n. 2, p. 202- 211, 2011.

HERMAWAN, W., TSUKUDA, R., FUJISAKI, K., KOBAYASHI, A., NAKASUJI, F. Influence of Crude Extracts from a Tropical Plant, *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), on Suppression of Feeding by the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) and Oviposition by the Azuki Bean Weevil *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology and Zoology**. v. 28, n. 2, p. 251-254, 1993.

HUSSEIN, K. T. Pathological alterations in the ovaries of *Culex pipiens* induced by fixed oil extracts from *Thevetia peruviana*, *Datura stramonium* and *Acacia sp.* **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. v. 29, n. 3, p. 997-1005, 1999.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annu. Rev. Ent.** v. 51, n. -, p. 45-66, 2006.

ISMAN, M. B., GRIENEISEN, M. L. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. **Trends Plant Science**. v.19, p. 140-145, 2014.

JOSEPH, M., MUKHERJEE, S. N., SHARMA, R. N. Growth inhibition and impairment of reproductive potential in *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae)

by commercially available plant extracts. **International Journal of Tropical Insect Science**. v. 15, n. 2, p. 197-202, 1994.

KARNAVAR, G. K. Influence of azadirachtin on insect nutrition and reproduction. *Proceedings: Animal Sciences*. v. 96, n. 3, p. 341-347, 1987.

KLOWDEN, M. J. The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. **Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News**. v. 15, n. -, p. 213-220, 1999.

LEHANE, M. J. *Biology of Blood-Sucking Insects*. First Edition, Chapman and Hall, London, 1991. 288p.

LEITE, S. P., SILVA, L.L.S., CATANHO, M. T. J. A., LIMA, E. O., LIMA, V. L. M. Anti-inflammatory Activity of *Indigofera suffruticosa* Extract. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 7, n. 1, p. 47-52, 2003.

LEITE, S. P., MEDEIROS, P. L., SILVA, E. C., MAIA, M. B. S., LIMA, V. L. M., SAUL, D. E. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**. v. 18, p. 701-705, 2004.

LEITE, S. P., VIEIRA, J. R. C., MEDEIROS, P. L., LEITE, R. M. P., LIMA, V. L. M., XAVIER, H. S., LIMA, E. O. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 3, n. 2, p. 261-265, 2006.

LIMA, I. R., VIEIRA, J. R. C., SILVA, I. B., LEITE, R. M. P., MAIA, M. B. S., LEITE, Sônia P. Indican from Anil (*Indigofera suffruticosa* Miller): An herbal protective agent in liver. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**. v. 36, n. 1, p. 01-23, 2014.

LUNA, J. S., SANTOS, A. F., LIMA, M. R. F., OMENA, M. C., MENDONÇA, F. A. C., BIEBER, L. W. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacology**. v. 97, n. -, p. 199- 206, 2005.

MEIADO M. V., SILVA, F.F.S., BARBOSA, D. C. A, SIQUEIRA, E., FILHO, J. A. Diaspore of the Caatinga: A Review. v. 1. In: Siqueira Filho JA (Org.). **Flora of the Caatingas of the São Francisco River: Natural History and Conservation**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial. p. 306- 365, 2012.

MOURA, A. C. S, VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (FABACEAE) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicular. **Química Nova**. v. 34, n. -, p. 1136-1140, 2011.

MUELLER, J. L., PAGE, J. L., WOLFNER, M. F. An ectopic expression screen reveals the protective and toxic effects of *Drosophila* seminal fluid proteins. **Genetics**. v. 175, n. 2, p. 777–783, 2007

MUELLER, J. L., LINKLATER, J. R., RAVI RAM, K., CHAPMAN, T., WOLFNER, M. F. Deleção do gene alvo e análise fenotípica do inibidor da protease do fluido seminal *Drosophila melanogaster* Acp62F. **Genetics**. v. 178, n. -, p. 1605–1614, 2008.

NAIR, S., THOMAS, J. Evaluation of the chemosterilant effect of *Acorus calamus* L. extracts on melon fly, *Bactrocera cucurbitae* Coq. **Journal of Tropical Agriculture**. v. 39, n. -, p. 145-148, 2006.

NELSON, D., ADAMS, T., POMONIS, J. Initial studies on the extraction of the active substance inducing monocoitic behavior in house flies, black blow flies, and screw-worm flies. **Journal of economic entomology**. v. 62, p. 634–639, 1969.

NELSON, M. J. *Aedes aegypti*: **Biology and Ecology**, Pan American Health Organization, Washington, DC, PNSP/86-63, pp. 50, 1986.

OFUYA, T. I., OKUKU, I. E. Insecticidal effect of some plant extracts on the cowpea aphid *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). **Anzeiger für Schädlingkunde**, v. 67, n. 6, p. 127-129, 1994.

OLIVA, C. F., DAMIENS, D., BENEDICT, M. Q. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. **Acta Tropica**. v. 132, p. 12-19, 2014.

PARRA, J. R. P. *A biologia de insetos e o manejo de pragas: da criação em laboratório à aplicação em campo*. In: Guedes, J. V. C.; Costa, I. D.; Castiglioni, E. Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: UFSM. v. 1, p. 1-29, 2000.

PICANÇO, M. C. *Manejo Integrado de Pragas*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG – 2010.

PITTS, J., LIUA, C., ZHOUA, X., MALPARTIDA, J. C., ZWIEBIEL, L. Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 111, n. 7, p. 2566-2571, 2014.

REMBOLD, H., K.P. SIEBER. Inhibition of oogenesis and ovarian ecdysteroid synthesis by azadirachtin in *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). **Z. Naturforsch.** v. 36, n. 5-6, p. 466-469, 1981.

RIBEIRO, A. S., SOUTO, A. C. G., RODRIGUES, G. G. **Uso das Plantas pelas comunidades do Sertão do Pajeú: um enfoque etnobotânico.** In: Ana Lucia Candeias. (Org.). Algumas Práticas de Tecnologias Sociais na Região do Alto Pajeú Pernambuco. 1ed. Recife: Editora Universitária UFPE – Edufpe. v. 1, n. -, p. 190-207, 2015.

RODRIGUES, A. R. S. **Caracterização da resistência de joaninhas predadoras ao lambda cialotrina.** 2012. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 162p.

RUEDA, L. M. *Global diversity of mosquitoes* (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. In: Freshwater Animal Diversity Assessment. **Springer Netherlands.** v. 1, p. 477-487, 2008.

SALVADOR, I. S., MEDEIROS, R. M. T., PESSOA, C. R. M., DANTAS, A. F. M., JÚNIOR, G. R., CORRE, F. R. Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 30, n. 11, p. 953-957, 2010.

SANTANA, M. A. N., SILVA, I. B., LIMA, I. R., VIEIRA, J. R. C., LEITE, R. M. P., LEITE, S. P. Histomorphometric analysis in kidney tissue of mice treated with *Indigofera suffruticosa* Mill. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** v. 7, n. 9, p. 12-18, 2015.

SANTOS, S. R., SILVA, V. B., MELO, M. A, BARBOSA, J. D., SANTOS, R. L., SOUSA, D. P. , CAVALCANTI, S. C. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases.** v. 10, n. -, p. 1049–1054, 2010.

SANTOS, S. R., MELO, M. A., CARDOSO, A. V., SANTOS, R. L., SOUSA, D. P., CAVALCANTI, S. C. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere.* v. 84, n. -, p. 150–153, 2011.

SCHAPER, S., HERNANDEZ-CHARVARRIA, F. Scanning electron microscopy of the four larval instars of the Dengue fever vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista de Biologia Tropical.** v. 54, n. 3, p. 847-852, 2006.

SERVICE, M. Medical Entomology for Students, 5 ed., Cambridge University Press, New York, pp. 303. In: Severson, D. W., Behura, S. K. Mosquito genomics: Progress and challenges. **Annual Review of Entomology.** v. 57, p. 143-166, 2012.

SIBLY, R. M., CALOW, P. **Physiological ecology of animals - an evolutionary approach.** Blackwell, Scientific Publications. Oxford. 179p. 1986.

SIROT, L. K., POULSON, R. L., MCKENNA, M. C., GIRNARY, H., WOLFNER, M. F., HARRINGTON, L. C. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: Potential tools for control of female feeding and reproduction. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 38, n. 2, p. 176-189, 2008.

SREELATHA, K. B., GEETHA, P. R. Histomorphological derangements in the ovary of *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae) treated with methanolic extract of *Annona squamosa* leaves. **Entomon**. v. 33, n. 2, p. 107-112, 2008.

SRITABUTRA, D., SOONWERA, M. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 3, n. 4, p. 271-276, 2013.

SUMMARWAR, S., PANDEY, J., LALL, D. Morphological abnormalities induced by plant extracts on development stages of *Spodoptera litura*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v. 4, p. 15-17, 2016.

TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N., BARRETO, M. L. E o dengue continua desafiando e causando perplexidade. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 27, p. 828-829, 2011.

TYAGI, B. K., MUNIRATHINAM, A., VENKATESH, A. A *catalogue* of Indian mosquitos. **International Journal of Mosquito Research**. v. 2, p. 50-97, 2015.

TUROLLA, M. S. R., NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

OFUYA, T. I., OKUKU, I. E. **Insecticidal effect of some plant extracts on the cowpea aphid *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae)**. Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz. v. 67, n. 6, p. 127-129, 1994.

VALOTTO, C. F. B., SILVA, H. H. G. D., CAVASIN, G., GERIS, R., RODRIGUES-FILHO, E., SILVA, I. G. D. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 2, p. 01-07, 2011.

VIEIRA, J. R. C., SOUZA, I. A., NASCIMENTO, S. C., LEITE, S. P. *Indigofera suffruticosa*: Alternative Anticancer Therapy. **eCAM**. v. 4, n. 3, p. 355-359, 2007.

VIEIRA, J. R. C., LEITE, R. M. P., LIMA, I. R., NAVARRO, D. A. F., BIANCO, E. M., LEITE, S. P. Oviposition and Embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on Early Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)**. v. 12, p. 01-05, 2012.

WEISS, B. L., KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, n. 16, p. 5874–5879, 2004.

WHEELER, D. The role of nourishment in oogenesis. *Annual Review of Entomology*. v. 41, n. -, p. 407-431, 1996.

WIGBY, S., CHAPMAN, T. Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. **Current Biology**. v. 15, n. 4, p. 316–321, 2005.

ANEXO A – FICHA CATALOGRÁFICA HERBÁRIO UFP-UFPE

