

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Harry Luiz Pilz Júnior

**ESTUDO DE UM NOVO FORMULADO A BASE DE LIQUIDOS IÔNICOS PARA O
CONTROLE DE MOSQUITOS**

Porto Alegre

2023

Harry Luiz Pilz Júnior

**ESTUDO DE UM NOVO FORMULADO A BASE DE LIQUIDOS IÔNICOS PARA O
CONTROLE DE MOSQUITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a Dr^a Onilda Santos da Silva
Coorientador(a):
Prof^a Dr^a Gertrudes Corção
Prof Dr. Henri Stephan Schrekker

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Pilz Júnior, Harry Luiz
ESTUDO DE UM NOVO FORMULADO A BASE DE LIQUIDOS
IÔNICOS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS / Harry Luiz Pilz
Júnior. -- 2023.
116 f.
Orientadora: Onilda Santos da Silva.

Coorientadoras: Henri Stephan Schrekker, Gertrudes
Corção.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Aedes. 2. Microbiota. 3. Sais imidazólicos. 4.
Culex. 5. Vetores. I. Santos da Silva, Onilda, orient.
II. Schrekker, Henri Stephan, coorient. III. Corção,
Gertrudes, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”

Hipócrates

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho e agradeço minha mãe Rejane Dhein. Ela que é e sempre foi uma mulher de muita garra, muito amor e exemplo. Sem ela, eu não teria chegado até aqui. Estendo o mesmo afeto e gratidão a minha irmã Anelise Pilz e minha sobrinha Laura Wedig.

Agradeço ao meu marido, Alisson Martins, por estar comigo por toda essa jornada, não somente do doutorado, mas na vida como um todo. Sendo um cientista como eu, és uma fonte de inspiração e orgulho. Obrigado por toda paciência e amor.

A colega e amiga Alessandra Bittencourt de Lemos, saiba que sem você esse trabalho não seria possível. Obrigado por toda ajuda, amizade e parceria durante todos estes anos. Estendo ao colega Wellington Junior da Silva. Juntos somos um time imparável.

Agradeço as amigas tão queridas e que tanto fazem os meus dias felizes e sei que estão comigo, especialmente a Jú Ritzel e Ana Hanauer.

A minha orientadora Onilda Santos da Silva por todos esses anos trabalhando em conjunto. Obrigado por me ensinar a ser um pesquisador e um ser humano melhor.

Aos meu coorientadores Henri Schrekker e Gertrudes Corção, sem os seus ensinamentos e apoio esse trabalho não seria o mesmo.

Ao pessoal do CEVS, especialmente Edmilson dos Santos e Jáder da Cruz, pelo apoio, especialmente nas saídas de campo.

Ich danke dem Personal des Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, insbesondere Stephanie Jansen und Jonas Schmidt-Chanasit, dafür, dass sie mich so herzlich aufgenommen und während meines Aufenthalts in Hamburg einen Teil dieser Arbeit geleitet haben.

Ao programa CAPES/PRINT por conceder a bolsa sanduiche de doutorado

Todos os colegas, alunos de iniciação científica, professores, técnicos do Departamento de Parasitologia e Microbiologia do ICBS/UFRGS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ou Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

ESTUDO DE UM NOVO FORMULADO A BASE DE LIQUIDOS IÔNICOS PARA O CONTROLE DE MOSQUITOS

Autor: Harry Luiz Pilz Júnior

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a. Onilda Santos da Silva

Co-orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Gertrudes Corção e Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

RESUMO

Os mosquitos são conhecidos por transmitir doenças como malária, dengue, Zika, febre amarela e Chikungunya. Uma das formas mais eficazes de combater as populações de mosquitos antes que se reproduzam e transmitam doenças é através da utilização de larvicidas. Muitas pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos compostos larvicidas mais eficazes e menos prejudiciais ao meio ambiente e organismos não-alvo. Nesse contexto, esta tese de doutorado investigou os efeitos de sais imidazólicos como uma nova classe de compostos larvicidas para mosquitos. Os resultados indicaram que os sais imidazólicos são altamente eficazes como larvicidas para *Culex quinquefasciatus* e seguros para organismos não-alvo testados. Além disso, foram examinados os efeitos desses compostos na microbiota bacteriana em de larvas *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de campo, o que pode levar a novas estratégias de controle de mosquitos no futuro. Foi desenvolvido um formulado com base em sais imidazólicos e sua eficácia foi testada em diferentes temperaturas e em ensaios simulados de campo, demonstrando que é eficaz em diferentes condições ambientais. Em resumo, esta pesquisa destaca a importância do desenvolvimento de novos compostos larvicidas para o controle de mosquitos, especialmente aqueles que são vetores de doenças. Os sais imidazólicos são uma classe promissora de compostos larvicidas, com eficácia e segurança demonstradas em testes em larvas de mosquitos e organismos não-alvo. Eles têm o potencial de se tornarem uma importante ferramenta no controle de mosquitos e na prevenção da transmissão de doenças por esses vetores.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (116 p.) março, 2023.

STUDY OF A NEW FORMULATION BASED ON IONIC LIQUIDS FOR MOSQUITO CONTROL

Author: Harry Luiz Pilz Júnior

Advisor: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

Co-Advisor: Prof^a. Dr^a Gertrudes Corção e Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

ABSTRACT

Mosquitoes are known to transmit diseases such as malaria, dengue, Zika, yellow fever, and Chikungunya. One of the most effective ways to combat mosquito populations before they reproduce and transmit diseases is using larvicides. Many research studies have focused on developing new, more effective, and less harmful larvicidal compounds for the environment and non-target organisms. In this context, this doctoral thesis investigated the effects of imidazole salts as a new class of larvicidal compounds for mosquitoes. The results indicated that imidazole salts are highly effective as larvicides for *Culex quinquefasciatus* and safe for tested non-target organisms. In addition, the effects of these compounds on the bacterial microbiota of field *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae were examined, which may lead to new mosquito control strategies in the future. A formulated product based on imidazole salts was developed and its efficacy was tested at different temperatures and in simulated field assays, demonstrating effectiveness in different environmental conditions. In summary, this research highlights the importance of developing new larvicidal compounds for mosquito control, especially those that are disease vectors. Imidazole salts are a promising class of larvicidal compounds, with efficacy and safety demonstrated in tests on mosquito larvae and non-target organisms. They have the potential to become an important tool in mosquito control and the prevention of disease transmission by these vectors.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (116 p.) march, 2023.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
1.1 Objetivo Geral	3
1.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 O gênero Aedes	4
3.2 O gênero Culex	9
3.3 Importância epidemiológica dos insetos vetores	10
3.4 Controle de Vetores	11
3.6 Sais imidazólicos	15
3.7 Microbiota em vetores	17
REFERÊNCIAS	22
4. CAPÍTULO I: Imidazolium salts influence Aedes aegypti and Aedes albopictus larval-associated microbiota	32
5. Capítulo II - Imidazolium salts are effective for the control of Culex quinquefasciatus larvae and demonstrate low impact on non-target organisms	63
6. Capítulo III - Desenvolvimento e eficácia de um novo larvicida para o controle de populações de mosquitos vetores de doenças	85
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais formas de resistência, seu mecanismo e os compostos que as provocaram em insetos	15
CAPÍTULO II	
Table 1. Lethal concentration values of <i>Cx. quinquefasciatus</i> larvae exposed to IS.	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desenvolvimento geral de mosquitos holometabólicos	4
Figura 2. Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> realizando o repasto sanguíneo	7
Figura 3. Forma adulta do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	8
Figura 4. Mosquito adulto de <i>Culex quinquefasciatus</i> em pouso	9
Figura 5. Bactérias albergadas e compartilhadas entre mosquitos de importância em saúde pública	18
CAPÍTULO I	
Figure 1. Bacterial abundance at the phylum level of <i>Ae. albopictus</i> and <i>Ae. aegypti</i> in the control (water) and exposed (C18MImCl) groups.	40
Figure 2. Heatmap diagram of bacterial abundance at the genus level of <i>Ae. albopictus</i> and <i>Ae. aegypti</i> in the control (not exposed) and exposed (C18MImCl) groups.	42
Figure 3. Alpha-diversity (Observed richness, Shannon and Chao1 index) analyses of bacterial microbiota in <i>Ae. albopictus</i> and in <i>Ae. aegypti</i> larvae in the control (not exposed) and exposed (C18MImCl) groups.	43
Figure 4. Nonmetric multidimensional scaling plots of beta diversity measures across developmental stages for each treatment group by Bray-Curtis dissimilarity for larvae of <i>Ae. albopictus</i> and <i>Ae. aegypti</i> exposed and not exposed (control) to C18MImCl .	44
Figure 5. Scatter plots of significant different metabolic pathways for <i>Aedes albopictus</i> and <i>Aedes aegypti</i>	46
CAPÍTULO II	
Figure 1. Percentage of mortality after 24 h and accumulated mortality after 48 h of <i>Cx. quinquefasciatus</i> larvae exposed to C18MImCl and C16MImMeS .	71
Figure 2. Means and standard deviations of hypocotyl and radicle sizes and germination rate of <i>L. sativa</i> plants exposed to C18MImCl and C16MImMeS	74
Figure 3: Cytotoxicity of C18MImCl and C16MImMeS for V79 cell line determined by MTT assay and SRB assay after 24 hours of exposure.	75
Figure 4: Cytotoxicity of C18MImCl and C16MImMeS for HaCat cell line determined by MTT assay and SRB assay after 24 hours of exposure	76
CAPÍTULO III	
Figura 1. Mortalidade larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a diferentes concentrações do formulado a base de um sal imidazólico em diferentes temperaturas após 24 horas e 48 horas.	91
Figura 2. Mortalidade absoluta de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a três concentrações do novo formulado a base de sais imidazólicos em condições simuladas de campo.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+ssRNA	Genoma de ácido ribonucleico de senso positivo de cadeia simples
16S rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico 16S
18S rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico 18S
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASV	Sequências variantes
ATR-FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de reflexão atenuada
BSA	Albumina de soro bovino
CehA	Carbaril hidrolase
CL	Concentração letal
DENV	Vírus da dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI	Equipamento de ionização por eletrospray
EspA	<i>Piretroide esterase</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IGR	Reguladores de crescimento de insetos
IMD	Rota de imunodeficiência
JAK-STAT	Rota Janus quinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição
L1	Larva de primeiro ínstar
L2	Larva de segundo instar
L3	Larva de terceiro instar
L4	Larva de quarto instar
MCD	Carbofuron hidrolase
MIV	Manejo integrado de vetores
MTT	brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetros
OECD	<i>The Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPTTS	<i>The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
ppm	Partes por milhão
PytH	<i>Carboxilesterase</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
SI	Sais imidazólicos
SRB	sulforrodamina B
VC	Capacidade vetorial
VGSC	Canais de sódio dependente de voltagem
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus Zika
Ig	Imunoglobulina
UFDA	Food and Drug Administration

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e liberação de novos inseticidas são de suma importância devido à preocupação mundial em torno de patógenos que são transmitidos por vetores e que provocam sérios problemas na saúde pública. Dentre estes patógenos, os arbovírus possuem grande impacto, uma vez que causam milhares de mortes todos os anos, e o seu manejo depende do controle dos seus vetores (Ducheyne et al., 2018; Kraemer et al., 2019)

Os mosquitos são vetores de diversos patógenos, e muitos desses agentes causadores de doenças dependem exclusivamente desses insetos para sua transmissão (Alphey, 2014). Dentre os vetores de maior importância nesse contexto estão o *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*. Esses mosquitos estão envolvidos na transmissão de doenças como dengue, Zika, febre amarela, no caso do gênero *Aedes* e filarioses para o gênero *Culex* (Boyer et al., 2018; González et al., 1999), o que os torna alvos relevantes para estratégias de controle, seja pela eliminação ou redução de suas populações. No entanto, décadas de esforços no manejo desses insetos têm levado à resistência a diversos inseticidas químicos e biológicos (Souza-Neto et al., 2019).

A resistência destes insetos geralmente está associada ao mal uso destes inseticidas, além de programas integrados de vetores mal aplicados. No entanto, a microbiota destes vetores tem sido correlacionadas com esta resistência, uma vez que as bactérias albergadas nos mosquitos é de suma importância na fisiologia, captação nutricional e até impacta na sua capacidade vetorial (Minard et al., 2013; Poupardin et al., 2008; Ranasinghe et al., 2021).

Dessa forma, a busca de novos produtos específicos para organismos alvo e com baixo impacto no ambiente devem ser priorizados. Nesse sentido, Goellner et al. (2018) demonstraram a eficiência de dois sais imidazólicos (SI): cloreto de 1-metil-3-n-octadecilimidazólio (**C18MImCl**) e metanossulfonato de 1-n-hexadecil-3-methylimidazólio (**C16MImMeS**) para controlar larvas de *Ae. aegypti*. O núcleo neutro de imidazol é universal na natureza e desempenha um papel crucial em muitas estruturas e funções dentro do corpo humano. O anel imidazólico é o equivalente catiônico do imidazol, sendo que os SI possuem uma maior solubilidade em água e a capacidade de interagir com sistemas biológicos (Anderson et al. 2010).

Levando em consideração as regulamentações nacionais e internacionais vigentes, o objetivo deste trabalho está sendo avaliar um larvicida para mosquitos que seja eficaz, possua baixo impacto ambiental e atenda todas as diretrizes propostas, através de ensaios com mosquitos de campo e sua ação na microbiota. Também, elucidar sua ação em outras

espécies de mosquito de relevância em saúde pública, analisar a toxicidade em plantas, células e mamíferos e realizar estudos de campo com o formulado.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade dos sais imidazólicos em mosquitos de importância em saúde pública, e o impacto desses compostos em organismos não-alvo e na microbiota de larvas com a finalidade de desenvolver um novo formulado que atenda às demandas do manejo integrado de vetores

1.2 Objetivos Específicos

- 1.2.1 Avaliar o impacto dos sais imidazólicos na microbiota de larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, correlacionando com o perfil funcional das bactérias.
- 1.2.2 Investigar os efeitos letais de sais imidazólicos em larvas de *Culex quinquefasciatus*.
- 1.2.3 Verificar os efeitos tóxicos de sais imidazólicos em organismos-não alvo.
- 1.2.4 Desenvolver um formulado eficaz a base de uma molécula de sal imidazólico.
- 1.2.5 Avaliar os formulados com base de sais imidazólicos em ensaios simulados de campo em diferentes temperaturas com larvas de *Aedes aegypti*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O gênero *Aedes*

O gênero *Aedes* compreende mosquitos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Hexapoda, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae e subfamília Culicinae (Forattini, 2002). Na saúde pública, as espécies de maior preocupação são *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894), uma vez que determinadas populações desses mosquitos podem atuar como vetores de agentes patogênicos de grande relevância, causando doenças como dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela (Kraemer et al., 2019). O ciclo de vida dos mosquitos é composto por quatro fases distintas, caracterizando um ciclo holometábolo (Figura 1). Essas fases incluem ovo, larva (com quatro estádios), pupa e adultos.

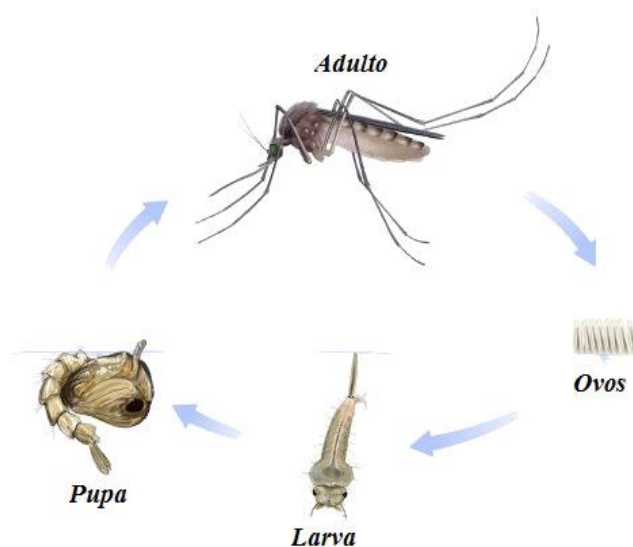


Figura 1. Desenvolvimento geral de mosquitos holometabólicos (Fonte: Fiocruz)

Os ovos do mosquito apresentam forma elíptica com contornos fusiformes e são fecundados quando o espermatozoide penetra no cório por meio de uma abertura denominada micrópila. As fêmeas depositam os ovos no interior das paredes internas dos criadouros, próximos à lâmina d'água. No momento da oviposição, os ovos apresentam coloração pálida, mas ao entrarem em contato com o oxigênio, o cório escurece. Após 48 horas, o embrião se desenvolve, garantindo uma forte resistência à dessecação, o que lhe permite sobreviver até um ano em micro-habitats secos. (Rezende et al., 2008; Rotraut A. G.

B. Consoli and Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

Após a eclosão dos ovos (auxiliada pelo dente quitinoso na cabeça das larvas de primeiro instar), inicia-se o desenvolvimento larval que passa por quatro estádios: L1, L2, L3 e L4. As larvas possuem cabeça (1º segmento), tórax (2º segmento) e abdômen (8 segmentos). Embora sejam aquáticas, as larvas não são capazes de utilizar o oxigênio dissolvido na água e, portanto, utilizam uma estrutura denominada sifão respiratório com espiráculos. Este sifão respiratório é inserido no último segmento da larva, que é diferenciado e chamado de lobo anal. A larva adere-se à lâmina d'água de forma perpendicular, permitindo assim, a captação do oxigênio atmosférico. (Forattini, 2002).

A alimentação das larvas é realizada por meio da contínua filtração de detritos presentes no criadouro em que se desenvolvem, que geralmente é composto por algas, bactérias, esporos fúngicos e partículas de matéria orgânica. Esse processo de filtração ocorre em grandes volumes, chegando a atingir cerca de dois litros por dia por larva. Devido à falta de seletividade alimentar, as larvas possuem uma grande quantidade de endopeptidases intestinais e apresentam barreiras físicas e/ou fisiológicas que ativam seu sistema imunológico inato. (Kumar et al., 2018; Martin et al., 1980; Sharma et al., 1984).

A importância dos elementos nutricionais para as larvas de mosquito foi descrita por Golberg e De Meillon em 1948. Esses estudos indicaram que as larvas necessitam de aminoácidos essenciais para sua sobrevivência, além de proteínas complexas que auxiliam na mudança de estágios larvais. Os lipídios são essenciais para o desenvolvimento da pupa e do adulto, enquanto a falta de carboidratos e vitaminas pode retardar o desenvolvimento larval. (Golberg and De Meillon, 1948a, 1948b).

Após completar o período larval, que varia de 5 a 7 dias, a larva L4 sofre transformações tissulares que resultam na formação da pupa, que é o último estágio aquático do ciclo de vida do mosquito. As pupas apresentam um aspecto semicircular, lembrando uma vírgula, e são compostas por duas partes distintas: o cefalotórax e o abdômen. Na primeira parte, estão localizadas duas trompas respiratórias e as estruturas primárias dos olhos compostos e antenas. Na segunda parte, encontram-se um par de paletas que auxiliam na locomoção da pupa. (Rotraut A. G. B. Consoli and Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

Após um período de dois dias, emerge da pupa o adulto, estágio final do desenvolvimento dos mosquitos, que pode ser descrito como a fase reprodutora e terrestre desses insetos. O corpo dos mosquitos adultos é segmentado, composto por cabeça, tórax e abdômen, e é revestido por um exoesqueleto de quitina, formando escleritos, e outras partes membranosas, denominadas pleura. Esses segmentos densos protegem a hemocele, que é

banhada pela hemolinfa. Na cabeça, ântero-lateralmente, estão localizados os olhos. Além disso, os mosquitos adultos possuem antenas compostas por 15 ou 16 segmentos. Essa estrutura é importante, uma vez que, na porção flagelar da antena, estão implantados pelos que, em machos, são numerosos e longos (plumosos), ao contrário das fêmeas (pilosos). (Rotraut A. G. B. Consoli and Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

Abaixo do clipeo, estrutura localizada entre os olhos e o lábio, insere-se o complexo do aparelho bucal do tipo picador, denominado probóscide, composto pelas labelas e o lábio (Consoli e Oliveira, 1994). Por meio dessa estrutura, os mosquitos se alimentam de carboidratos, obtidos a partir do néctar de flores e seiva. Além disso, as fêmeas utilizam a probóscide para se alimentar de sangue, que é necessário para o amadurecimento dos folículos ovarianos e produção de ovos durante o ciclo gonotrófico do mosquito. (League et al., 2021).

No que diz respeito ao tórax, é possível dividi-lo em protórax, mesotórax e metatórax. As asas estão inseridas na porção mesotorácica e possuem escamas que variam em quantidade e morfologia, além de apresentarem veias e franjas. As pernas são compostas pela coxa, trocanter, fêmur, tíbia e cinco artículos tarsais, sendo que o último deles apresenta a inserção de um par de unhas. Quanto ao abdômen, este é formado por 10 segmentos, oito aparentes e dois reduzidos, sendo este último modificado em ânus e genitália externa. (Rotraut A. G. B. Consoli and Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

A espécie *Ae. aegypti* (figura 2) é originária da África e amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais (Kraemer et al., 2015). Esse mosquito é considerado sinantrópico, uma vez que seu desenvolvimento ocorre em áreas urbanas com alta densidade populacional humana. As picadas geralmente ocorrem durante o dia, dentro ou ao redor das residências. Os criadouros são predominantemente recipientes artificiais capazes de acumular água, como pneus, garrafas, caixas d'água, entre outros (Braks et al., 2003; De Lima-Camara et al., 2006; Kraemer et al., 2015). Os adultos são de cor escura-amarronzada e apresentam faixas brancas no tórax e nas pernas em forma de lira (Forattini, 2002).



Figura 2. Fêmea de *Aedes aegypti* realizando o repasto sanguíneo (Fonte: Fiocruz)

Introduzido no Brasil durante a época colonial, o mosquito *Ae. aegypti* foi erradicado em 1955 após grandes surtos de febre amarela. Entretanto, o fim do programa de erradicação em 1970 e a falta de programas semelhantes em países vizinhos permitiram que a espécie reaparecesse e se estabelecesse em todo o território brasileiro até os dias atuais (Gubler, 2011, 2002a). A capacidade de dispersão das fêmeas é uma característica importante dessa espécie, pois elas procuram parceiros sexuais, locais de alimentação e oviposição em diversos criadouros. Durante o mesmo ciclo gonotrófico, as fêmeas ovipositam em formas de salto, ou seja, em aproximadamente 10 a 30 criadouros diferentes, percorrendo mais de 800 metros (Braks et al., 2003; Reiter et al., 1995).

A espécie *Aedes albopictus* (figura 3) tem origem asiática e é conhecida popularmente em alguns países como “Tigre Asiático”. Sua dispersão pelo mundo ocorreu por meio do transporte passivo de ovos e larvas pelo ser humano, e atualmente está presente em todas as Américas, além de diversos países africanos e europeus (Ducheyne et al., 2018; Kraemer et al., 2015). O primeiro registro deste mosquito nas Américas foi em 1946 (Hughes and Porter, 1956), porém o registro oficial ocorreu apenas em 1985 (Sprenger and Wuithiranyagool, 1986), e no Brasil em 1986 (Forattini, 1986).



Figura 3. Forma adulta do mosquito *Aedes albopictus* (Fonte: Biogents)

Ao contrário do *Ae. aegypti*, o *Ae. albopictus* tem uma fase adulta pouco dispersiva, mantendo-se geralmente a um raio de 100 metros do criadouro após a emergência. No entanto, já foi registrado que alguns machos foram encontrados a 225 metros do ponto de emergência, e fêmeas a 525 metros (Estrada-Franco e Craig, 1995). Além disso, outra característica importante é que as fêmeas depositam os ovos de forma isolada e em pouca quantidade (Consoli e Oliveira, 1994).

As larvas do mosquito *Ae. albopictus* se desenvolvem em água com baixa turbidez e rica em aminoácidos e nitrogênio, com pH entre 6,8 e 7,6. Uma característica morfológica importante que os diferencia do *Ae. aegypti* é a presença de quatro pares de cerdas nas escovas ventrais, em vez de cinco (Forattini, 2002).

Os adultos de *Ae. albopictus* possuem uma coloração escura, com uma faixa estreita e longitudinal branca-prateada no escudo do tórax. No abdômen, identificam-se faixas brancas basais e nas pernas, pontos intercalados de preto e branco (Forattini, 2002). Sendo mosquitos de borda de mata e de regiões mais arborizadas e rurais, sua fonte de alimentação sanguínea é diversa, incluindo roedores, bovinos e canídeos, entre outros. No entanto, não se pode descartar sua atuação antropofílica, assim como ocorre com o *Ae. aegypti* (Rottraut

A. G. B. Consoli e Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

3.2 O gênero *Culex*

Em 1758, Linnaeus descreveu o gênero *Culex*, que é o mais diverso em termos de espécies dentre todos os culicídeos, contando com pelo menos 300 espécies. Esses mosquitos podem utilizar como criadouros tanto ambientes naturais quanto artificiais, e possuem a característica de depositar seus ovos em jangadas na água com alta taxa de matéria orgânica. Além disso, são vetores de nematoides e arboviroses de importância para a saúde humana e veterinária, como a filariose causada por *Wuchereria bancrofti* e a encefalite causada pelo vírus do Nilo Ocidental. (Entonu et al., 2020; Forattini, 2002; Lobl et al., 2021; Roτραut A. G. B. Consoli and Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

Culex (Culex) quinquefasciatus (Say, 1823) é um dos principais representantes do gênero *Culex* (figura 4). Ele é um mosquito encontrado na Ásia, África e nas Américas, incluindo o Brasil, onde é uma espécie sinantrópica. Seus principais criadouros são recipientes artificiais com muita matéria orgânica e detritos, o que pode ser preocupante do ponto de vista da saúde pública, já que esses mosquitos podem ser encontrados em fossas sépticas ou bueiros com passagem de esgoto, onde a falta de inimigos naturais e a dificuldade de acesso dificultam o seu controle (Laporta et al., 2006; Medeiros-Sousa et al., 2015).



Figura 4. Mosquito adulto de *Culex quinquefasciatus* em pouso. (Fonte: Fiocruz)

Este mosquito possui hábito noturno e seus ovos são depositados em água parada. Uma característica importante é que eles são depositados em conjunto, formando uma jangada que flutua, graças a estruturas flutuantes e aglutinadoras no ovo. A embriogênese pode levar de um a dois dias e as larvas se aproveitam do ambiente que é rico em matéria orgânica e levam oito dias para completar 4 estádios larvais. Neste estágio é reportado que as formas imaturas estocam reservas de glicogênio e lipídeos para serem utilizados nas seguintes fases de desenvolvimento (Timmermann and Briegel, 1999).

Após completar o estágio larval, as pupas passam de um a dois dias em sua metamorfose até se tornarem adultos. Após emergirem, iniciam seu ciclo terrestre e se alimentam de tecidos vegetais. As fêmeas precisam ainda ingerir sangue para realizar o ciclo gonotrófico e o processo vitelogênico (Townson, 1993). O *Cx. quinquefasciatus* apresenta tarsos escuros, tegumento marrom e escamas amarelas, além de escamas esbranquiçadas no occipício. As larvas possuem um sifão respiratório alongado e corpo sem pelos (glabroso) (Forattini, 2002; Rotraut A. G. B. Consoli and Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994).

3.3 Importância epidemiológica dos insetos vetores

As doenças transmitidas por vetores são um problema de saúde global, afetando principalmente países subdesenvolvidos e emergentes (Suaya et al., 2009; World Health Organization, 2014). Essas doenças representam 17% de todas as infecções em humanos anualmente e causam mais de 1 milhão de mortes no mesmo período. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas em pelo menos 100 países estejam em risco de contrair doenças transmitidas por vetores (World Health Organization, 2020, 2014).

Os arbovírus, assim como outros patógenos transmitidos por vetores, têm sido conhecidos há milênios. Registros antigos datados entre 265-991 A.C., na China, descrevem sintomas idênticos à dengue hemorrágica. No final do século XVII, muitos casos com sintomas clássicos da dengue foram relatados na América Central. (Gubler, 1998a). Embora a dengue já estivesse distribuída globalmente entre 1700-1800, ela ainda não era associada a um vetor específico, mas já era relacionada à mobilidade populacional e urbana (Weaver and Vasilakis, 2009). Somente em 1887, o primeiro patógeno transmitido por mosquitos foi identificado, o *Plasmodium*, causador da malária, o que despertou a atenção para esses vetores como possíveis transmissores de outras doenças. Além dos primeiros surtos de

dengue e febre amarela, outras doenças mais recentes, como Zika e Chikungunya, foram descritas, juntamente com mais de 500 diferentes arboviroses. (Junglen and Drosten, 2013).

Entre os arbovírus, também conhecidos como flavivírus (Família: *Flaviviridae*; Gênero: *Flavivirus*), destacam-se o vírus da dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus Zika (ZIKV) devido à sua importância na saúde humana (Gubler, 2002b; Gubler et al., 2017; Kramer et al., 2008; Tomashek et al., 2019). Existem quatro tipos de flavivírus conhecidos: aqueles sem vetor conhecido, aqueles que infectam mosquitos não-vertebrados (flavivírus inseto-específico), aqueles transmitidos por carrapatos (*tick-borne flaviviruses*) e aqueles transmitidos por mosquitos (*mosquito-borne flaviviruses*). Este último pode ser dividido em dois grupos: aqueles transmitidos por *Culex*, como o WNV e o vírus da encefalite japonesa, e aqueles transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, como o DENV, YFV e ZIKV (Gould et al., 2003; Kuno et al., 1998).

3.4 Controle de Vetores

As doenças transmitidas por vetores têm uma significativa contribuição no aumento das infecções a nível global, e existem muitos desafios que dificultam a eficácia dos esforços para seu controle (Gubler, 1998b, 2011). A habilidade dos vetores de escapar das estratégias de controle é resultado de diversos fatores. Portanto, a mitigação da transmissão de agentes etiológicos deve levar em consideração as particularidades biológicas de cada vetor, tais como seu habitat e ciclo de vida (Gubler, 1998b; World Health Organization, 2014). No entanto, mudanças drásticas nos ambientes, como urbanização, agricultura e desmatamento, podem facilitar a disseminação de vetores, dificultando as estratégias integradas de manejo e favorecendo a transmissão de doenças, mesmo em áreas que antes não eram endêmicas (Gubler, 2002a; Rochlin et al., 2013; Weaver and Reisen, 2010).

As mudanças climáticas representam uma grande problemática para o controle de vetores, uma vez que essas alterações afetam os habitats dos vetores e contribuem para o aumento da população de vetores e dos agentes patogênicos (Gubler, 2002a; Rochlin et al., 2013; Rosenthal, 2009; Sutherst, 2004). Além disso, é importante considerar a dinâmica dessas doenças, já que muitas delas possuem um ciclo silvestre, no qual os reservatórios são animais não-humanos, o que significa que o controle e monitoramento não podem se concentrar apenas em regiões urbanas. Diversas espécies, incluindo aves, suínos, morcegos, primatas, roedores e outros vertebrados, podem ser afetados por doenças transmitidas por vetores (Bean et al., 2013). É de suma importância conhecer esses reservatórios e monitorá-los para auxiliar na redução

dessas doenças nos ciclos urbanos.

Um dos fatores mais relevantes na dinâmica das doenças transmitidas por vetores é a falta de vacinas disponíveis para a maioria dessas doenças. Como resultado, o controle de vetores geralmente é a única opção para prevenir a transmissão dessas doenças (World Health Organization, 2014). Embora vacinas estejam em desenvolvimento, elas muitas vezes apresentam baixa eficácia, como no caso de patógenos protozoários, como a malária, e de vírus, como o dengue, que possui quatro sorotipos e diversas linhagens. Como resultado, vacinas quadrivalentes apresentam eficácia reduzida (Schwartz et al., 2012; Thera and Plowe, 2012).

O controle de vetores exige testes precisos e dispendiosos, o que requer recursos financeiros e humanos substanciais. No entanto, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, os métodos de detecção são frequentemente inespecíficos e carentes de treinamento adequado para os profissionais encarregados da vigilância entomológica, além da falta de recursos financeiros disponíveis. (*Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections, Workshop Summary*, 2008; World Health Organization, 2014).

No Brasil, o controle de vetores está focado no mosquito *Ae. aegypti*, principal vetor da dengue, Chikungunya e Zika. O manejo integrado de vetores (MIV) é um meio eficaz de controle, que considera o manejo ambiental e a redução de criadouros e larvas, por meio da eliminação, limpeza e adição de componentes larvicidas em recipientes que acumulam água e servem de habitat para esse mosquito. (“Combate ao mosquito *Aedes aegypti* - ANS - Agência Nacional de Saúde Suplementar,” n.d.; Gubler, 1998b). A estratégia de impedir a fase aquática do desenvolvimento dos mosquitos é uma das melhores formas de reduzir sistematicamente sua população e, conseqüentemente, a transmissão de doenças. Além disso, o MIV inclui iniciativas importantes como educação popular, disponibilidade de recursos para manter reservatórios de água adequados, eliminação de criadouros pela população e cuidados no domicílio (Achee et al., 2019).

O uso de moléculas, sejam elas biológicas ou químicas, é de suma importância no MIV, uma vez que nem sempre o controle mecânico é eficaz, especialmente na retirada total dos ovos. O controle biológico é uma alternativa sustentável para a redução das populações, especialmente a nível larval. Crustáceos, peixes e outros pequenos répteis e insetos podem ser utilizados como predadores naturais das larvas (Achee et al., 2019). No entanto, produtos formulados com base em agentes ou moléculas de origem biológica são mais utilizados, como os óleos essenciais extraídos de

plantas (Silvério et al., 2020) e o uso de bactérias entomopatogênicas, como o *Bacillus thuringiensis* (Boyce et al., 2013).

O controle genético de mosquitos é uma estratégia que tem sido amplamente estudada como um novo método de controle de mosquitos transmissores de doenças. Diferentemente do controle convencional, essa abordagem não tem como objetivo a eliminação total dos insetos, mas sim a redução significativa de sua população. Uma das técnicas mais promissoras envolve a infecção dos mosquitos com a bactéria *Wolbachia*, a qual pode interferir em sua história de vida e reduzir a transmissão de patógenos, como o vírus da dengue. Além disso, o uso de machos estéreis tem sido estudado como uma alternativa para impedir a fecundação das fêmeas e interromper o ciclo reprodutivo dos mosquitos (Alphey, 2014).

O controle químico é a estratégia mais amplamente utilizada em todo o mundo para auxiliar no controle de vetores. No caso dos mosquitos, a maioria dos inseticidas utilizados age em locais específicos do sistema nervoso e pertencem às classes de organofosforados, carbamatos e piretróides. Esses inseticidas funcionam porque atuam nas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e nos canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC). Além disso, uma classe importante de inseticidas, especialmente no controle de larvas, são os análogos do hormônio juvenil, que interferem diretamente na metamorfose das larvas, impedindo-as de seguir para a fase de pupa (Maoz et al., 2017; Roiz et al., 2018).

Os organofosforados e carbamatos são inibidores da AChE, causando a acumulação de acetilcolina nas regiões sinápticas terminais dos nervos colinérgicos, resultando em uma estimulação excessiva dos receptores colinérgicos e levando à paralisia e morte do mosquito (Casida e Quistad, 2004). Já os piretróides atuam nos VGSC, prolongando o curso da corrente de sódio despolarizada, induzindo correntes de ação lenta e proporcionando uma excitação constante nos neurônios (Soderlund e Bloomquist, 1990). É importante ressaltar que os inseticidas são geralmente específicos para diferentes estágios de vida do inseto.

Os larvicidas são importantes para o controle de mosquitos em diferentes situações, especialmente em áreas de alta infestação e transmissão de doenças. Eles são utilizados para complementar outras estratégias de controle de vetores e são mais eficazes quando aplicados em locais de difícil manejo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os larvicidas têm como alvo as larvas dos mosquitos e os tipos mais comuns são os reguladores de crescimento de insetos (IGRs), larvicidas microbianos, organofosforados e óleos (CDC, 2020; World Health Organization, 2006).

Os adulticidas são compostos que visam as formas adultas dos mosquitos e têm como principal objetivo reduzir a abundância das populações ou afetar algum aspecto de sua

aptidão, como a longevidade, que está diretamente relacionada à transmissão de doenças. Esses compostos podem ser aplicados na forma de tratamento de superfície residual ou dispersos no ar. Além disso, materiais tratados com inseticidas, como redes de proteção colocadas em janelas residenciais, também são encontrados (World Health Organization, 2006). Os organofosforados são frequentemente utilizados como fumigantes aéreos, liberando aerossóis que ficam suspensos no ar e em contato com os mosquitos adultos causando a morte desses insetos. Por outro lado, os carbamatos geralmente estão associados a produtos aerossóis domésticos e possuem efeito residual (Duprey et al., 2008).

No entanto, o uso repetitivo dos inseticidas citados pode resultar em pressão seletiva e levar ao desenvolvimento de resistência metabólica e genética em populações de várias espécies de insetos de importância médica (Vontas et al., 2012). A resistência de insetos é caracterizada por uma mudança herdada na sensibilidade dos insetos a compostos tóxicos, que é observada pela falha repetitiva de um produto no controle, mesmo com a dosagem recomendada. Portanto, é essencial incluir o monitoramento de resistência em programas de Manejo Integrado de Vetores, pois a manutenção de populações suscetíveis é fundamental para o efetivo controle da transmissão de doenças (Liu, 2015; World Health Organization, 1981).

A resistência acontece através de várias barreiras fisiológicas e bioquímicas dos insetos, que podem afetar a “entrega” destas moléculas diretamente no seu sítio de atuação. As principais formas de resistência, mecanismo de ação e os compostos relacionados estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Principais formas de resistência, seu mecanismo e os compostos que as provocaram em insetos

Forma	Mecanismo	Compostos	Referências
Redução na penetração cuticular	Proteínas e lipídios prendem o inseticida na cutícula e é degradado por enzimas específicas	Organoclorados; Organofosforados; Carbamatos e Piretróides	(Yu, 2014) (Vinson and Law, 1971) (Patil and Guthrie, 1979)
Resistência pela Glutathione S-Transferase	Solubilização dos compostos inseticidas pela conjugação com glutathione	Organofosforados	(Grant and Matsumura, 1989) (Prapanthadara et al., 1995)
Resistência pela esterase	Hidrólise dos inseticidas pela esterase	Organofosforados Carbamatos Piretróides	(Field et al., 1988) (Hemingway and Karunaratne, 1998) (Hemingway, 2000)
Resistência pela Monooxigenase	Desativação de composto exógenos pelo citocromo P450 monooxigenase	Organofosforados Piretróides	(Hemingway, 2000)

3.6 Sais imidazólicos

A busca por novas moléculas para o controle de insetos é fundamental para combater a resistência das populações aos compostos inseticidas usuais e evitar a disseminação de doenças transmitidas por vetores. Algumas moléculas de sais imidazólicos (SI) com efeito larvicida foram identificadas para *Ae. aegypti*, como relatado por Goellner et al. (2018). Estudos posteriores demonstraram que essas moléculas interagem com a microbiota das larvas, afetando a comunidade bacteriana e perdendo a sensibilidade quando expostas a larvas esterilizadas, como mencionado por Pilz-Junior et al. (2019).

Os sais imidazólicos são líquidos iônicos que tem como característica principal ser composto na sua totalidade por íons. Suas propriedades físicas e químicas os permitem variar bastante na combinação entre cátions e ânions, propriedades como ponto de fusão, viscosidade, solubilidade e densidade podem ser otimizadas conforme a necessidade. Podem ser classificados em líquidos iônicos simples (LIS) (quando são formados apenas por um cátion ou um ânion) e binários (LIB) (formado por pelo menos um cátion e um ânion) (Riduan and Zhang, 2013).

Derivados dos anéis de imidazol pela alquilação de átomos de nitrogênio e de forma binária, os sais imidazólicos podem ser encontrados naturalmente, em forma de alcaloides nas raízes de *Lepidium meyenii* (Mlostoń et al., 2020). Todavia a grande maioria é sintetizada artificialmente, sem perder suas propriedades. Os SI interagem com sistemas biológicos de uma forma muito adequada, porque por natureza são flexíveis e podem se ligar a metais e formar ligações hidrogenadas seguras e estáveis com proteínas. Por serem LIB, são moléculas anfifílicas, e possuem os cátion e ânions discretos de forma que uma região seja hidrofóbica e outra hidrofílica (Anderson and Long, 2010; Riduan and Zhang, 2013).

Os SI, já são bem conhecidos pela sua atividade antimicrobiana. Isso tem sido atribuído às interações coulombicas entre os íons e os grupos fosfatidiletanolamina da membrana celular bacteriana, causando uma disjunção da membrana que leva à lise e a morte celular (Egorova et al., 2017; Furlani et al., 2013; Raucci et al., 2018; Schrekker et al., 2016). Além disso, o tamanho do grupo N-alkyl das moléculas parecem ser um outro fator importante pois, quanto maior for a cadeia de carbonos, mais tóxica é para a célula bacteriana, além de que a parte hidrofóbica auxilia na adsorção e na concentração micelar. Assim, seus componentes hidrofóbicos promovem um distúrbio na membrana, acarretando no vazamento de substâncias intracelulares, e, por fim, morte celular (Garcia et al., 2013).

Outra característica que é importante para os sais imidazólicos, principalmente levando em consideração a sua futura aplicação como larvicida é o seu impacto em organismos não-alvo. Avaliar a toxicidade em organismos que coabitam ou que possuem alguma relação ecológica com o organismo alvo é de suma importância, especialmente no seu risco ambiental, efeitos diretos e indiretos. Com os seres humanos isso não é diferente, uma vez que lidarão diretamente com o produto (Winding et al., 2004).

Por apresentarem baixo ponto de fusão – menor que 100 °C, energia livre de Gibbs de solvatação negativa, baixa energia reticular e alta entropia, termoestáveis, ampla janela eletroquímica, alta condutividade e ajustável solubilidade, muitos autores os considerem

moléculas verdes (Krossing et al., 2006; Wasserscheid and Keim, 2000). Ensaios ecotoxicológicos demonstraram que alguns SI, apenas se mostram tóxicos em altas dosagens e no caso de análises fitotoxicológicas, impedem o desenvolvimento de plantas quando apresentam também cadeias carbônicas longas (ânion) (Biczak et al., 2014). Estudos realizados com cultura de células de mamíferos demonstrou que SI não possuem atividade citotóxica (Ranke et al., 2007).

3.7 Microbiota em vetores

A diversidade microbiana presente nos mosquitos é ampla e composta por procariotos e fungos em grande abundância e riqueza. A dinâmica dessa diversidade é influenciada pela dieta, estágio de desenvolvimento, habitat, localidade geográfica e pela aquisição desses microrganismos no ambiente onde os insetos estão inseridos. Para investigar essa diversidade, são comumente empregadas ferramentas de metagenômica, como a amplificação de genes 16S rRNA, no caso de bactérias e outros procariotos, e 18S rRNA para fungos. Métodos dependentes de cultura também podem ser utilizados, principalmente para investigar organismos específicos com potencial biotecnológico. (Strand, 2018; Wei et al., 2017).

Bactérias simbiotes estão presentes em pelo menos 10% de todos os insetos, incluindo mosquitos, onde influenciam positivamente seu fitness, especialmente na captação de nutrientes essenciais para seu desenvolvimento completo. A maior carga bacteriana geralmente é encontrada no lúmen intestinal, um pouco distante das células intestinais para não superestimular o sistema imunológico. No entanto, várias espécies bacterianas foram encontradas em vários órgãos de insetos e têm funções importantes (Engel e Moran, 2013; Moran e Baumann, 2000).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de descrever as comunidades bacterianas presentes em mosquitos. Em uma síntese desses estudos, Minard et al. (2013) identificaram as principais espécies bacterianas encontradas em mosquitos das espécies *Mansonia*, *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, bem como estabeleceram uma correlação entre as espécies bacterianas compartilhadas entre os diferentes vetores (Figura 5).

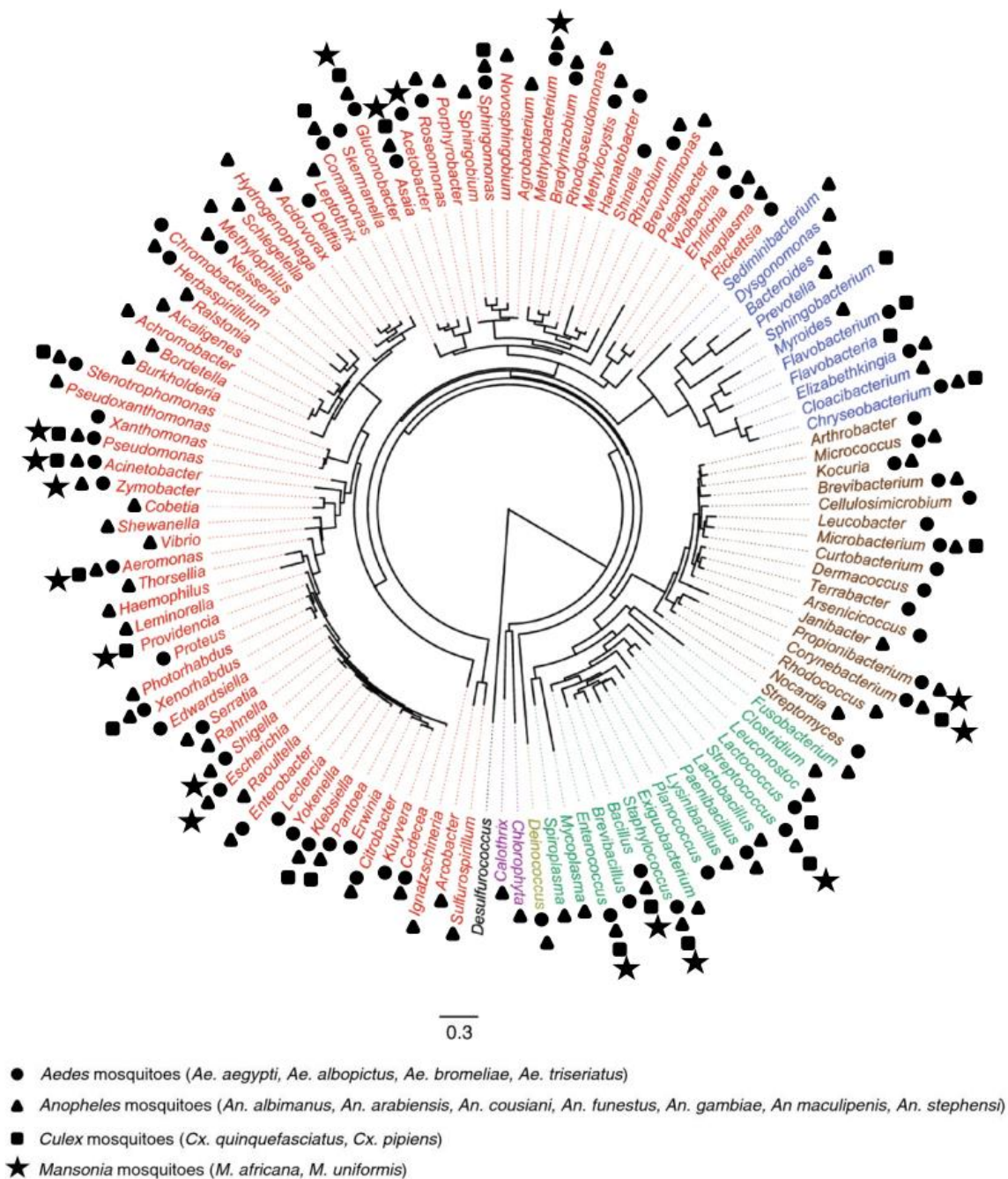


Figura 5. Bactérias albergadas e compartilhadas entre mosquitos de importância em saúde pública. (Minard et al., 2013)

A dinâmica de aquisição de bactérias pelos mosquitos e sua transmissão horizontal para outros estágios de desenvolvimento dependem de vários fatores. Muitas bactérias são adquiridas durante o estágio de larva no ambiente, através da filtração contínua. No entanto, as bactérias que vão para a fase adulta são apenas aquelas que estão alojadas em outros órgãos, uma vez que o intestino anterior e posterior das larvas é expelido na muda para pupa (Yun et al., 2014). Um importante exemplo é a bactéria intracelular *Wolbachia*, que pode ser encontrada

em todas as fases de desenvolvimento de alguns insetos e estabelece relações mutualísticas com seu hospedeiro (Balaji et al., 2021).

As bactérias presentes nos insetos desempenham diversas funções fisiológicas, como auxiliar na digestão de sangue e no fornecimento de aminoácidos essenciais. No entanto, seu papel na transmissão de patógenos tem sido amplamente estudado (Cansado-Utrilla et al., 2021). A microbiota pode influenciar na capacidade vetorial dos mosquitos por meio da formação de biofilmes, que impedem a penetração de patógenos nas barreiras teciduais (Castro et al., 2007; Rodgers et al., 2017). Para que ocorra a transmissão de um patógeno, é necessário que o mosquito sobreviva por dias suficientes para que o ciclo do patógeno se complete. Nesse sentido, diversas bactérias foram identificadas, com ação direta no desenvolvimento, muda e ativação de rotas sinalizadoras de crescimento (Coon et al., 2017, 2014; Valzania et al., 2018a, 2018b).

Algumas bactérias têm a capacidade de modular a expressão gênica de genes envolvidos no metabolismo lipídico, induzindo mudanças fisiológicas importantes que afetam o fitness do mosquito na fase adulta, como o armazenamento de lipídios e a resistência em situações de falta de alimento. Esses efeitos bacterianos durante a fase larval, que impactam a fase adulta do mosquito, são conhecidos como *carry-over effects*. (Giraud et al., 2022).

Nas últimas décadas, tem sido demonstrado que bactérias simbiotes em insetos, que anteriormente eram relacionadas apenas à homeostase nutricional e à imunidade, exercem um papel importante no metabolismo de inseticidas e, conseqüentemente, na resistência contra alguns compostos (Werren, 2012). Geralmente, o envolvimento das bactérias está relacionado à detoxificação de compostos inseticidas como fonte de carbono, por meio de hidrólise, oxidação e redução (Yu, 2014). O principal objetivo das bactérias, do ponto de vista metabólico, é utilizar esses subcompostos como fonte nutricional para aumentar suas taxas de reprodução e proliferação (Russell et al., 2011). O aumento da diversidade e abundância das bactérias, principalmente a nível intestinal, favorece a cinética metabólica do hospedeiro, promovendo, assim, a resistência aos inseticidas (Kane and Breznak, 1991).

Outros insetos, como o *Riptortus pedestris* (Hemiptera:Alydidae), também possuem uma comunidade bacteriana capaz de degradar compostos químicos, como a fenitrotiona, um organofosforado, graças à presença de bactérias do gênero *Burkholderia*, o que representa um novo mecanismo de resistência para este inseto (Kikuchi et al., 2012). Em *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), a bactéria *Citrobacter* também foi identificada como um fator que contribui para a resistência do inseto quando exposto ao metrifonato, um organofosforado, por causa de suas características de degradação (Cheng et al., 2017).

A biodegradação de inseticidas é um processo mediado por enzimas, que possivelmente surgiram através de pressões seletivas, e pode envolver uma grande variedade de famílias enzimáticas. Por exemplo, algumas bactérias produzem enzimas como a carbofuron hidrolase (MCD) e a carbaril hidrolase (CehA), que hidrolisam carbamatos, e os subprodutos são utilizados em outras rotas metabólicas (Russell et al., 2011). Para os piretroides, já foram descritas diversas enzimas, como a carboxilesterase (PytH), produzida pela bactéria *Sphingobium* (Wang et al., 2009), a carboxilesterase-permethrinase produzida pela bactéria *Bacillus cereus* (Maloney et al., 1993) e a piretroide esterase (EspA), produzida pela bactéria *Klebsiella* (Wu et al., 2006).

Algumas enzimas foram identificadas como capazes de degradar organofosforados, incluindo a organofosforo-hidrolase, metilparation-hidrolase e ácido organofosforada-anidrolase. As bactérias envolvidas na produção dessas enzimas ou no processo de degradação de organofosforados incluem *Flavobacterium*, *Alteromonas*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Trichoderma* e *Streptomyces* (Santillan et al., 2020; Siddavattam et al., 2003; Singh, 2008; Singh and Walker, 2006).

3.8 Processos regulatórios para a liberação de larvicidas

Para ocorrer a liberação de produtos larvicidas no Brasil é necessário atender as diretrizes e regulamentações “*Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*”, WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.12, um guia desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde em 2005. Neste documento estão dispostos que o composto precisa passar por três fases de desenvolvimento. O primeiro é a nível laboratorial, onde é estabelecido através de bioensaios a toxicidade e a concentração letal de determinado composto. Na segunda fase são realizados ensaios simulados em campo, utilizando larvas de laboratório a fim de aferir se o composto é eficaz quando exposto a parâmetros abióticos. Além disso, é disposto que é necessário realizar testes em organismos não-alvo, especialmente aos que coabitam junto as larvas (nesse caso, macro/microinvertebrados, plantas e humanos). Na terceira fase são os testes com larvas de campo nos seus criadouros naturais/artificiais.

Quanto ao órgão regulatório brasileiro, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a instituição que realiza a liberação de um produto larvicida através da RESOLUÇÃO-RDC N° 34, de 16 de agosto de 2010, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos saneantes desinfestantes e na RESOLUÇÃO-RDC N° 682, DE 2 DE MAIO DE 2022. Nestas resoluções constam alguns testes, especialmente toxicológicos onde é necessário

demonstrar que o composto é seguro para quem maneja e para outros organismos, através de uma dose letal máxima exigida. No caso do SI, eles também precisam ser sintetizados e lidos conforme algumas diretrizes internacionais: *The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPTTS)*”, “*The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)*” e “*International Conference on Harmonisation (ICH)*).

A partir do atendimento das diretrizes e regulamentações supracitadas, o larvicida está liberado para venda comercial, no entanto, sua utilização ainda pode passar por deliberações, por exemplo, para o uso a nível governamental nas estratégias de controle de vetores. Para o uso doméstico, o produto ainda precisa apresentar embalagens que asseguram o usuário na correta aplicação e na sua própria segurança, procedimento que é também regulado pela ANVISA.

REFERÊNCIAS

- Achee, N.L., Grieco, J.P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., Martins, A.J., Juntarajumnong, W., Corbel, V., Gouagna, C., David, J.P., Logan, J.G., Orsborne, J., Marois, E., Devine, G.J., Vontas, J., 2019. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- Alphey, L., 2014. Genetic control of mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 205–224. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162002>
- Anderson, E.B., Long, T.E., 2010. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications. *Polymer (Guildf).* 51, 2447–2454. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.02.006>
- Balaji, S., Deepthi, K.N.G., Prabakaran, S.R., 2021. Native *Wolbachia* influence bacterial composition in the major vector mosquito *Aedes aegypti*. *Arch. Microbiol.* 203, 5225–5240. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02506-0/FIGURES/4>
- Bean, A.G.D., Baker, M.L., Stewart, C.R., Cowled, C., Deffrasnes, C., Wang, L.F., Lowenthal, J.W., 2013. Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host — keeping it real. *Nat. Rev. Immunol.* 2013 1312 13, 851–861. <https://doi.org/10.1038/nri3551>
- Biczak, R., Pawłowska, B., Bałczewski, P., Rychter, P., 2014. The role of the anion in the toxicity of imidazolium ionic liquids. *J. Hazard. Mater.* 274, 181–190. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2014.03.021>
- Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B., Horstick, O., 2013. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop. Med. Int. Health* 18, 564–577. <https://doi.org/10.1111/TMI.12087>
- Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., Failloux, A.B., 2018. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes Infect.* 20, 646–660. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
- Braks, M.A.H., Honório, N.A., Lourenço-De-Oliveira, R., Juliano, S.A., Lounibos, L.P., 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J. Med. Entomol.* 40, 785–794. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.785>
- Cansado-Utrilla, C., Zhao, S.Y., McCall, P.J., Coon, K.L., Hughes, G.L., 2021. The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. *Microbiome* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01073-2>
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 2004. Why Insecticides Are More Toxic to Insects than People:

- The Unique Toxicology of Insects. *J. Pestic. Sci.* 29, 81–86.
<https://doi.org/10.1584/JPESTICS.29.81>
- Castro, D.P., Seabra, S.H., Garcia, E.S., Souza, W. de, Azambuja, P., 2007. Trypanosoma cruzi: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp. Parasitol.* 117, 201–207. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2007.04.014>
- CDC, 2020. Larvicides [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/athome/outside-your-home/larvicides.html> (accessed 6.14.22).
- Cheng, D., Guo, Z., Riegler, M., Xi, Z., Liang, G., Xu, Y., 2017. Gut symbiont enhances insecticide resistance in a significant pest, the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40168-017-0236-Z/FIGURES/6>
- Combate ao mosquito *Aedes aegypti* - ANS - Agência Nacional de Saúde Suplementar [WWW Document], n.d. URL <https://www.ans.gov.br/prevencao-e-combate/combate-aos-mosquito-aedes-aegypti> (accessed 6.14.22).
- Coon, K.L., Valzania, L., McKinney, D.A., Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R., 2017. Bacteria-mediated hypoxia functions as a signal for mosquito development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E5362–E5369. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1702983114>
- Coon, K.L., Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R., 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol. Ecol.* 23, 2727–2739. <https://doi.org/10.1111/MEC.12771>
- De Lima-Camara, T.N., Honório, N.A., Lourenço-de-Oliveira, R., 2006. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saude Publica* 22, 2079–2084. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006001000013>
- Ducheyne, E., Tran Minh, N.N., Haddad, N., Bryssinckx, W., Buliva, E., Simard, F., Malik, M.R., Charlier, J., De Waele, V., Mahmoud, O., Mukhtar, M., Bouattour, A., Hussain, A., Hendrickx, G., Roiz, D., 2018. Current and future distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in WHO Eastern Mediterranean Region. *Int. J. Health Geogr.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12942-018-0125-0>
- Duprey, Z., Rivers, S., Lubber, G., Becker, A., Blackmore, C., Barr, D., Weerasekera, G., Kieszak, S., Flanders, W.D., Rubin, C., 2008. Community aerial mosquito control and naled exposure. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24, 42–46. <https://doi.org/10.2987/5559.1>
- Egorova, K.S., Gordeev, E.G., Ananikov, V.P., 2017. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chem. Rev.* 117, 7132–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>

- Engel, P., Moran, N.A., 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Entonu, M.E., Muhammad, A., Ndams, I.S., Franciosa, G., 2020. Evaluation of Actin-1 Expression in Wild Caught *Wuchereria bancrofti*-Infected Mosquito Vectors. *J. Pathog.* 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/7912042>
- Estrada-Franco, J.G., Craig, G.B., 1995. Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*, Pan American Health Organization.
- Forattini, O.P., 2002. Culicidologia Médica - Identificação, biologia e epidemiologia, Culicidologia Médica.
- Forattini, O.P., 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev. Saude Publica* 20, 244–245. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300009>
- Furlani, R.E., Yeagley, A.A., Melander, C., 2013. A flexible approach to 1,4-di-substituted 2-aminoimidazoles that inhibit and disperse biofilms and potentiate the effects of β -lactams against multi-drug resistant bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* 62, 59–70.
- Garcia, M.T., Ribosa, I., Perez, L., Manresa, A., Comelles, F., 2013. Aggregation behavior and antimicrobial activity of ester-functionalized imidazolium- and pyridinium-based ionic liquids in aqueous solution. *Langmuir* 29, 2536–2545. https://doi.org/10.1021/LA304752E/SUPPL_FILE/LA304752E_SI_001.PDF
- Giraud, É., Varet, H., Legendre, R., Sismeiro, O., Aubry, F., Dabo, S., Dickson, L.B., Valiente Moro, C., Lambrechts, L., 2022. Mosquito-bacteria interactions during larval development trigger metabolic changes with carry-over effects on adult fitness. *Mol. Ecol.* 31, 1444–1460. <https://doi.org/10.1111/MEC.16327>
- Goellner, E., Schmitt, A.T., Couto, J.L., Müller, N.D., Pilz-Junior, H.L., Schrekker, H.S., Silva, C.E., da Silva, O.S., 2018. Larvicidal and residual activity of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 74. <https://doi.org/10.1002/ps.4803>
- Golberg, L., De Meillon, B., 1948a. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* Linnaeus. 3. Lipid requirements. *Biochem. J.* 43, 372–9. <https://doi.org/10.1042/bj0430372>
- Golberg, L., De Meillon, B., 1948b. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* Linnaeus. 4. Protein and amino-acid requirements. *Biochem. J.* 43, 379–87.
- González, T., Bisset, J.A., Díaz, C., Rodríguez, M.M., Brandolini, M.B., 1999. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 121–122. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100023>
- Gould, E.A., de Lamballerie, X., Zanotto, P.M. d. A., Holmes, E.C., 2003. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv. Virus Res.* 59, 277–314.

- [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59008-X)
- Gubler, D.J., 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop. Med. Health* 39, 3. <https://doi.org/10.2149/TMH.2011-S05>
- Gubler, D.J., 2002a. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 33, 330–342. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)
- Gubler, D.J., 2002b. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10, 100–103. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02288-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02288-0)
- Gubler, D.J., 1998a. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480–496. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.480>
- Gubler, D.J., 1998b. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 442–450. <https://doi.org/10.3201/EID0403.980326>
- Gubler, D.J., Vasilakis, N., Musso, D., 2017. History and Emergence of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* 216, S860–S867. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIX451>
- Hughes, J.H., Porter, J.E., 1956. Dispersal of Mosquitoes through Transportation, with particular reference to Immature Stages.
- Junglen, S., Drosten, C., 2013. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 507–513. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2013.06.005>
- Kane, M.D., Breznak, J.A., 1991. Effect of host diet on production of organic acids and methane by cockroach gut bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2628–2634. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.9.2628-2634.1991>
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., Fukatsu, T., 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8618–8622. https://doi.org/10.1073/PNAS.1200231109/SUPPL_FILE/PNAS.201200231SI.PDF
- Kraemer, M.U.G., Reiner, R.C., Brady, O.J., Messina, J.P., Gilbert, M., Pigott, D.M., Yi, D., Johnson, K., Earl, L., Marczak, L.B., Shirude, S., Davis Weaver, N., Bisanzio, D., Perkins, T.A., Lai, S., Lu, X., Jones, P., Coelho, G.E., Carvalho, R.G., Van Bortel, W., Marsboom, C., Hendrickx, G., Schaffner, F., Moore, C.G., Nax, H.H., Bengtsson, L., Wetter, E., Tatem, A.J., Brownstein, J.S., Smith, D.L., Lambrechts, L., Cauchemez, S., Linard, C., Faria, N.R., Pybus, O.G., Scott, T.W., Liu, Q., Yu, H., Wint, G.R.W., Hay, S.I., Golding, N., 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* 4, 854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
- Kraemer, M.U.G., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q.N., Shearer, F.M., Barker, C.M.,

- Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I.R., Teng, H.J., Brady, O.J., Messina, J.P., Pigott, D.M., Scott, T.W., Smith, D.L., William Wint, G.R., Golding, N., Hay, S.I., 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife* 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kramer, L.D., Styer, L.M., Ebel, G.D., 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 61–81. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ENTO.53.103106.093258>
- Krossing, I., Slattery, J.M., Daguinet, C., Dyson, P.J., Oleinikova, A., Weingärtner, H., 2006. Why are ionic liquids liquid? A simple explanation based on lattice and solvation energies. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13427–13434. https://doi.org/10.1021/JA0619612/SUPPL_FILE/JA0619612SI20060726_042716.PDF
- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P.D.N.N., Dubey, S.K., Kumar, R., Shrinet, J., Sunil, S., 2018. Mosquito Innate Immunity. *Insects* 9. <https://doi.org/10.3390/INSECTS9030095>
- Kuno, G., Chang, G.-J.J., Tsuchiya, K.R., Karabatsos, N., Cropp, C.B., 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72, 73–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.73-83.1998>
- Laporta, G.Z., Urbinatti, P.R., Natal, D., 2006. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. *Rev. Bras. Entomol.* 50, 125–127. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262006000100019>
- League, G.P., Degner, E.C., Pitcher, S.A., Hafezi, Y., Tennant, E., Cruz, P.C., Krishnan, R.S., Castillo, S.S.G., Alfonso-Parra, C., Avila, F.W., Wolfner, M.F., Harrington, L.C., 2021. The impact of mating and sugar feeding on blood-feeding physiology and behavior in the arbovirus vector mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009815>
- Liu, N., 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 537–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>
- Lobl, M., Thieman, T.K., Clarey, D., Higgins, S., Trowbridge, R.M., Hewlett, A., Wysong, A., 2021. What’s Eating You? *Culex* Mosquitoes and West Nile Virus. *Cutis* 107, 244–247. <https://doi.org/10.12788/CUTIS.0251>
- Maloney, S.E., Maule, A., Smith, A.R.W., 1993. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2007. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.7.2007-2013.1993>

- Maoz, D., Ward, T., Samuel, M., Müller, P., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., Boyce, R., Velayudhan, R., Horstick, O., 2017. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005651>
- Martin, M.M., Martin, J.S., Kukor, J.J., Merritt, R.W., 1980. The digestion of protein and carbohydrate by the stream detritivore, *Tipula abdominalis* (Diptera, Tipulidae). *Oecologia* 46, 360–364. <https://doi.org/10.1007/BF00346265>
- Medeiros-Sousa, A.R., Ceretti-Júnior, W., de Carvalho, G.C., Nardi, M.S., Araujo, A.B., Vendrami, D.P., Marrelli, M.T., 2015. Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in an urban park: larval habitats and temporal variation. *Acta Trop.* 150, 200–209. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2015.08.002>
- Minard, G., Mavingui, P., Moro, C.V., 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites and Vectors* 6, 146. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-146>
- Mlostoń, G., Celeda, M., Poper, W., Kowalczyk, M., Gach-Janczak, K., Janecka, A., Jasiński, M., 2020. Synthesis, selected transformations, and biological activity of alkoxy analogues of lepidilines A and C. *Materials (Basel)*. 13, 1–16. <https://doi.org/10.3390/MA13184190>
- Moran, N.A., Baumann, P., 2000. Bacterial endosymbionts in animals. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 270–275. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00088-6)
- Pilz-Junior, H.L., de Lemos, A.B., de Almeida, K.N., Corção, G., Schrekker, H.S., Silva, C.E., da Silva, O.S., 2019. Microbiota potentialized larvicidal action of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Sci. Rep.* 9, 16164. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52687-4>
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.01.004>
- Ranasinghe, K., Gunathilaka, N., Amarasinghe, D., Rodrigo, W., Udayanga, L., 2021. Diversity of midgut bacteria in larvae and females of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Gampaha District, Sri Lanka. *Parasites and Vectors* 14, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04900-5/FIGURES/5>
- Raucci, M.G., Fasolino, I., Pastore, S.G., Soriente, A., Capeletti, L.B., Dessuy, M.B., Giannini, C., Schrekker, H.S., Ambrosio, L., 2018. Antimicrobial Imidazolium Ionic Liquids for the Development of Minimal Invasive Calcium Phosphate-Based Bionanocomposites. *ACS*

Appl. Mater. Interfaces 10, 42766–42776.

- Reiter, P., Amador, M.A., Anderson, R.A., Clark, G.G., 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 177–179. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1995.52.177>
- Rezende, G.L., Martins, A.J., Gentile, C., Farnesi, L.C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A.A., Valle, D., 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: Presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Dev. Biol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-82/FIGURES/7>
- Riduan, S.N., Zhang, Y., 2013. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. *Chem. Soc. Rev.* 42, 9055–9070. <https://doi.org/10.1039/c3cs60169b>
- Rochlin, I., Ninivaggi, D. V., Hutchinson, M.L., Farajollahi, A., 2013. Climate Change and Range Expansion of the Asian Tiger Mosquito (*Aedes albopictus*) in Northeastern USA: Implications for Public Health Practitioners. *PLoS One* 8, e60874. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060874>
- Rodgers, F.H., Gendrin, M., Wyer, C.A.S., Christophides, G.K., 2017. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog.* 13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006391>
- Roiz, D., Wilson, A.L., Scott, T.W., Fonseca, D.M., Jourdain, F., Müller, P., Velayudhan, R., Corbel, V., 2018. Integrated Aedes management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006845>
- Rosenthal, J., 2009. Climate Change and the Geographic Distribution of Infectious Diseases. *Ecohealth* 6, 489. <https://doi.org/10.1007/S10393-010-0314-1>
- Rotraut A. G. B. Consoli, Ricardo Lourenço de Oliveira, 1994. Principais mosquitos de importância médica no Brasil.
- Russell, R.J., Scott, C., Jackson, C.J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M.C., Coppin, C.W., Liu, J.W., Oakeshott, J.G., 2011. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evol. Appl.* 4, 225. <https://doi.org/10.1111/J.1752-4571.2010.00175.X>
- Santillan, J.Y., Muzlera, A., Molina, M., Lewkowicz, E.S., Iribarren, A.M., 2020. Microbial degradation of organophosphorus pesticides using whole cells and enzyme extracts. *Biodegradation* 31, 423–433. <https://doi.org/10.1007/S10532-020-09918-7/FIGURES/3>
- Schrekker, C.M.L., Sokolovicz, Y.C.A., Raucci, M.G., Selukar, B.S., Klitzke, J.S., Lopes, W., Leal, C.A.M., Souza, I.O.P. de, Galland, G.B., Santos, J.H.Z. dos, Mauler, R.S., Kol, M.,

- Dagorne, S., Ambrosio, L., Teixeira, M.L., Morais, J., Landers, R., Fuentefria, A.M., Schrekker, H.S., 2016. Multitask Imidazolium Salt Additives for Innovative Poly(l-lactide) Biomaterials: Morphology Control, *Candida* spp. Biofilm Inhibition, Human Mesenchymal Stem Cell Biocompatibility, and Skin Tolerance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 21163–21176.
- Schwartz, L., Brown, G. V., Genton, B., Moorthy, V.S., 2012. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar. J.* 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-11>
- Sharma, B.R., Martin, M.M., Shafer, J.A., 1984. Alkaline proteases from the gut fluids of detritus-feeding larvae of the crane fly, *Tipula abdominalis* (say) (diptera, tipulidae). *Insect Biochem.* 14, 37–44. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90081-7)
- Siddavattam, D., Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S.B., Merrick, M., 2003. Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (opd) gene cluster found in *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2533–2539. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2533-2539.2003>
- Singh, B.K., 2008. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009 7, 156–164. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2050>
- Singh, B.K., Walker, A., 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 428–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R., 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance, in: *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman and Hall, London, pp. 58–96.
- Souza-Neto, J.A., Powell, J.R., Bonizzoni, M., 2019. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect. Genet. Evol.* 67, 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Sprenger, D., Wuithiranyagool, T., 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2, 217–219.
- Strand, M.R., 2018. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr. Opin. insect Sci.* 28, 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.05.008>
- Suaya, J.A., Shepard, D.S., Siqueira, J.B., Martelli, C.T., Lum, L.C.S., Tan, L.H., Kongsin, S., Jiamton, S., Garrido, F., Montoya, R., Armien, B., Huy, R., Castillo, L., Caram, M., Sah, B.K., Sughayyar, R., Tyo, K.R., Halstead, S.B., 2009. Cost of Dengue Cases in Eight Countries in the Americas and Asia: A Prospective Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 846–855. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2009.80.846>
- Sutherst, R.W., 2004. Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 136. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.136-173.2004>

- Thera, M.A., Plowe, C. V., 2012. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu. Rev. Med.* 63, 345–357. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-022411-192402>
- Timmermann, S.E., Briegel, H., 1999. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 45, 461–470. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00147-4)
- Tomashek, K.M., Challberg, M.D., Nayak, S.U., Schiltz, H., 2019. Disease Resurgence, Production Capability Issues and Safety Concerns in the Context of an Aging Population: Is There a Need for a New Yellow Fever Vaccine? *Vaccines* 7.
- Townson, H., 1993. The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). viii 509 pp. Hard cover £50. ISBN 0-412-40180-0. *Bull. Entomol. Res.* 83, 307–308. <https://doi.org/10.1017/S0007485300034830>
- Valzania, L., Coon, K.L., Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R., 2018a. Hypoxia-induced transcription factor signaling is essential for larval growth of the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 457–465. https://doi.org/10.1073/PNAS.1719063115/SUPPL_FILE/PNAS.201719063SI.PDF
- Valzania, L., Martinson, V.G., Harrison, R.E., Boyd, B.M., Coon, K.L., Brown, M.R., Strand, M.R., 2018b. Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006638>
- Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections, Workshop Summary, 2008. . Washington (DC). <https://doi.org/10.17226/11950>
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., della Torre, A., Ranson, H., 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 126–131. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2012.05.008>
- Wang, B.Z., Guo, P., Hang, B.J., Li, L., He, J., Li, S.P., 2009. Cloning of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Sphingobium* sp. strain JZ-1 and characterization of the gene product. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5496–5500. <https://doi.org/10.1128/AEM.01298-09>
- Wasserscheid, P., Keim, W., 2000. Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. *Angew. Chemie Int. Ed.* 39, 3772–3789. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001103\)39:21<3772::AID-ANIE3772>3.0.CO;2-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001103)39:21<3772::AID-ANIE3772>3.0.CO;2-5)
- Weaver, S.C., Reisen, W.K., 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85, 328–

345. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.10.008>
- Weaver, S.C., Vasilakis, N., 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect. Genet. Evol.* 9, 523–540. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2009.02.003>
- Wei, G., Lai, Y., Wang, G., Chen, H., Li, F., Wang, S., 2017. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 5994–5999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703546114>
- Werren, J.H., 2012. Symbionts provide pesticide detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8364–8365. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1206194109/ASSET/530ABE36-BD9A-46B3-B1AB-B4EF9413DC14/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.1206194109FIG01.JPEG>
- Winding, A., Binnerup, S.J., Pritchard, H., 2004. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00261-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00261-7)
- World Health Organization, 2020. Vector-borne diseases [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- World Health Organization, 2014. A global brief on vector-borne diseases.
- World Health Organization, 2006. Pesticides and their application : for the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1.
- World Health Organization, 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.
- Wu, P.C., Liu, Y.H., Wang, Z.Y., Zhang, X.Y., Li, H., Liang, W.Q., Luo, N., Hu, J.M., Lu, J.Q., Luan, T.G., Cao, L.X., 2006. Molecular cloning, purification, and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase from *Klebsiella* sp. strain ZD112. *J. Agric. Food Chem.* 54, 836–842. <https://doi.org/10.1021/JF052691U>
- Yu, S.J., 2014. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticide*. CRC Press.
- Yun, J.H., Roh, S.W., Whon, T.W., Jung, M.J., Kim, M.S., Park, D.S., Yoon, C., Nam, Y. Do, Kim, Y.J., Choi, J.H., Kim, J.Y., Shin, N.R., Kim, S.H., Lee, W.J., Bae, J.W., 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5254–5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>

4. CAPÍTULO I: Imidazolium salts influence *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larval-associated microbiota

Imidazolium salts influence *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larval-associated microbiota

Harry Luiz Pilz-Júnior^{1*}; Alessandra Bittencourt de Lemos¹; Wellington Junior da Silva¹; Tarcisio de Freitas Milagres¹; Edmilson dos Santos²; Jáder da Cruz Cardoso²; Josiane Somariva Prophiro³; Gertrudes Corção¹; Henri Stephan Schrekker⁴; Onilda Santos da Silva¹

¹Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

²Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 5400, Porto Alegre, 90450-190, Brazil

³University of Southern Santa Catarina - UNISUL. Graduate Program in Health Sciences. Avenida José Acácio Moreira, 787, 88704-900, Tubarão, Santa Catarina, Brazil.

⁴Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

*Correspondent author: harrypilz@gmail.com

5. Capítulo II - Imidazolium salts are effective for the control of *Culex quinquefasciatus* larvae and demonstrate low impact on non-target organisms

Imidazolium salts are effective for the control of *Culex quinquefasciatus* larvae and demonstrate low impact on non-target organisms

Harry Luiz Pilz-Júnior^a; Stephanie Jansen^{b,c}; Carolina Maicá Silva^d; Juliana Fank Gomes^e; Débora Rech Volz^f; Alessandra Bittencourt de Lemos^a; Wellington Junior da Silva^a; Tarcisio Freitas Milagres^a; Josiane Somariva Prophiro^g Jonas Schmidt-Chanasit^{b,c}; Ana Luiza Ziulkoski^f; Eliane Dallegrave^e; Henri Stephan Schrekker^d; Gertrudes Corção^a; Onilda Santos da Silva^{a*}

^a Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Prédio UFRGS n° 2116, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

^b Department of Arbovirology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, 20359 Hamburg, Germany.

^c Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, University of Hamburg, Hamburg, Germany.

^d Laboratory of Technological Processes and Catalysis, Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.

^e Laboratory of Research in Toxicology, Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite 245, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

^f Laboratory of Cytotoxicity, Institute of Health Sciences, Universidade Feevale,

ERS-239 2755, Novo Hamburgo, RS, 93525-075, Brazil.

‡ Immunoparasitology Research Group, Postgraduate Program in Health Sciences and Postgraduate Program in Environmental Sciences, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. José Acácio Moreira 787, Tubarão, SC, 88704-900, Brazil.

*Corresponding author: onilda.silva@ufrgs.br

KEY MESSAGE

Pronounced larvicidal action of imidazolium salts against *Culex quinquefasciatus*

No phytotoxic effects caused by **C₁₈MImCl** in *Lactuca sativa* plants

C₁₈MImCl is cytotoxically safe and biocompatible

Acceptable oral toxicity of **C₁₈MImCl** according to regulations

ABSTRACT

The current resistance status of mosquitos to common insecticides, raises the concern for innovative formulations with novel active ingredients, especially for those who can transmit pathogens. In addition to being effective, these are not allowed to harm the environment and non-target organisms. In this context, some imidazolium salts are promising candidates due to their excellent larvicidal action against *Aedes aegypti*, however, the understanding of their impact on environment and non-target organisms is limited. Herein, the toxicity of two imidazolium salts (1-methyl-3-octadecylimidazolium chloride (**C₁₈MImCl**) and 1-hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate (**C₁₆MImMeS**) were tested in *Culex quinquefasciatus* larvae and their and toxic potential in *Lactuca sativa* plants, mouse lung fibroblasts, human keratinocytes and Wistar rats. **C₁₆MImMeS** showed excellent larvicidal activity (LC₅₀: 24 h: 5.751 µg/mL; 48 h: 4.613 µg/mL), but negatively influenced the germination rate and size of radicles and hypocotyls, together with other phytotoxic characteristics. **C₁₈MImCl** also showed being a potent larvicidal, even in the first 24 h (3.848 µg/mL) and 48 h (3.175 µg/mL), without presenting phytotoxicity against *Lactuca sativa*. **C₁₆MImMeS** was more toxic for mouse lung fibroblasts and human keratinocytes cells than **C₁₈MimCl**. Besides, the lethal median toxicity of 309 mg/kg (**C₁₈MimCl**) for oral application in Wistar rats suggests its safe application in related non-target organisms. Altogether, this is the first work showing the larvicidal potential of these IS against *Culex quinquefasciatus*, including phytotoxicity and toxicity data that are important for their release in futures formulates for the control of mosquitoes.

KEY-WORDS: Vector control; Ecotoxicology; Ionic liquids; Mosquito; Cell toxicity.

INTRODUCTION

Mosquitoes are one of the main control targets using various types of insecticides as part of interventions to reduce the transmission of mosquito-borne pathogens (Demirak and Canpolat, 2022). Despite this, several mosquito populations around the world, especially in areas of high endemic disease, have high frequencies of resistance (Deletre et al. 2019). Therefore, the development of new insecticidal compounds and formulations to meet the needs of their control is of paramount importance. Currently, the main larvicides used in the world are organophosphates, essential oils, growth regulators and entomopathogenic bacteria, however, all have limitations, especially due to the difficulty of application in water bodies and because they are toxic to non-target organisms (Weeks et al. 2021).

The control of *Culex quinquefasciatus* driven Epidemics also relies on vector control, since there are no vaccines or treatments for most of pathogens transmitted by *Cx. quinquefasciatus* that are related to this mosquito (Achee et al. 2019). This insect is present on several continents and is extremely anthropophilic through nocturnal bites, causing much discomfort. *Cx. quinquefasciatus* is considered the main vector of *Wuchereria bancrofti* and the West Nile virus (Lopes et al. 2019). Various cases of resistance have been reported for this species in different regions of the world against organochlorinated (Shemshadian et al. 2020), carbamate (Bracco et al. 1999; Yadouléton et al. 2015), pyrethroid (Campos and Andrade 2003), organophosphate (Scudeler et al. 2015) and biological insecticides (Chalegre et al. 2009; de Melo Chalegre et al. 2012).

The effects of any insecticide on the environment and non-target organisms are due to its characteristics of ecotoxicity and toxicity, respectively. Consequently, the active ingredients of insecticides should be subjected to a rigorous environmental and toxicological evaluation, where aspects related to human health and their possible impacts on the environment are considered (WHO, 2005).

In this sense, imidazolium salts (IS), and in particular, 1-methyl-3-octadecylimidazolium chloride (**C₁₈MImCl**) and 1-hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate (**C₁₆MImMeS**), are promising new larvicides. Their efficacy has already been proven for larvae of *Aedes aegypti* (Goellner et al. 2018; Pilz-Junior et al. 2019), however, it remains unclear whether they have the same efficacy in other insects or if they have some type of ecotoxicity or toxicity to non-target organisms. Therefore, our aim was to identify the larvicidal potential of these IS in *Cx. quinquefasciatus* larvae and to investigate potential (eco)toxicological effects in *Lactuca sativa* plants, cell lineages and Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Imidazolium salts

1-Methyl-3-*n*-octadecylimidazolium chloride (**C₁₈MImCl** 371.04 g/mol) and 1-*n*-hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate (**C₁₆MImMeS** 402.63 g/mol) were prepared and synthesized according to Pilz-Júnior et al. (2019).

Mosquitoes rearing

Culex quinquefasciatus and *Aedes aegypti* (long established colony from Bayer) were reared in an insectary at 26°C with a relative humidity of 70% and a 12:12 light:dark photoperiod, including twilight of 30 minutes. Rearing and feeding was done as earlier described (Dietrich et al. 2017).

Mosquitoes' bioassay

Bioassays with *Cx. quinquefasciatus* larvae were conducted as determined by the (WHO 2005). The IS concentrations tested were the same as those applied in the screening performed by Goellner *et al.* (2018), using larvae of *Ae. aegypti* with the same compounds. Thus, 8

concentrations were tested that started at 0.156 $\mu\text{g/mL}$ up to 20.0 $\mu\text{g/mL}$ (prepared with filtered water). The IS' LC₉₉ (**C₁₈MimCl**: 19.170 $\mu\text{g/mL}$; **C₁₆MimMeS**: 14.396 $\mu\text{g/mL}$) against *Ae. aegypti* and filtered water were used as positive and negative controls, respectively. Thus, 25 larvae from third to fourth instar were placed, in triplicate, in cups with foamed lid, with 100 mL of each treatment. The cups were transferred to an incubator (Binder© KBF) at 27 °C with a photoperiod of 14 h of light and 10 h of dark. Mortality was analyzed after 24 h and 48 h. This experiment was conducted three times on different days. The lethal concentrations (LC₉₉, LC₉₀ and LC₅₀) were established through probit analysis with the aid of software SPSS (IBM© SPSS® Statistics 26.0.0.0).

Phytotoxicity assay

Phytotoxicity assays were conducted according to Sobrero and Ronco (2004). *Lactuca sativa* seeds (Feltrin® Batch: 0019401610000010) were exposed to six different IS (3 up to 100 $\mu\text{g/mL}$) concentrations (prepared with filtered water), filtered water as negative control and 1% ZnSO₄ as positive control. Each assay with one of the IS was performed independently and, therefore, each was based on its respective negative control. The experiments were conducted in triplicate with 4 replications, and the phytotoxicity was evaluated through: mean and standard deviation of radicle and hypocotyl size; comparative evaluation of radicle and hypocotyl sizes compared to those of the negative control; percentage of germination inhibition; and dose of 50% inhibition. Macroscopic analyses of the general state of seedlings were also performed to establish any phytotoxic symptoms.

***In vitro* toxicity assay**

V79 (mouse lung fibroblasts) and HaCat (human keratinocytes) cell lineages were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank. The cells were cultivated in Dulbecco's modified

Eagle's medium (DMEM) (Sigma®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab®) and were maintained in a humid atmosphere at 5% CO₂ and 37 °C in a half-open system. For cytotoxicity assays, cells were seeded into 96-well plates and after reach confluence were exposed to medium contained 0.05 up to 100 µM of **C₁₈MimCl** or **C₁₆MimMeS** and 1% FBS by 24 hours. Cells from each lineage maintained in DMEM with 1% of FBS were used as the negative control (NC), and cultures incubated with 1% hydrogen peroxide (Synth®) for 30 minutes were used as positive controls.

Two biomarkers were used for evaluated the cytotoxicity at the end of exposure period: mitochondrial functionality (cell viability) by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay, and protein content (biomass) by sulforhodamine B (SRB) adsorption assay. For SRB assay, cultures were washed with phosphate buffered solution pH 7.0 (PBS), proteins were precipitated by 10% trichloroacetic acid (4°C, 1 h) and incubated with 0.4% SRB (Sigma®) for 30 minutes; then, the wells were washed with 1% acetic acid and the dye was solubilized in Tris buffer pH 10.5 (. For MTT, the medium was replaced by 0.2 mg/mL MTT (Sigma®) in PBS, incubated for 2 hours in a humid atmosphere at 5% CO₂ at 37°C, and then the solution was replaced by 200 µL of dimethylsulfoxide. The absorbance was measured using a microplate spectrophotometer M3 (Molecular Devices®) at 564 and 570 nm for SRB and MTT assay, respectively. The results were analyzed by one-way-ANOVA followed by the Tukey post-hoc-test, where $p < 0.05$ was considered significant. The CC₅₀ (concentration required for 50% reduction in cell viability) values were estimated through exponential regression.

***In vivo* acute oral toxicity assay**

After approval of the experimental protocol by the ethics committee on the use of animals at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (Opinion 663/19),

the up and down assay (OECD 2022) was performed. Adult females (90 days of age) of Wistar rats were used, raised, and maintained in the vivarium of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, under controlled conditions of temperature and humidity, receiving food and water *ad libitum*. After fasting for 4 h, a female was treated with a dose of 175 mg/kg of **C₁₈MimCl** (we used only this molecule, because at this point of the study **C₁₆MimMeS** were excluded as promising due to the toxic effects on non-targets organisms) followed by observation for 48 h. Subsequently, a second fasting female was submitted to a dose of 550 mg/kg of **C₁₈MimCl** and kept under observation. Clinical signs of toxicity and death were recorded to enable the classification of acute oral toxicity of the IS according to Globally Harmonized Classification System (GHS) for Chemical Substances and Mixtures. Also, the LD₅₀ was estimated according to OECD guideline for Up and Down Procedure.

RESULTS

Culex quinquefasciatus bioassay

When exposed to **C₁₈MimCl** or **C₁₆MimMeS**, the *Cx. quinquefasciatus* larvae were susceptible. This response was dose-dependent, i.e., mortality increased as the concentration increased, both for after 24 h and 48 h of incubation (Figure 1).

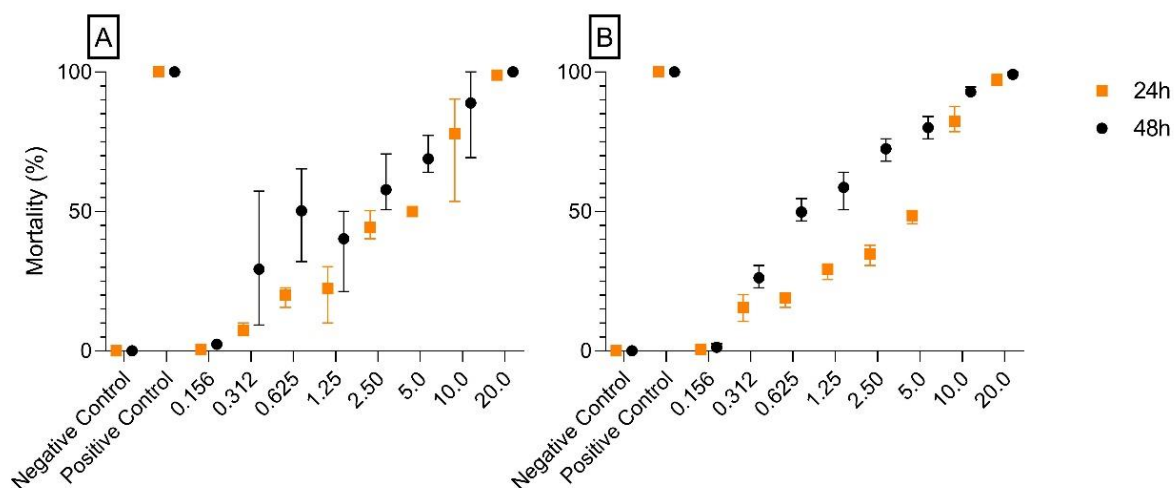


Figure 1. Percentage of mortality after 24 h (orange square) and accumulated mortality after 48 h (black circle) of *Cx. quinquefasciatus* larvae exposed to (A) $\text{C}_{18}\text{MImCl}$ and (B) $\text{C}_{16}\text{MImMeS}$. Negative control: filtered water; Positive control: LC_{99} (20 $\mu\text{g/mL}$) of the respective IS against *Ae. aegypti*. Concentrations are in $\mu\text{g/mL}$.

The values of lethal concentrations with the confidence intervals are summarized in Table 1. The lethal concentrations were calculated by probit regression and were validated once the LC_{50} confidence limits overlapped, observed by the significance level $p < 0.05$. For both IS, the lethal concentrations values dropped slightly after 48 h, except for the LC_{99} of $\text{C}_{18}\text{MImCl}$.

Table 1. Lethal concentration values of *Cx. quinquefasciatus* larvae exposed to IS. The values represent the confidence intervals. Pcs: Pearson's chi-square; df: degrees of freedom. Concentrations are in $\mu\text{g/mL}$.

	C₁₈MimCl		C₁₆MimMeS	
	24 h	48 h	24 h	48 h
LC ₅₀	3.848 (0.255-11.855)	3.175 (0.961 – 8.049)	5.751 (4.071 – 9.269)	4.613 (2.991 – 8.858)
LC ₉₀	11.731 (7.088-14.411)	11.864 (7.383 – 14.475)	14.992 (9.297 – 20.357)	13.302 (7.252 – 16.362)
LC ₉₉	18.158 (10.884 – 19.297)	18.494 (11.682 – 19.413)	22.513 (13.105 – 25.575)	20.849 (10.444 – 26.945)
Pcs	233.197	172.735	30.755	46.071
Df	6	6	6	6
<i>p</i>	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Phytotoxicity assays with *Lactuca sativa*

Measurements of hypocotyl and radicle sizes after exposure to imidazolium salts

The means and standard deviations of the hypocotyl and radicle sizes after exposure to IS are shown in Figure 2. The positive control, despite its germination (up to 90%), did not develop any measurable structure and for this reason was not included in the analysis (Sobrero and Ronco 2004). Significant differences in radicle and hypocotyl sizes were observed, mainly when treated with **C₁₆MimMeS** (Figure 2B). The 2-way ANOVA demonstrated that **C₁₈MimCl** (Figure 2A) caused no significant differences when the source of variation was the interaction between all experiments ($p = 0.0537$). Only the Tuckey multiple test confirmed that the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ resulted in a significant difference in radicle size ($p = 0.0004$).

Considering the means obtained in the control and the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$, the percentage of radicle inhibition was 48.41%.

For **C₁₆MImMeS**, the source of variation of the 2-way ANOVA showed significant differences in the interaction of the entire experiment ($p < 0.0001$). The Tuckey test revealed significant differences in radicle size, compared to the control, for the dosages of 12 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$), 25 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$), 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.0010$) and 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$). Confirming inhibition rates of 46.46, 40.92, 34.51 and 75.88% for 12, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For the hypocotyl size, the dosages of 25 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.0380$) and 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.0023$) showed significant differences with inhibition rates of 17.98% and 44.79%, respectively. From the results of the percentages of inhibition in radicle and hypocotyl sizes, the IC_{50} values of both IS were determined. For **C₁₈MImCl**, the inhibition concentration was 92.562 $\mu\text{g/mL}$ for the radicle and 284.955 $\mu\text{g/mL}$ for the hypocotyl. For **C₁₆MImMeS**, the inhibition concentration was 44.667 $\mu\text{g/mL}$ for the radicle and 107.671 $\mu\text{g/mL}$ for the hypocotyl.

Germination rate

When evaluating the germination rates, significant differences were determined between the IS studied. The experiment was considered valid since the positive control (ZnSO_4) presented more than 90% germination rate (Sobrero & Ronco, 2004). No significant difference was verified for **C₁₈MImCl** in any concentration compared to controls. For **C₁₆MImMeS**, the concentrations of 6 ($p = 0.0002$), 12, 25, 50 and 100 ($p < 0.0001$) $\mu\text{g/mL}$ showed significant differences with the negative control and demonstrated that the germination rate was dose dependent. Higher concentrations resulted in lower germination rates (Figure 2 A and B).

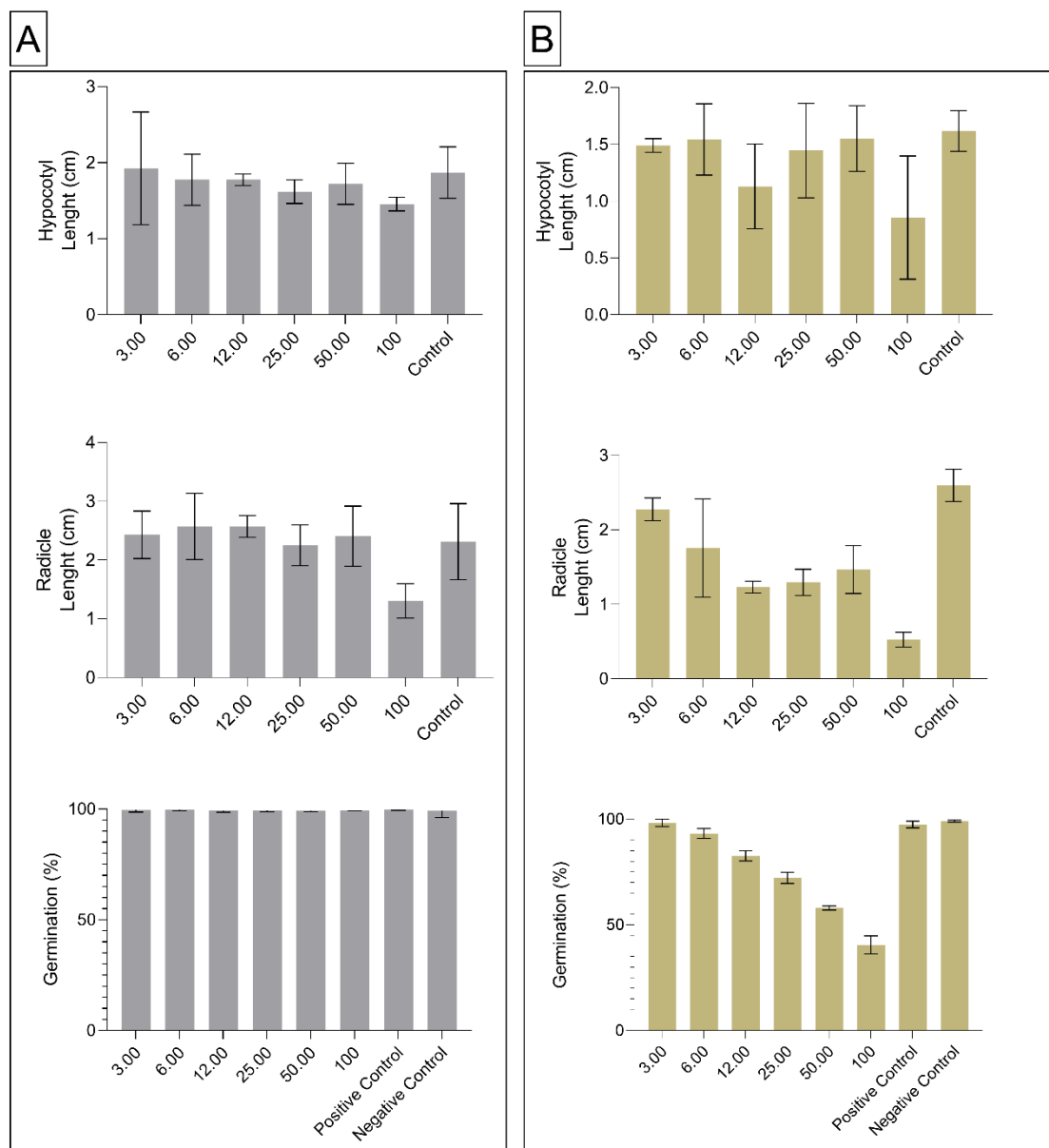


Figure 2. Means and standard deviations of hypocotyl and radicle sizes and germination rate of *L. sativa* plants exposed to (A) **C₁₈MImCl** and (B) **C₁₆MImMeS**. The concentrations are in μg/mL.

Macroscopic evaluation

To establish other characteristics that may demonstrate phytotoxicity, a morphological analysis was performed in each seedling. For **C₁₈MImCl**, no abnormal features were observed. For **C₁₆MImMeS**, important characteristics were observed, which indicate signs of toxicity.

Some seedlings showed the characteristic of the hypocotyl with low or no radicle emergence. In none of the treatments, other important indicators such as necrotic root apices, root malformation or other types of abnormal germination were visualized.

***In vitro* toxicity assay**

For V79 cells (fibroblasts), **C₁₈MimCl** was biocompatible until 5 μ M observing both cell viability (Figure 3A) and biomass (Figure 3B) biomarkers. The same IS showed only 50% cell viability at 10 μ M, reaching more than 80% of toxicity at 50 and 100 μ M. A similar pattern of response was observed for **C₁₆MimMeS** (Figure 3C and 3D). The CC₅₀ estimated for **C₁₈MimCl** was 12.8 μ M and for **C₁₆MimMeS** was 11.5 μ M.

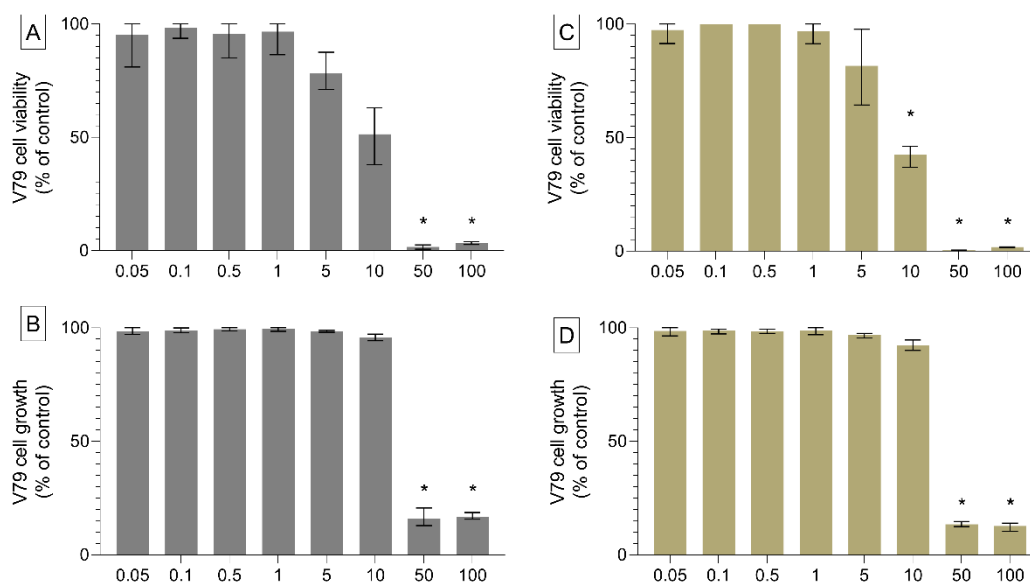


Figure 3: Cytotoxicity of **C₁₈MimCl** (A and B) and **C₁₆MimMeS** (C and D) for V79 cell line determined by MTT assay (A and C) and SRB assay (B and D) after 24 hours of exposure. The (*) indicates difference from the negative control (One-way ANOVA and Tukey post-hoc, $p < 0.05$). Concentrations are in μ M.

The results obtained for HaCat cells (keratinocytes) showed a decrease around 35% in cell viability (Figure 4A) for **C₁₈MimCl** 5 and 10 μM , while 50 and 100 μM caused an important cytotoxicity (88 and 97%, respectively). However, this toxicity effect was not observed in the biomass determination (Figure 4B). **C₁₆MimMeS** showed 70% of cell viability with 1 and 5 μM , decreasing to 50% with 10 μM and less than 1% of cells survived with the higher concentrations (Figure 4C). The results for biomass (Figure 4D) demonstrated decrease of 50% with 10 μM , but curiously 50 and 100 μM was not toxic. The CC_{50} estimated for **C₁₈MimCl** was 18,1 μM and for **C₁₆MimMeS** was 6,2 μM .

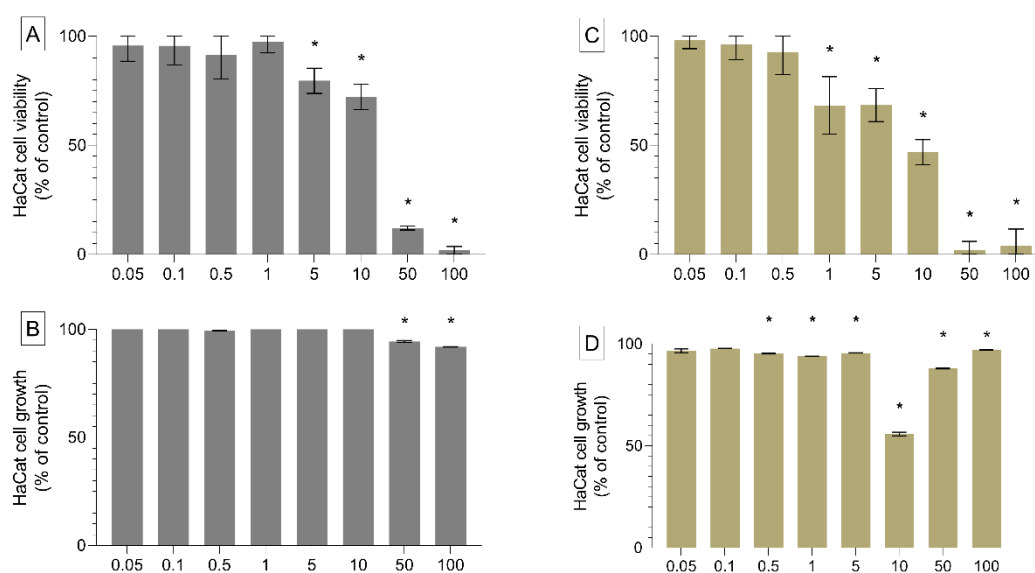


Figure 4: Cytotoxicity of **C₁₈MimCl** (A and B) and **C₁₆MimMeS** (C and D) for HaCat cell line determined by MTT assay (A and C) and SRB assay (B and D) after 24 hours of exposure. The (*) indicates difference from the negative control (One-way ANOVA and Tukey post-hoc, $p < 0.05$). Concentrations are in μM .

***In vivo* acute oral toxicity**

The evaluation of acute oral toxicity was only performed with **C₁₈MImCl**, since **C₁₆MImMeS** demonstrated severe phytotoxicity. This was done in Wistar rats by the up and down assay (OECD 425), which allowed estimating the acute median lethal dose (LD₅₀) at 309 mg/kg. In this trial, the rat treated with the dose of 175 mg/kg did not manifest any clinical signs, as well as macroscopic changes, after euthanasia performed at the end of the observation period of 48 h. At the dose of 550 mg/kg, the rat manifested reverse peristalsis and diarrhea in the first hour after treatment, and the clinical presentation progressed to death within 24 h. Signs of hepatic congestion and intestinal distension were observed at necropsy.

DISCUSSION

The impact of the IS **C₁₈MImCl** and **C₁₆MImMeS** on the mortality of *Cx. quinquefasciatus* larvae was similar, however, the LC values are lower for **C₁₈MImCl**. In general, both IS presented after 48 h lower LCs than after 24 h. The only exception is the LC₉₉ of **C₁₈MImCl** as 100% mortality was already reached within the first 24 h. This are the first results on the efficacy of these IS as larvicides against *Cx. quinquefasciatus*.

With *Ae. aegypti* larvae after 48 h, Goellner *et al.* (2018) reported LC₅₀ values for **C₁₆MImMeS** and **C₁₈MImCl** of 6.040 µg/mL and 9.63 µg/mL, respectively. In the current study with *Cx. quinquefasciatus* larvae after 48 h, we obtained lower LC₅₀ values, which suggests that, at least at the laboratory level, *Cx. quinquefasciatus* larvae are more susceptible to the studied IS.

Interestingly, the study conducted by Selvarajoo *et al.* 2017 showed lower toxic levels when combating *Ae. aegypti* (LC₅₀ = 21.78 to 69.22 ppm) in contrast to *Cx. Quinquefasciatus* (24.81 to 159.73 ppm) larvae with four bis-imidazolium salts attached with silver(I)-complexes containing *N*-heterocyclic carbene ligands (neutral equivalent of the imidazolium cation).

The chemical nature of an insecticide can influence its effectiveness, especially if the

insecticides have some residual action (Brühl et al. 2021), however, it must be considered that the LC values presented here refer to *Cx. quinquefasciatus* larvae raised in the laboratory, in nature these larvae are usually in water rich in organic matter (Rocha David et al. 2012), and therefore these concentrations may change, taking into account the natural habitat of the larvae. Perhaps there may also be a different mechanism of action when compared to *Ae. aegypti*. Thus, future analysis must be done to clarify the mode of action for *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* and their LC values in their natural habitats.

As for phytotoxic effects, according to Sobrero & Ronco (2004), the effects on seed germination can be seen as a lethal effect (depending on the death of the embryo in the seed), while the effects on the size of radicle and hypocotyl are sublethal effects. Only **C₁₆MImMeS** had a negative influence on seed germination, unlike **C₁₈MImCl**, where no significant difference was visualized in any of the applied concentrations.

Another important feature for **C₁₆MImMeS** was the decrease in radicle size in various dosages, which was only observed in the highest dose for **C₁₈MImCl**. This could be explained through their strong interaction with biological systems, which may have reduced the production of auxin, interfering in metabolic routes that have this hormone as a product, such as the shikimic acid route (Gomes et al. 2014).

The inhibition concentration levels, established through the rate of growth inhibition of the radicle and hypocotyl, confirm that **C₁₈MImCl** has an IC₅₀ value at least twice as high as the diagnostic dose for larvae. In agreement with the regulations of the WHO (2005), **C₁₈MImCl** can be considered as a safe larvicide in the context of phytotoxicity (IC₅₀ is at least twice the CL₉₉). For **C₁₆MImMeS**, the IC₅₀ is equal to the CL₉₉, indicating that this compound is not safe, at least under current conditions, to be used as larvicide.

C₁₆MImMeS was more toxic than **C₁₈MImCl** for both cell types, however cytotoxicity was higher for V79, which are of connective tissue, internal to organs, than for HaCat, which

represent contact epithelium with the external environment. This indicates that they can be used safely since, as larvicides, skin contact would be occasional (during application or by leaching). The apparent increase in protein content observed at higher concentrations of **C₁₆MImMeS** may be related to the formation of IS film/aggregates or to the induction of keratinization of the epithelial cell monolayer.

On acute oral toxicity in Wistar rats, it is important to note that the toxicity of **C₁₈MImCl**, based on its DL₅₀, is classified in category 4 (>300 and ≤ 2000 mg/kg), according to the Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (United Nations 2021). For instance, the insecticide pyrethrin cypermethrin (416.98 mg/kg) (Bhushan et al. 2013), widely used in vector control, is part of the same category. In Brazil, for example, according to the National Health Surveillance Agency (ANVISA), an solid form insecticide needs to demonstrate an LD₅₀ greater than 50 mg/kg of body weight, thus in the Brazilian context this molecule can be used in future formulations for mosquito control (ANVISA 2022).

Thus, **C₁₈MImCl** is a promising alternative as larvicide in the context of safety for non-target organisms, although other organisms need to be tested and, long term assays for a more detailed understanding of its scope.

CONCLUSION

This study further classified the IS **C₁₈MImCl** as a promising larvicide, confirming its larvicidal action against *Cx. quinquefasciatus*, in addition to its already known action against *Ae. aegypti*. This IS also can be considered as safe in the context of phytotoxic effects on *L. sativa* plants and to fibroblasts and keratinocytes cell linages. Besides, the toxic effect of orally applied **C₁₈MImCl**, using Wistar rats as a model of a non-target organism, is classified in the same category of the insecticide pyrethrin cypermethrin. In conclusion, **C₁₈MImCl** proved to be a promising future alternative as larvicide, especially considering the resistance of *Cx.*

quinquefasciatus to widely used insecticides.

DECLARATIONS

ETHICAL APPROVAL

Experiments *in vivo* was approved by the ethics committee on the use of animals at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (Opinion 663/19)

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the study and design of the manuscript. Material preparation and analysis were performed by Harry Luiz Pilz-Júnior, Stephanie Jansen, Carolina Maicá Silva, Juliana Fank Gomes, Débora Rech Volz, Alessandra Bittencourt de Lemos, Wellington Junior da Silva, Tarcisio Freitas Milagres and Josiane Somariva Prophiro. This work was supervised and reviewed by Jonas Schmidt-Chanasit, Ana Luiza Ziulkoski, Eliane Dallegrave, Henri Stephan Schrekker, Gertrudes Corção and Onilda Santos da Silva. *All authors read and approved the final manuscript.*

FUNDING

This work was funded by the Research Program for SUS: shared management in health (Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde) - PPSUS through Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPERGS) and the Call (Chamada) Decit/SCTIE/MS-CNPq-

FAPERGS No 08/2020. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to funding provided by Research Program for SUS: shared management in health (Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde) - PPSUS through Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPERGS) and the Call (Chamada) Decit/SCTIE/MS-CNPq-FAPERGS No 08/2020. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, especially for the scholarships.

REFERENCES

- Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, et al (2019) Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0006822.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- ANVISA (2022) RDC n° 682, de 2 de maio de 2022. Brazil
- Bhushan B, Saxena PN, Saxena N (2013) Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cyfluthrin. *Arh Hig Rada Toksikol* 64:57–67.
<https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2184>
- Bracco JE, Barata JMS, Marinotti O (1999) Evaluation of Insecticide Resistance and Biochemical Mechanisms in a Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:115–120.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100022>

Brühl CA, Bakanov N, Köthe S, et al (2021) Direct pesticide exposure of insects in nature conservation areas in Germany. *Sci Reports* 2021 111 11:1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03366-w>

Campos J, Andrade CFS (2003) Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. *Rev Saude Publica* 37:523–527.

<https://doi.org/10.1590/S0034-89102003000400019>

Chalegre KDDM, Romão TP, Amorim LB, et al (2009) Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl Environ Microbiol* 75:1044–1049.

[https://doi.org/10.1128/AEM.02032-08/ASSET/B09A202D-47E0-49FE-93EE-](https://doi.org/10.1128/AEM.02032-08/ASSET/B09A202D-47E0-49FE-93EE-2C8423143254/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0040996220003.JPEG)

[2C8423143254/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0040996220003.JPEG](https://doi.org/10.1128/AEM.02032-08/ASSET/B09A202D-47E0-49FE-93EE-2C8423143254/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0040996220003.JPEG)

de Melo Chalegre KD, Romão TP, Tavares DA, et al (2012) Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. *Appl Environ Microbiol* 78:6321–6326. [https://doi.org/10.1128/AEM.01199-](https://doi.org/10.1128/AEM.01199-12/SUPPL_FILE/ZAM999103609SO2.PDF)

[12/SUPPL_FILE/ZAM999103609SO2.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.01199-12/SUPPL_FILE/ZAM999103609SO2.PDF)

Deletre E, Martin T, Duménil C, Chandre F (2019) Insecticide resistance modifies mosquito response to DEET and natural repellents. *Parasites and Vectors* 12:1–10.

<https://doi.org/10.1186/S13071-019-3343-9/TABLES/4>

Demirak MŞŞ, Canpolat E (2022) Plant-Based Bioinsecticides for Mosquito Control: Impact on Insecticide Resistance and Disease Transmission. *Insects* 2022, Vol 13, Page 162

13:162. <https://doi.org/10.3390/INSECTS13020162>

Dietrich I, Jansen S, Fall G, et al (2017) RNA Interference Restricts Rift Valley Fever Virus in Multiple Insect Systems. *mSphere* 2:. <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00090-17>

Goellner E, Schmitt AT, Couto JL, et al (2018) Larvicidal and residual activity of imidazolium

- salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci* 74:.
<https://doi.org/10.1002/ps.4803>
- Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, et al (2014) Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J Exp Bot* 65:4691–4703.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERU269>
- Lopes RP, Lima JBP, Martins AJ (2019) Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: A review. *Parasites and Vectors* 12:1–12. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3850-8/TABLES/1>
- OECD (2022) Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. OECD
- Pilz-Junior HL, de Lemos AB, de Almeida KN, et al (2019) Microbiota potentialized larvicidal action of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Sci Rep* 9:16164.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52687-4>
- Rocha David MI, Maciel de Freitas RI, Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz Rio de Janeiro P, et al (2012) Bionomics of *Culex quinquefasciatus* within urban areas of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 46:858–865. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012000500013>
- Scudeler C, Scudeler CG da S, Arruda EJ, et al (2015) Larval Susceptibility of Two *Culex quinquefasciatus* Populations (Diptera: Culicidae) Temephos® in the City of Naviraí, MS, Brazil. *Orbital Electron J Chem* 7:270–274. <https://doi.org/10.17807/orbital.v7i3.746>
- Selvarajoo PD, Haque RA, Haziz UFM, et al (2017) Dinuclear silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization and larvicidal activity of bis-imidazolium dinuclear silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes. *J Inorg Biochem* 175:232–238.
<https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2017.07.030>
- Shemshadian A, Abai MR, Vatandoost H, et al (2020) Assessment the Changing Trend of Susceptibility to Two Insecticides among Field-Population *Culex quinquefasciatus*

Compared with the Same Population Undergoing to Multiple Colonization. *J Arthropod Borne Dis* 14:185–192. <https://doi.org/10.18502/JAD.V14I2.3736>

Sobrero MC, Ronco A (2004) Ensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga *Lactuca sativa* L. In: Castillo G (ed) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA, p 202

United Nations (2021) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, Ninth. New York and Geneva

Weeks ENI, Kroll KJ, Johnson TS, et al (2021) Novel effective mosquito larvicide DL-methionine: Lack of toxicity to non-target aquatic organisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 213:112013. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112013>

WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Heal Organ* 1–41

Yadouléton A, Badirou K, Agbanrin R, et al (2015) Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. *Parasit Vectors* 8:. [https://doi.org/10.1186/S13071-015-0638-](https://doi.org/10.1186/S13071-015-0638-3)

6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E EFICÁCIA DE UM NOVO LARVICIDA PARA O CONTROLE DE POPULAÇÕES DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

Desenvolvimento e eficácia de um novo larvicida para o controle de populações de mosquitos vetores de doenças

RELATÓRIO TÉCNICO

DESENVOLVIMENTO E EFICÁCIA DE UM NOVO LARVICIDA PARA O CONTROLE DE POPULAÇÕES DE MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

Harry Luiz Pilz Júnior; Alessandra Bittencourt de Lemos; Wellington Junior da Silva; Lidia Mariana Fiuza; Henri Stephan Schrekker; Onilda Santos da Silva

RESUMO

Doenças transmitidas por mosquitos ainda representam uma ameaça significativa para a saúde pública em todo o mundo. Nesse contexto, inseticidas, especialmente larvicidas, desempenham um papel crucial no controle da propagação dessas doenças, visando as larvas dos mosquitos antes que elas possam se tornar adultos e disseminar a doença. Este relatório técnico apresenta o desenvolvimento de um novo larvicida baseado em um sal imidazólico e avalia sua eficácia em testes simulados de campo e em diferentes condições de temperatura em um ambiente laboratorial. O novo larvicida foi formulado e caracterizado, resultando em um composto altamente ativo e estável. A eficácia do larvicida foi avaliada em campo, demonstrando uma redução significativa na população de larvas de mosquito. Além disso, testes laboratoriais realizados em diferentes temperaturas revelaram que o larvicida permaneceu eficaz mesmo em temperaturas extremas. Nossas descobertas sugerem que este larvicida tem um potencial significativo como uma ferramenta para controlar doenças transmitidas por mosquitos em áreas

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de larvicidas é uma das principais estratégias de controle desses mosquitos, visto que a eliminação das larvas reduz a quantidade de mosquitos adultos e, conseqüentemente, o risco de transmissão dessas doenças. Esta tese de doutorado teve como um dos objetivos investigar o impacto dos sais imidazólicos na microbiota de larvas de campo de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que são os principais vetores responsáveis pela transmissão de doenças como dengue, Chikungunya e Zika.

Os resultados obtidos indicaram que os sais imidazólicos são capazes de modificar a dinâmica bacteriana nas larvas, afetando a riqueza e diversidade de espécies presentes na microbiota. Isso sugere que algumas espécies bacterianas podem ser beneficiadas pela presença da molécula e auxiliar no seu modo de ação. Além disso, foram identificadas mudanças em rotas metabólicas importantes na microbiota, que podem estar relacionadas ao sistema nervoso das larvas.

Entre os sais imidazólicos testados, o **C18MImCl** mostrou-se o mais promissor como larvicida, uma vez que não demonstrou toxicidade em plantas de *Lactuca sativa* e apresentou uma dosagem letal menor para ratos do que outros inseticidas disponíveis no mercado. Além disso, o composto mostrou eficácia como larvicida para larvas de *Culex quinquefasciatus*. Já o **C16MImMeS**, embora tenha demonstrado eficácia como larvicida, mostrou-se fitotóxico e, portanto, não é uma boa opção para formulação do larvicida.

Outro aspecto importante avaliado no estudo foi a segurança do composto para uso em humanos. As concentrações testadas em linhagens celulares de queratinócitos, que simulam a ação do composto sobre a pele humana, e fibroblastos pulmonares, que simulam a aspiração acidental, mostraram-se favoráveis para o **C18MImCl**. Além disso, a dose letal em ratos está dentro dos limites recomendados pelos órgãos reguladores.

Com base nesses resultados, foi desenvolvido um formulado a base de sais imidazólicos, que foi testado em diferentes temperaturas e condições simuladas de campo. Os resultados indicaram que o produto é eficaz mesmo em temperaturas extremas e apresenta uma ação residual maior em comparação com outros larvicidas comerciais.

Em suma, o estudo em questão contribui para o avanço do conhecimento sobre a ação dos sais imidazólicos como larvicidas e destaca o potencial do composto **C18MImCl** como uma opção segura e eficaz para o controle das populações de mosquitos vetores de doenças. A utilização de larvicidas como estratégia de controle é uma medida importante para reduzir a incidência de doenças transmitidas por mosquitos, além de contribuir para a promoção

da saúde pública e bem-estar da população.