



PEDRO HENRYQUE DE CASTRO

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE GRÃOS DE CAFÉ
VERDE E TORRADO DE QUALIDADE INFERIOR PARA
LARVAS DE *Aedes* (= *Stegomyia*) *aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE)**

LAVRAS-MG

2023

PEDRO HENRYQUE DE CASTRO

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO
DE QUALIDADE INFERIOR PARA LARVAS DE *Aedes* (= *Stegomyia*) *aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

**TOXICITY OF LOW QUALITY GREEN AND ROAST COFFEE BEANS
EXTRACTS FOR LARVAE OF *Aedes* (= *Stegomyia*) *aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

Orientadora

Prof. Dr. Geraldo Andrade de Carvalho

Coorientador

LAVRAS-MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Castro, Pedro Henryque de.

Toxicidade de extratos de grãos de café verde e torrado de
qualidade inferior para larvas de *Aedes* (= *Stegomyia*) *aegypti*
(Diptera: Culicidae)/ Pedro Henryque de Castro. - 2023.

70 p. : il.

Orientador(a): Joziana Muniz de Paiva Barçante.

Coorientador(a): Geraldo Andrade Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Dengue. 2. *Coffea arabica*. 3. Produto Botânico. I. Barçante,
Joziana Muniz de Paiva. II. Carvalho, Geraldo Andrade.

PEDRO HENRYQUE DE CASTRO

**TOXICIDADE DE EXTRATOS DE GRÃOS DE CAFÉ VERDE E TORRADO
DE QUALIDADE INFERIOR PARA LARVAS DE *Aedes (=Stegomyia) aegypti*
(DIPTERA: CULICIDAE)**

**TOXICITY OF LOW QUALITY GREEN AND ROAST COFFEE BEANS
EXTRACTS FOR LARVAE OF *Aedes (=Stegomyia) aegypti* (DIPTERA:
CULICIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de agosto de 2023

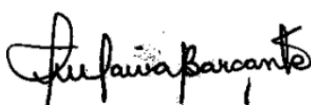
Branca examinadora:

Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante - UFLA

Dr. Geraldo Andrade de Carvalho - UFLA

Dra. Grasielle Caldas D`Ávila Pessoa – UFMG

Dra. Joseane Camila de Castro – UFLA



Prof. Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante

Orientadora

Prof. Dr. Geraldo Andrade de Carvalho

Coorientador

LAVRAS-MG

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às minhas duas mães Raquel de Castro e Terezinha de Jesus Castro por todo o apoio, amor e palavras de sabedoria, eu amo vocês. Ao meu pai Luciano Ribeiro Barbosa, minhas tias Jacqueline de Castro e Renata de Castro, sem vocês essa jornada não teria sentido.

À Bruna Ferreira que sempre me apoiou; à Ana Luiza Rodrigues Pereira pelas palavras sábias e distração, aos meus amigos da Agronomia.

A todos os amigos que fiz na UFLA, em especial a Gabriella Melo, Vanessa Exteckoetter e Paola Queiroz Ciências Biológicas 20A, é incrível ver o quanto cada um cresceu e seguiu seu caminho e ainda sim continuamos a nos falar, amo vocês.

Aos amigos que fiz em Toronto, os dias que eu passei com vocês foi de muito aprendizado. Em especial ao Matt e a JeHii.

À Ingrid Marciano Alvarenga, que de coorientadora virou uma grande amiga que me deu suporte, amo você!

À minha orientadora, Joziana Muniz de Paiva Barçante, sem você nada disso seria possível, obrigado por acreditar em mim, eu sempre vou levar comigo seus ensinamentos.

Ao meu coorientador Geraldo Andrade de Carvalho que, embora o pouco tempo que convivemos, foi de extrema importância para o meu crescimento profissional.

Ao NEP e ao NUPEB por me apresentarem a parasitologia e me fazerem apaixonar por ela diariamente.

Ao pessoal da UFMG que me recebeu muito bem e sempre apoiou esse projeto, em especial à Profa. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa e ao Artur Metzker Serravite. A Profa. Maria das Graças e a Antonia Isadora Fernandes por também contribuírem.

À EMBRAPA CAFÉ (Projeto: 129 - Desenvolvimento, caracterização física, química e biológica e potencial de uso alimentício e farmacológico de xarope à base de cafés de qualidade inferior) sob coordenação do Prof. Luis Roberto Batista.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro.

E ao PPGCV - UFLA e ao Prof. Luis David Solis Murgas

RESUMO

O controle de *Aedes aegypti* tem sido feito por meio de inseticidas químicos sintéticos. No entanto, tem-se registrado vários casos de seleção de populações resistentes. Desta forma, os produtos botânicos têm surgido como alternativa promissora para o manejo desse inseto vetor, visto que apresentam interações multifacetadas com os seus sítios de ação e baixa contaminação ambiental. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade de extratos de café verde e torrado de qualidade inferior para larvas de *A. aegypti*. Para a extração dos extratos de café foi utilizado a técnica de refluxo sólido-líquido com metanol como solvente e a caracterização dos compostos presentes foi feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Avaliaram-se os efeitos do extrato de café verde com DMSO[®] (CVD), extrato de café verde com Tween 80[®] (CVT), extrato de café torrado com DMSO[®] (CTD) e extrato de café torrado com Tween 80[®] (CTT) sobre *A. aegypti*. Esses tratamentos foram testados em várias concentrações (4; 2; 1,6; 1,2; 1; 0,45; 0,25 e 0,12 mg/mL). Os tratamentos controles foram água sem cloro, DMSO a 1% e Tween 80 a 1%. O bioensaio, em delineamento inteiramente casualizado, consistiu de 15 larvas de terceiro instar de *A. aegypti* para cada tratamento, obtidas da criação de laboratório, com quatro repetições, sendo cada uma representada por uma larva. A mortalidade foi avaliada às 24, 48 e 72 horas após a adição dos extratos para se estimar a dose letal (DL) necessária para matar 50, 90 e 99% das larvas. Também foi avaliado o efeito do composto majoritário (ácido cafeico) por meio do mesmo protocolo usado para os extratos. Os compostos majoritários em ordem de maior concentração encontrado nos extratos foram o ácido cafeico, ácido clorogênico e a catequina (somente nos extratos de café torrado). Às 72 horas, CTT (4 mg/mL) causou 99,2% de mortalidade, seguido por 83,3% para CVD e 55% para CVT. O extrato CTD (2 mg/mL) causou 73,3% de mortalidade. A DL₅₀ estimada para CTT foi de $0,33 \pm 0,22$ mg/mL; seguida por $1,43 \pm 0,05$ para CTD; $2,53 \pm 0,1$ para CVD e $2,57 \pm 0,25$ para CVT. O ácido cafeico isolado provocou baixa mortalidade à concentração de 6,42 mg/mL. Concluímos que os extratos de café são tóxicos para larvas de *A. aegypti*, enquanto o ácido cafeico isolado apresenta baixa mortalidade, o que sugere a ocorrência de sinergia com outros compostos dos extratos. Pesquisas adicionais são necessárias para compreender melhor a ação do composto no ambiente e sua sinergia com outros componentes dos extratos de café.

Palavras-chave: Dengue. *Coffea arabica*. Produto Botânico.

ABSTRACT

The control of *Aedes aegypti* has been carried out through synthetic chemical insecticides. However, several cases of the selection of resistant populations have been recorded. Thus, botanical products have emerged as a promising alternative for the management of this vector insect, as they exhibit multifaceted interactions with their target sites and low environmental contamination. The objective of the present study was to evaluate the toxicity of extracts from green and inferior-quality roasted coffee for *A. aegypti* larvae. The coffee extracts were obtained using the solid-liquid reflux technique with methanol as the solvent, and the characterization of the compounds present was done through High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The effects of green coffee extract with DMSO® (CVD), green coffee extract with Tween 80® (CVT), roasted coffee extract with DMSO® (CTD), and roasted coffee extract with Tween 80® (CTT) on *A. aegypti* were evaluated. These treatments were tested at various concentrations (4, 2, 1.6, 1.2, 1, 0.45, 0.25, and 0.12 mg/mL). Control treatments included chlorine-free water, 1% DMSO, and 1% Tween 80. The bioassay, in a completely randomized design, consisted of 15 third-instar *A. aegypti* larvae for each treatment, obtained from the laboratory breeding, with four replications, each represented by one larva. Mortality was assessed at 24, 48, and 72 hours after the addition of the extracts to estimate the lethal dose (LD) required to kill 50, 90, and 99% of the larvae. The effect of the major compound (caffeic acid) was also evaluated using the same protocol as for the extracts. The major compounds, in order of highest concentration found in the extracts, were caffeic acid, chlorogenic acid, and catechin (only in roasted coffee extracts). At 72 hours, CTT (4 mg/mL) caused 99.2% mortality, followed by 83.3% for CVD and 55% for CVT. The CTD extract (2 mg/mL) caused 73.3% mortality. The estimated LD₅₀ for CTT was 0.33 ± 0.22 mg/mL, followed by 1.43 ± 0.05 for CTD, 2.53 ± 0.1 for CVD, and 2.57 ± 0.25 for CVT. Isolated caffeic acid caused low mortality at a concentration of 6.42 mg/mL. We conclude that coffee extracts are toxic to *A. aegypti* larvae, while isolated caffeic acid exhibits low mortality, suggesting the occurrence of synergy with other compounds in the extracts. Further research is needed to better understand the compound's action in the environment and its synergy with other components of coffee extracts.

Keywords: Dengue. *Coffea arabica*. Botanical Product.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo evolutivo de <i>Aedes aegypti</i> em condições ambientais favoráveis	15
Figura 2 – Ovos de <i>Aedes aegypti</i> evidenciando a coloração escurecida.....	16
Figura 3 - Larvas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes ínstares de desenvolvimento	18
Figura 4 - Pupa do inseto <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 5 - Adulto da espécie <i>Aedes aegypti</i> emergindo de uma pupa, sendo possível observar a exúvia e o adulto repousando sobre o espelho d'água.....	19
Figura 6 - Adulto de <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 7 - Colônia de <i>Aedes aegypti</i> da Universidade Federal de Lavras	30
Figura 8 - Placa contendo ração macerada fornecida para larvas L1 de <i>Aedes aegypti</i> e cuba com a água suja e após a troca por uma nova água declorada	31
Figura 9- Recipientes utilizados para separar as pupas das larvas e para alimentação dos adultos na colônia de <i>Aedes aegypti</i>	32
Figura 10 - Esquema resumido da metodologia empregada para obtenção de extrato de café verde e torrado	33
Figura 11 - Preparação das soluções utilizadas no experimento e diluição.....	35
Figura 12 - Preparação das soluções utilizadas nos tratamentos controles nos bioensaios com larvas de <i>Aedes aegypti</i>	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de dose e resposta da mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> às 24, 48 e 72 h após a exposição ao tratamento Café Verde e DMSO como solvente.....	40
Gráfico 2 - Curva de dose e resposta da mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> às 24, 48 e 72h após a exposição ao tratamento Café Verde e Tween como solvente.....	41
Gráfico 3 – Curva de dose e resposta da mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> às 24, 48 e 72h após a exposição ao tratamento Café Torrado e DMSO como solvente.....	42
Gráfico 4 - Curva de dose e resposta da mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> às 24, 48 e 72h após a exposição ao tratamento Café Torrado e Tween como solvente.....	43
Gráfico 5 - Análise da regressão e variabilidade entre diferentes tratamentos em larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 de exposição.....	44
Gráfico 6 - Análise da regressão e variabilidade entre diferentes tratamentos em larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 48h de exposição.....	45
Gráfico 7 - Análise da regressão e variabilidade entre diferentes tratamentos em larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 72h de exposição.....	46
Gráfico 8 – Comparação estatística utilizando o teste de Tukey dos resultados da DL50 entre diferentes tratamentos.....	48
Gráfico 9 - Mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> às 24, 72 e 48 h após a exposição ao tratamento de toxicidade do composto majoritário.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos presentes nos extratos de café verde e torrado identificados por meio da técnica de HPLC.....	34
Tabela 2 - Doses letais 50, 90 e 99 necessárias para matar larvas de <i>Aedes aegypti</i> às 72 h de exposição dos tratamentos de café torrado e café verde com os solventes DMSO e Tween	47

LISTA DE FÓRMULAS

Equação 1 - Equação utilizada para calcular a quantidade de composto a ser utilizado no bioensaio de toxicidade do composto majoritário	38
Equação 2 - Função logit utilizada para calcular as Doses Letais 50, 90 e 99	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1.	CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DE <i>A. aegypti</i>	14
2.2.	Aspectos bioecológicos de <i>A. aegypti</i>	14
2.2.1	Ovo	16
2.2.2	Larva.....	17
2.2.3	Pupa	18
2.2.4	Adulto	19
2.3	Importância médica e veterinária de <i>A. aegypti</i>	21
2.4	Controle de <i>A. aegypti</i>	22
2.4.1	Resistência de <i>A. aegypti</i> a inseticidas sintéticos e métodos alternativos de controle	23
2.4.2	Uso de produtos botânicos no controle de <i>A. aegypti</i>	25
3	OBJETIVO.....	29
3.1.	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.	Cepa de <i>A. aegypti</i>	30
5.2	Amostragem e obtenção dos extratos de café	33
5.3	Pré-teste de toxicidade dos solventes e preparação das soluções a serem avaliadas	35
5.4	Bioensaio de toxicidade dos extratos para larvas de <i>A. aegypti</i>	35
5.5	Toxicidade do composto majoritário para larvas de <i>A. aegypti</i>	38
5.6	Análise estatística	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Avaliação da toxicidade do extrato de café verde	39
6.1.1	Efeito do extrato de café verde em solvente DMSO 1% sobre larvas de <i>A. aegypti</i>	39
6.1.2	Efeito do extrato de café verde em solvente DMSO 1% sobre larvas de <i>A. aegypti</i>	41
6.2	Avaliação da toxicidade do extrato de café torrado	42
6.2.1	Efeito do extrato de café torrado em solvente DMSO 1% sobre larvas de <i>A. aegypti</i>	42
6.2.2	Efeito do extrato de café torrado em solvente Tween 1% sobre larvas de <i>A. aegypti</i>	43
6.3	Toxicidade dos extratos para larvas de <i>A. aegypti</i>	44
6.4	Determinação das Doses Letais dos extratos de café	47
6.5	Avaliação da toxicidade do composto majoritário para larvas de <i>A. aegypti</i>	48
7	DISCUSSÃO.....	49
8	CONCLUSÕES.....	53

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) descrito por Linnaeus em 1762 é transmissor de uma série de patógenos, dentre eles alguns arbovírus, como o vírus Dengue, que causam impacto na saúde pública. Além disso, o inseto tem ganhado a cada dia mais capacidade de se tornar vetor de novos agentes causadores de infecções. Essa capacidade está intimamente relacionada ao aumento da urbanização, antropofilia, mudanças climáticas e globalização (RYAN et al., 2019).

No Brasil não há imunizantes disponíveis no Sistema Único de saúde para a Dengue, sendo que a incidência, de acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, de casos/100 mil habitantes foi de 647, com aumento de 22% em relação ao ano de 2022. Os números de casos prováveis registrados até a 22ª semana epidemiologia (SE22) foi de 1.379.983, sendo 15.519 casos graves de dengue. Com relação ao número de óbitos, até a SE22 foram registrados 635 óbitos e 420 seguem em investigação, sendo que a letalidade da doença foi calculada em 4,1% (BRASIL, 2023). Vários autores relataram a coinfeção causada pela transmissão simultânea de Dengue, Zika e Chikungunya por meio da picada do mosquito infectado que pode levar à morte (VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2016; SUWANMANEE et al., 2018; MERCADO-REYS et al., 2019).

De acordo com as diretrizes de controle do *A. aegypti* (BRASIL, 2009), o controle desse mosquito vetor se baseia em remoção mecânica, ações de educação em saúde e o controle químico, por meio de inseticidas sintéticos que quando usados de forma errada podem causar a seleção de populações resistentes (VALLE et al., 2019). Isto leva a um gasto econômico muito alto, onde estima-se que o gasto global com medidas para minimizar os impactos desse inseto é da ordem de 57,3 bilhões de dólares (THOMPSON; MARTIN DEL CAMPO; CONSTENLA, 2020), porém essas estimativas nem sempre traduzem os reais impactos econômicos na saúde pública em função das infecções transmitidas pelos mosquitos (BONDS; COLLINS; GOUAGNA, 2022).

Por outro lado, o uso de compostos à base de plantas tem se destacado no controle desse inseto, visto que atuam em diferentes receptores do sistema nervoso, o que dificulta a seleção de populações resistentes, além de serem ecologicamente corretos, pois não bioacumulam no ambiente. Além disso, os compostos podem ser obtidos de subprodutos

vegetais, evitando que sejam descartados pela indústria no ambiente, como é o caso do café (DOS SANTOS et al., 2021).

A fim de reduzir o crescimento de populações resistentes, pesquisadores têm testado compostos à base de plantas e com isto pode-se evitar contaminação ambiental por inseticidas químicos sintéticos e descobrir alternativas mais econômicas no desenvolvimento de novos inseticidas. Por isso faz-se necessário a testagem em laboratório de novos produtos que se encaixam na proteção de humanos, animais e do ambiente. Os extratos de café de qualidade inferior podem ser usados para isto e desta forma testes são extremamente necessários. Também se torna fundamental desenvolver e padronizar metodologia com esses extratos que seja funcional, econômica e que acima de tudo não agrida o ambiente. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo de avaliar a toxicidade de extratos de café verde e torrado de qualidade inferior para larvas de *A. aegypti*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DE *A. aegypti*

Os insetos são animais pertencentes a uma extensa e dominante filo de artrópodes e que geralmente estão associados à presença de um exoesqueleto (STORK, 2018). A ordem Diptera consiste em insetos que possuem apenas dois pares de asas, sendo que essa característica deu origem ao nome da ordem, onde 'di' significa dois e 'ptera' refere-se a asas em grego (SARWAR, 2020).

Dentro da Ordem Diptera, a família Culicidae é encontrada em regiões temperadas e tropicais de todo o mundo, incluindo 3.614 espécies existentes e classificadas em duas subfamílias (Anophelinae e Culicinae) e 113 gêneros (HARBACH, 2023). A maior tribo da subfamília Culicinae é chamada de Aedini e contém cerca de 1.261 espécies, e é um grupo fenotipicamente diverso, sendo que um dos gêneros mais conhecidos é *Aedes* devido à sua importância médico-veterinária (WILKERSON et al., 2015; SOGHIGIAN; ANDREADIS; LIVDAHL, 2017).

O gênero *Aedes* foi descrito em 1818 por Meigen e atualmente possui cerca de 932 espécies, divididas em 79 subgêneros (SOARES et al., 2022). A espécie *A. aegypti* teve sua origem há cerca de 172 milhões de anos no continente Africano e o contato com o ser humano foi observado há cerca de 4 mil anos, tornando-se um vetor de patógenos de grande importância para a saúde pública (TABACHNICK, 1991; DICKSON et al., 2016).

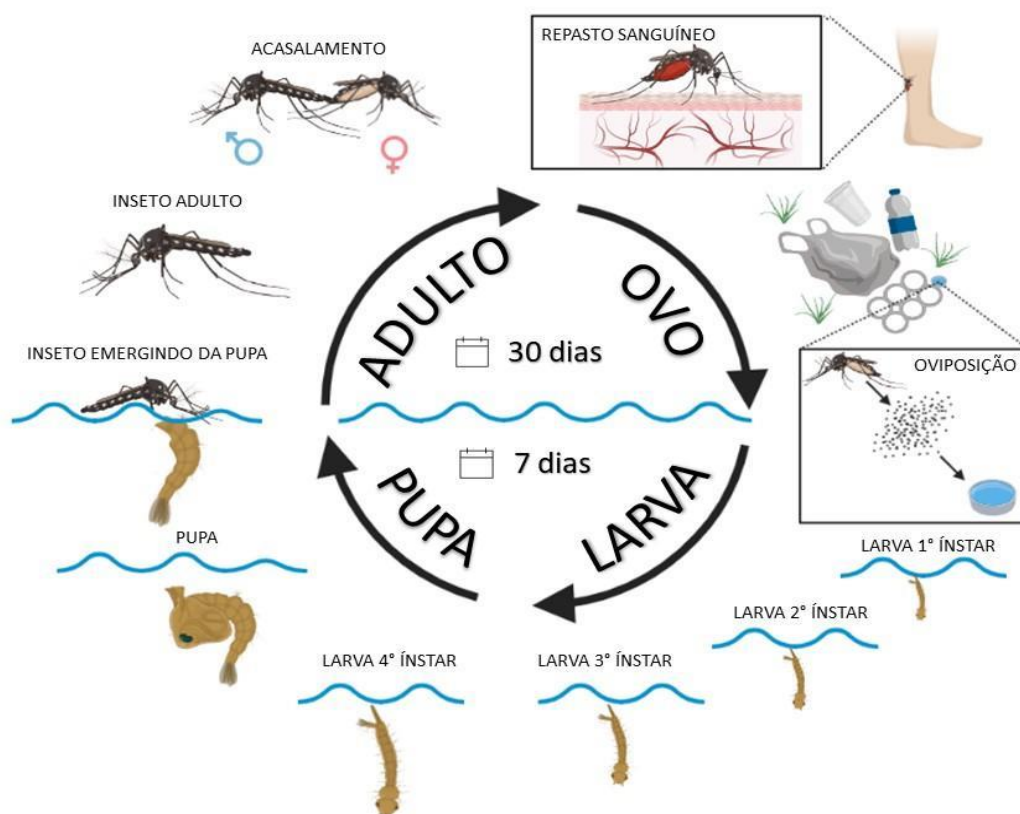
2.2. Aspectos bioecológicos de *A. aegypti*

O inseto *Aedes aegypti* é holometábolo, ou seja, possui metamorfose completa, sendo também uma espécie tropical invasora em todo o mundo e apresenta distribuição cosmopolita (GORDH; HEADRICK, 2001; OECD, 2018). O ciclo de vida do *A. aegypti* se inicia quando a fêmea do mosquito, após a cópula, faz o repasto sanguíneo dando início a uma série de processos metabólicos para a produção de ovos (ALLMAN et al., 2020).

Posteriormente, esses ovos são depositados em superfícies naturais como troncos de árvore, ocos e bromélias e superfícies artificiais criadas pelo homem, como canais de irrigação, copos e garrafas de plástico, lonas e pneus contendo, geralmente, água parada ou águas salobras (BARRERA et al., 2008; RAMASAMY et al., 2011; NASIR et al.,

2017). As larvas eclodem e vão passar por quatro ínstares. Na quarta ecdise, as larvas de 4º ínstar se diferenciam em pupa, sofrendo a metamorfose com a emergência do inseto adulto (Figura 1) (CHRISTOPHERS, 1960; JULIANO; LOUNIBOS, 2016; OECD, 2018).

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo de desenvolvimento de *Aedes aegypti* em condições ambientais favoráveis



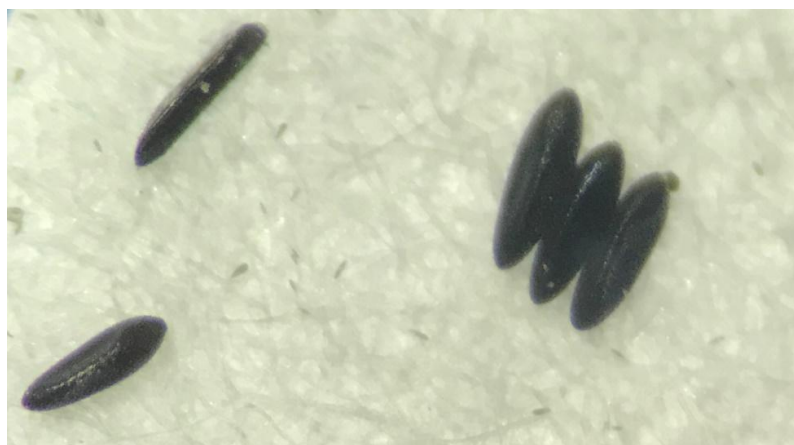
Descrição: O ciclo do inseto *A. aegypti* se inicia com o **acasalamento** entre macho e fêmea, logo após isso as fêmeas buscam um hospedeiro onde realizam o **repasto sanguíneo**, o sangue é usado para nutrir os ovos do inseto, depois do processo de hematofagia as fêmeas buscam locais sombreados e com acúmulo de água parada representados na figura com a imagem de um quintal com presença de lixo, após encontrar um local a fêmea realiza a **oviposição** na superfície do recipiente. Após alguns dias é possível observar as **larvas 1º ínstar** que passam por sucessivas mudas até atingirem o estágio de **4º ínstar** onde se transformam em **pupa**; a partir desse ponto as pupas não se alimentam mais e após 1 a 2 dias o inseto **adulto emerge da pupa** e permanece no espelho d'água até ocorrer a esclerotização da cutícula e secagem da asa e, após isso, o **inseto adulto** alça voo dando continuidade ao ciclo.

Fonte: Criado por Damasceno & Castro em <https://app.biorender.com/>.

2.2.1 Ovo

Os ovos de *A. aegypti* possuem coloração esbranquiçada no momento da oviposição e rapidamente assumem uma coloração preta em contato com o ambiente externo; as dimensões dos ovos são de aproximadamente 0,58 mm de comprimento e 0,17 mm de largura (Figura 2) (MUNDIM-POMBO et al., 2021). o ciclo gonotrófico (período compreendido entre o repasto sanguíneo e a oviposição) envolve uma série de processos, iniciando quando as fêmeas ingerem uma refeição de sangue de hospedeiros vertebrados, que por sua vez ativa várias vias que vão catabolizar e fornecer nutrientes ao cérebro e aos órgãos reprodutivos (HANSEN et al., 2014; GONZALES; HANSEN, 2016; ALLMAN et al., 2020). Uma fêmea após o repasto sanguíneo (3 dias) é capaz de colocar cerca de 120 a 150 ovos em posturas parceladas (VOGEL; BROWN; STRAND, 2015).

Figura 2 – Ovos de *Aedes aegypti* com coloração escurecida



Fonte: Do Autor, 2023

Os processos envolvidos na produção de ovos são a oogênese (produção de ovócitos ainda nas fases aquáticas dentro do ovário), vitelogênese, ovulação, fertilização, oviposição, embriogênese e quitinização do córion (ALLMAN et al., 2020). Alguns nutrientes como aminoácidos, lipídeos e carboidratos são essenciais para a ativação desses processos e produção de ovos (MIRTH; ALVES; PIPER, 2019).

Os aminoácidos ativam vias importantes no processo de produção de ovos como a oogênese e vitelogênese, sendo necessários 17 aminoácidos essenciais. A falta de 1 desses aminoácidos resulta na redução da expressão de vitelogenina em cerca de 90% na produção de ovos (ATTARDO et al., 2006). Os lipídeos são outros nutrientes essenciais para o desenvolvimento de ovos, pois servem como estabilizadores da membrana, sendo precursores de hormônios como o ecdisteróide e atuam como reserva de energia para os

insetos (CANAVOSO et al., 2001; TENNESSEN et al., 2014; RIVERA-PÉREZ; CLIFTON; NORIEGA, 2017). Outros nutrientes como ferro e carboidratos podem estar associados a uma maior oviposição e fecundidade de *A. aegypti* (FOSTER, 1995; ALLMAN et al., 2020).

2.2.2 Larva

Após a eclosão, o tempo de desenvolvimento das larvas é diretamente afetado quando há diminuição da fase clara e, em temperaturas mais baixas também se observa aumento do tempo de desenvolvimento desses organismos (GARZÓN et al., 2021).

A larva de *A. aegypti* apresenta forma bastante cilíndrica e alongada, sua coloração é esbranquiçada por conta da falta de partes esclerotizadas. A cabeça do inseto na fase larval é globular e menor em relação ao restante do corpo do inseto, possui, ainda na cabeça, antenas pequenas e lisas, os olhos compostos em desenvolvimento e os ocelos larvais. a cutícula corporal das larvas apresenta endocutícula com discretas fibrilas de quitina orientadas de forma escalonada, no tórax é fundido nos 3 segmentos, apresentando cerdas que dão movimento, proteção e atuam também como sensores. O abdome possui oito segmentos, apresentando tamanho médio que aumenta até o 3º segmento e diminui até o 8º. Ainda no abdome é possível observar o sifão respiratório utilizado para diferenciar as espécies do gênero *Aedes* (Figura 3). As larvas de *A. aegypti* possuem 4 estádios larvais onde ao final de cada um ocorre troca do exoesqueleto e, de modo geral, em estádios de crescimentos posteriores apresentam cabeça grande e sifão respiratório pequeno, sendo que à medida que as partes moles crescem é possível observar nos estádios posteriores o aumento do sifão respiratório e a diminuição da cabeça (Figura 2). A identificação do 1º instar é feita pela presença de uma estrutura chamada ‘*egg-breaker*’ encontrada na cabeça das larvas, enquanto as larvas de 2º e 3º ínstaes podem ser identificadas de acordo com o tamanho do diâmetro transversal da cabeça, onde em média, as medidas devem se assemelhar a 0,45 e 0,65 mm (MACFIE, 1917; CHRISTOPHERS, 1960; FIAZ et al., 2021).

Figura 3 - Larvas de *Aedes aegypti* em diferentes ínstares de desenvolvimento



Legenda: 1- Larva de *Aedes aegypti* no 1º ínstar; 2- Larva de *A. aegypti* no 2º ínstar; 3- Larva de *A. aegypti* no 3º ínstar e 4- Larva de *A. aegypti* no 4º ínstar. Fonte: Alvarenga (2022).

Segundo Lutz et al. (2019) as larvas de 4º ínstar de *A. aegypti* possuem diferenças significativas no que diz respeito ao tamanho, sendo que fêmeas geralmente apresentam tamanho médio de 0,53 mm. Em contraste os machos apresentam tamanho médio de 0,26 mm (MACFIE, 1917; CHRISTOPHERS, 1960; MONTAÑO-REYES et al., 2019).

As larvas de *A. aegypti* apresentam pouca variação comportamental durante o seu ciclo circadiano (CLOPTON, 1979; LUTZ; HA; RIFFELL, 2020). Em relação a estímulos químicos, as larvas do vetor, quando famintas mudam seu comportamento utilizando-se de quimiocinese para se locomover para locais onde existe maior concentração de material genético microbiano (LUTZ; GREWAL; RIFFELL, 2019; LUTZ; HA; RIFFELL, 2020).

2.2.3 Pupa

As pupas do mosquito da dengue são bastante ativas, apresentando uma porção anterior arredondada, o cefalotórax e o abdome que se encontra flexionado sob o cefalotórax e é utilizado para a locomoção das pupas na água (Figura 4). As fêmeas são maiores em relação aos machos, sendo esse, o critério para distinguir os sexos. O tamanho

do cefalotórax das fêmeas em média é de 2,55 mm e do macho é de 2,10 mm (CHRISTOPHERS, 1960; SANTOS et. al., 2021).

Figura 4 - Pupa do inseto *Aedes aegypti*



Fonte: Universidade da Flórida (C.M. Zettel, 2022)

2.2.4 Adulto

Após a fase de pupa, os adultos emergem pelo cefalotórax por uma fenda em formato de “T”, permanecendo em repouso sob a exúvia para que ocorra o endurecimento da cutícula, asas e músculos; após esse processo voam para abrigos seguros (Figura 5). Os machos tendem a emergir 24 h antes das fêmeas para que ocorra a sua maturação sexual (CHRISTOPHERS, 1960).

Figura 5 - Adulto da espécie *Aedes aegypti* emergindo de uma pupa, sendo possível observar a exúvia e o adulto em repouso sobre o espelho d'água



Fonte: FIOCRUZ (Raquel Portugal e Rodrigo Méxas, 2016)

Os adultos do mosquito *A. aegypti* possuem coloração marrom-escuro ou preto, com escamas na coloração branca. Os mosquitos dessa espécie possuem em seu tórax faixa de escamas brancas que se assemelham a uma “lira”, sendo esse, um dos critérios utilizados para a classificação da espécie (Figuras 6a e 6b) (CHRISTOPHERS, 1960; KUMAR et al., 2022). Fêmeas de *A. aegypti* possuem tamanho e peso duas vezes maior que os machos; apresentam antenas com quantidade de sensilos menores que a do macho e palpos 25% menores (Figura 6c). Os machos são menores, suas antenas são do tipo plumosa e seus palpos são do tamanho da probóscide (Figura 6d). Quanto à fisiologia, fêmeas são hematófagas e voam, enquanto os machos se alimentam exclusivamente de soluções açucaradas como o néctar de flores. Existem diferenças quanto ao som produzido por ambos os sexos (CHRISTOPHERS et al., 1960; DORZABAN et al., 2022.)

Figura 6 - Adulto de *Aedes aegypti*



Fonte: FIOCRUZ (Adaptado de Raquel Portugal e Rodrigo Méxas, 2016)

Legenda: **a** =Fêmea de *Aedes aegypti*; **b** = Macho de *A. aegypti*; **c** = Antena peluda (**ATf**) e os palpos reduzidos (**PAf**); **d** = antena plumada (**ATm**) e palpos do tamanho da probóscide (**PAm**); As setas em **a** e **b** mostram a faixa de escamas brancas no tórax que se assemelha a uma “lira”.

2.3 Importância médica e veterinária de *A. aegypti*

As principais arboviroses urbanas no Brasil são Dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela; essas infecções têm em comum o *A. aegypti* como o principal vetor dos patógenos causadores dessas infecções. Essas infecções causam alto impacto no sistema único de saúde (SUS) podendo, em alguns casos, levar à morte do paciente (SONG et al., 2017; KAKOOZA-MWESIGE et al., 2019; VAIRO et al., 2019).

Dengue é causada pelo vírus DENV e transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* em todo o mundo; no Brasil, é amplamente relacionada ao inseto vetor *A. aegypti* (PROMMOOL et al., 2021; REGILME et al., 2021). O vírus possui quatro sorotipos amplamente difundidos, sendo DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (PROMMOOL et al., 2021) e um quinto sorotipo descoberto em 2013 chamado de DENV-5 (NORMILE, 2013). Esses sorotipos são 65% semelhantes e cada um gera um tipo de resposta imune (MUSTAFA et al., 2015).

A prevalência da dengue é estimada em 3,9 bilhões de pessoas em 128 países que estão em risco de infecção pelo vírus. O número de casos notificados nas Américas entre a semana epidemiológica (SE) 1 e a SE 28 de 2023, foi de 3.034.889 (OPAS, 2023). No Brasil, a incidência de casos/100 mil habitantes foi de 647 e teve um aumento de 22% com relação ao ano de 2022; os números de casos prováveis registrados até a 22ª semana epidemiológica (SE22) foi de 1.379.983, sendo 15.519 casos graves de dengue. Com relação ao número de óbitos, até a SE22 foram registrados 635 óbitos e 420 seguem em investigação, sendo que a letalidade da doença é calculada em 4,1% (BRASIL, 2023).

Vários autores vêm relatando a coinfeção causada pela transmissão simultânea de Dengue, Zika e Chikungunya através da picada do mosquito infectado levando, em alguns casos, à morte (VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2016; SUWANMANEE et al., 2018; MERCADO-REYS et al., 2019).

Outros patógenos podem ser transmitidos pelo inseto, como o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (ORTIZ et al., 2008). O Mayaro vírus, uma doença emergente, onde estudos têm demonstrado que *A. aegypti* possui capacidade vetorial para a transmissão da infecção (CASALS; WHITMAN, 1957; LONG et al., 2011; MOURÃO et al., 2012; WIGGINS; EASTMOND; ALTO, 2018; PEREIRA et al., 2020; CURCIO et al., 2022). O estudo de YURAYART et al. (2017) demonstrou que *A. aegypti* apresenta alta competência vetorial para infecções decorrentes do *Plasmodium gallinaceum* em galinhas o que pode causar a malária aviária.

2.4 Controle de *A. aegypti*

As medidas de controle das doenças citadas acima (subitem 2.3) se baseiam principalmente em ações contra o vetor *A. aegypti*, sendo divididas, de forma ampla, de acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPAS, 2023b), em controle dos vários estágios de desenvolvimento do inseto vetor, visando reduzir sua abundância populacional, longevidade e redução do contato do mosquito adulto com os seres humanos.

O controle de *A. aegypti* também pode ser dividido em mecânico capaz de diminuir o número de criadouros e do vetor e, com isso, reduzir o contato dos humanos com o mosquito. Esse tipo de controle atua protegendo locais com potencial para se tornarem criadouros; exemplo dessa medida é a adição de areia em pratos de vasos de plantas e tampar caixas de água, ou remoção e/ou destruição adequada desses criadouros. Drenagem, limpeza e instalação de proteção nos reservatórios de água e por fim instalação de telas em portas e janelas, e cortinas nos dormitórios são importantes para prevenção do mosquito. Outra forma de controle é o biológico que se baseia no uso de predadores naturais, como por exemplo a criação de peixes em reservatórios de água, e o uso de patógenos, o que reduz a população vetorial (BRASIL, 2009; ZARA et al., 2016; OPAS, 2023b).

Segundo BRASIL (2009) o controle químico consiste no uso de substâncias químicas (inseticidas) para o controle do vetor nas fases larvária e adulta. Pode ser feito tratamento focal, perifocal e da aspersão aeroespacial de inseticidas em ultrabaixo volume (UBV). O tratamento focal é feito nas fases imaturas e em criadores que não podem ser eliminados de forma mecânica, sendo adicionadas substâncias químicas. O tratamento

perifocal utiliza-se da impregnação de uma substância química residual em locais próximos aos criadores que tenha efeito adúlticida. E por fim, o tratamento de aspersão aeroespacial de inseticidas em UBV é feito com a finalidade de eliminar as formas adultas, sendo utilizado somente em surtos ou epidemias, visto que pode eliminar qualquer outro artrópode causando impacto ecológico (BRASIL, 2009; BRASIL, 2019).

A primeira vez em que uma substância química foi recomendada e utilizada para o controle de *A. aegypti* foi em 1923, pela Fundação Rockefeller, onde utilizaram o componente químico Verde de Paris ($Cu(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3Cu(AsO_2)_2$) (SOPER, 1965). Desde então muitas substâncias químicas já foram utilizadas para o controle do vetor, sendo elas, diclorodifeniltricloroetano (DDT), inseticidas organofosforados, inseticida piretróide e reguladores de crescimento (diflubenzuron e novaluron) (CAMARGO, 1967; FRANCO, 1976; MACORIS et al., 1999; BRASIL, 2014).

Segundo o Boletim Epidemiológico de 2023 (BRASIL, 2023) foram utilizadas pastilhas larvicidas e *Bt* para o tratamento focal; clotianidina (50%) + deltametrina (6,5%), Flupiradifurona + Transflutrina e imidacloprido + pralettrina para o tratamento perifocal e tratamento de aspersão aeroespacial de inseticidas em UBV.

Por fim, nas Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue, ações de educação em saúde, tem um destaque maior que o controle químico e deve ser compreendida como um suporte para as ações de gestão. As ações devem ser realizadas em Postos de Saúde, nas escolas e campanhas locais visando a mudança de hábitos com o objetivo de aumentar a prevenção e controle da dengue (BRASIL, 2009). Em uma pesquisa feita por Dalto et al. (2021) foi demonstrado que após ações de educação em saúde, os agentes de combate às endemias relataram melhorias na limpeza dos quintais e aumentou a preocupação da população com a interrupção do ciclo dos mosquitos do gênero *Aedes*.

2.4.1 Resistência de *A. aegypti* a inseticidas sintéticos e métodos alternativos de controle

Resistência a inseticida é quando se observa uma diminuição da mortalidade em populações que estão sob pressão constante de inseticidas (ROUSH e TABASHNIK,

1990). O primeiro caso de resistência a inseticida observado em populações de *A. aegypti* foi relatado em 1956 em Trindade no Caribe, onde a população selvagem apresentou menor mortalidade do que insetos de outras regiões (GILKES et al., 1956). A partir daí o número de populações resistentes aumentou, sendo mais comum encontrar populações resistentes em países do sudeste Asiático e da América Latina (MOYES et al., 2017).

No Brasil, populações de *A. aegypti* têm sido submetidas a pressões de seleção genética por meio do uso indiscriminado de inseticidas desde 1967 (VALLE et al., 2019). A resistência metabólica ocorre por meio de enzimas já presentes no inseto, com o objetivo de desintoxicar substâncias naturais ou estranhas, a ocorrência da resistência metabólica ocorre por meio da duplicação de genes, aumento da expressão gênica e mutações em genes que decodificam enzimas com capacidade de metabolizar esses compostos (KADJO et al., 2023). A resistência do tipo sítio alvo é quando resíduos de aminoácidos interferem ou impedem que compostos químicos dos inseticidas se liguem no seu sítio alvo, fenótipos de resistência estão associados a alterações bioquímicas nos sítios alvos V410L, G923V, I1011M, V1016I e F1534C, sendo esse tipo de resistência mais comum (BRENGUES et al., 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007; MARTINS et al., 2009; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2014; COLLET et al., 2016; VIANA-MEDEIROS et al., 2017 ; GARCIA et al., 2018; VALLE et al., 2019; MELO COSTA et al., 2020).

A resistência a inseticidas causa alteração no fitness do mosquito sendo benéficas somente em populações expostas a inseticidas, isso porque essas alterações interferem no tempo de desenvolvimento larval, redução de sobrevivência de adultos e alterações nos hábitos alimentares (UEMURA et al., 2023; SILVA et al., 2023)

Com o propósito de controlar a população de vetores da dengue, insetos machos foram tratados por meio de radiação, tornando-os inférteis e, conseqüentemente, não são capazes de gerar ovos viáveis; entretanto, essa técnica não é autossustentável, precisando de uma liberação constante de insetos inférteis (ALPHEY et al., 2010; ZHENG et al., 2019). Outra alternativa foi a utilização de *A. aegypti* geneticamente modificados ou insetos transgênicos, que possuem um gene letal para a prole; esse tipo de prática ainda precisa de estudos e o aceite da população sobre tal técnica ainda não atingiu alta taxa de aprovação (CAPURRO et al., 2016; DA SILVA et al., 2022).

Insetos podem ser infectados com a bactéria intracelular do gênero *Wolbachia*. Foi observado que *A. aegypti* infectados com essa bactéria apresentaram drástica redução na multiplicação de alguns vírus, como o vírus da dengue, e conseqüentemente menor transmissão pelo vetor. Ainda foi descoberto que machos infectados com bacterias do gênero *Wolbachia* ao cruzar com fêmeas não infectadas obtinham ovos inférteis devido à incompatibilidade citoplasmática (ROCHA et al., 2019; CRAWFORD et al., 2020).

Apesar disso, para o uso da *Wolbachia* spp. devem ser com cautela uma vez que, a dirofilariose canina é uma doença respiratória de transmissão vetorial por artrópodes, que tem como principal agente etiológico o nematóide *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) (que abriga a bactéria simbiote obrigatória *Wolbachia* spp. (SPENCE BEAULIEU; REISKIND, 2020). Estudos têm demonstrado que ao tratar nematóides com antibióticos eles têm sua taxa de sobrevivência drasticamente reduzida, o que evidencia a necessidade dessa relação ecológica (BANDI et al., 2010; SLATKO et al., 2010; MCHAFFIE, 2012).

Mccrea et al. (2021) foram capazes de infectar *A. aegypti* em laboratório com microfilárias da espécie *D. immitis* que se desenvolveram até o estágio L3 e que foi capaz de emergir do inseto quando estimulada. Adegoke et al. (2020) também em condições de laboratório, foram capazes de infectar 87% dos mosquitos com esse nematelminto. Em uma investigação foi observada a presença de DNA de *D. immitis* em insetos selvagens da espécie *A. aegypti*, capturados próximo a residências e contendo alta prevalência de dirofilariose em cães (SCAVO et al., 2022). Diante disso, o uso da bactéria para controle de *A. aegypti* pode, no futuro, contribuir a transmissão de *D. immitis*.

2.4.2 Uso de produtos botânicos no controle de *A. aegypti*

As plantas produzem uma diversidade de compostos classificados como primários e secundários, os quais foram importantes para a evolução desse grupo e sua interação com o ambiente (BORGES e AMORIM, 2020). Os compostos primários são necessários para o seu crescimento e nutrição, sendo encontrados em abundância em todo o reino das plantas, sendo que alguns são sintetizados, como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos e nucleotídeos (GARCÍA e CARRIL, 2009).

Os compostos secundários são aqueles não-essenciais para as plantas e que são sintetizados quando há maior quantidade de nutrientes disponíveis a partir da síntese de glicose. São específicos de cada espécie e são utilizados pelas plantas para proteção contra herbívoros, atrair polinizadores, enviar sinais para outras plantas, entre outras funções. Em geral, são terpenóides, compostos fenólicos e nitrogenados, os quais são explorados pelas indústrias farmacêuticas devido às suas propriedades terapêuticas e pela indústria alimentícia (RASKIN et al., 2002).

Os produtos botânicos (óleos essenciais e extratos) possuem vantagens no controle de espécies pragas e vetores de doenças, pois ao contrário dos inseticidas, contêm uma mistura de compostos que atuam sinergicamente em diversos sítios de ligação evitando a resistência já encontrada, como por exemplo, para inseticidas do grupo químico dos organofosforados, além de serem ecologicamente corretos por não se bioacumularem no ambiente (ISMAN, 2015; PAVELA, 2016).

Estrategicamente vem aumentando o uso de produtos botânicos no controle de *A. aegypti* com óleos essenciais e extratos vegetais (PILAQUINGA et al., 2019; PEREIRA FILHO et al., 2021; MELO et al., 2021; MACHADO et al., 2023; VIANA et al., 2023). Com isto, tem-se a redução de populações resistentes e diminuição do impacto ambiental que os inseticidas sintéticos causam, uma vez que esses os produtos botânicos são biodegradáveis no ambiente (SILVÉRIO et al., 2020).

A família Rubiaceae possui uma diversidade de espécies que inclui aproximadamente 637 gêneros e 13.000 espécies (PEREIRA e MEIRELES, 2010). As principais substâncias químicas encontradas nessa família são iridóides, alcaloides indólicos, antraquinonas, terpenóides (diterpenos e triterpenos), flavonóides e outros derivados fenólicos (FARIAS, 2006; MARTINS e NUNEZ, 2015).

A espécie *Coffea arabica*, conhecida popularmente como café, é uma planta dicotiledônea, lenhosa, perene, de clima tropical e de tamanho médio. Suas folhas são ovaladas e na coloração verde-escuro, os frutos são ovais e amadurecem entre 7 a 9 meses após a fecundação (CLIFFORD, 2012; DJERRAB et al., 2021). Essa espécie faz parte da família Rubiaceae e do gênero *Coffea* com mais de 100 espécies identificadas (DAVIS et al., 2011). O *C. arabica* é uma planta tetraploide em decorrência de uma hibridização espontânea entre as espécies *Coffea canephora* e *Coffea eugenioides* (WINTGENS, 2004). Na indústria encontram-se duas espécies, a *Coffea arabica* L. e a

Coffea canephora P. (café robusta) que são responsáveis por 60% da produção mundial (TRAN et al., 2017; ICO, 2023). A exportação mundial de grãos verdes em dezembro de 2022 totalizou 9,81 milhões de sacas, sendo o Brasil responsável por exportar 3,24 milhões de sacas de café (IOC, 2023). De acordo com a EMBRAPA-CAFÉ (2023) a safra para o ano de 2023 deverá ser de 55 milhões de sacas de 60 kg.

A qualidade do café é avaliada segundo alguns critérios morfológicos do grão tais como comprimento, largura, espessura, peso, forma e a cor dos grãos de café (LEROY et al., 2006). No cafeeiro os compostos secundários contribuem para a qualidade do grão sendo responsáveis pelas características organolépticas, como o sabor e a fragrância do café (LEROY et al., 2006; PATAY et al., 2016).

O processo de obtenção do café torrado se inicia com a remoção da polpa e da casca; posteriormente, o grão é torrado, sendo que a torrefação contribui para a qualidade do produto final e está diretamente relacionada com a temperatura e o tempo de exposição. A torrefação é responsável por degradar a trigonelina em outros compostos, além de degradar também os ácidos clorogênicos em catecóis e fenóis e posteriormente em melanoidinas, que por sua vez exercem ação direta nos parâmetros de aroma e do sabor da bebida (PANDEY et al., 2000; MONTEIRO e FARAH, 2012; DA SILVA et al., 2021; MUNYENDO et al., 2021).

A torra pode ser classificada em clara, média ou escura em decorrência da cor do grão. Na torra clara é obtido um produto de aroma e acidez acentuado e sabor suave, e preserva os óleos aromáticos do grão; a torração média produz um café com aroma, acidez e amargor em equilíbrio, e a torração escura produz um produto de baixa acidez, menos encorpado e com maior amargor (RAO, 2014; SARINO et al., 2019; FEBRIANTO et al., 2023). Os subprodutos provenientes da transformação industrial de culturas agrícolas, como a torração do café, têm despertado interesse econômico devido ao fato de serem fáceis de reciclar (SISTI et al., 2022).

A borra do café, casca e águas residuárias do café são apontadas como problemas ambientais; porém já se tem pesquisas que utilizam esses subprodutos para a produção de biocombustíveis, fibras dietéticas e adubos orgânicos a fim de diminuir o impacto ambiental e gerar lucros (JANISSEN; HUYNH, 2018; BALZANO et al., 2020; HEJNA, 2021). Os grãos do café de qualidade inferior são aqueles que possuem menor qualidade sensorial devido a condições geradas pelo processamento ou modificações genéticas e

fisiológicas (FEBRIANTO et al., 2023). Também são bons candidatos para a extração de outros compostos, sendo uma alternativa inovadora, barata e ecologicamente correta (SILVIA et al., 2022).

Os principais compostos encontrados no grão de café são ácidos clorogênico, 7 conjugados de cinamoil-aminoácido, cafeína, teobromina, teofilina, ácido nicotínico e ácido cafeico (RODRIGUES e BRAGAGNOLO, 2013). Num estudo feito por Satho et al. (2015) observou-se que grande parte das fêmeas de *A. aegypti* retiveram seus ovos ao se depararem com recipientes de oviposição contendo borra de café. Miranda et al. (2021) constataram que a borra de café causou mortalidade nas larvas desse mosquito e afetou a estrutura dos tecidos presente em seu intestino médio.

3 OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade de extratos de café de qualidade inferior para larvas de *A. aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito larvicida do extrato de café verde sobre larvas de *A. aegypti* com uso de diferentes solventes;
- Avaliar o efeito larvicida do extrato de café torrado sobre larvas de *A. aegypti* com uso de diferentes solventes;
- Avaliar se há diferença quanto à utilização de DMSO e Tween 80 como solventes dos extratos.
- Calcular a dose letal necessária para matar 50%, 90% e 99% da população de larvas de *A. aegypti* para cada um dos extratos utilizados.
- Avaliar a toxicidade do composto majoritário para larvas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras, sob o protocolo de número 026/21.

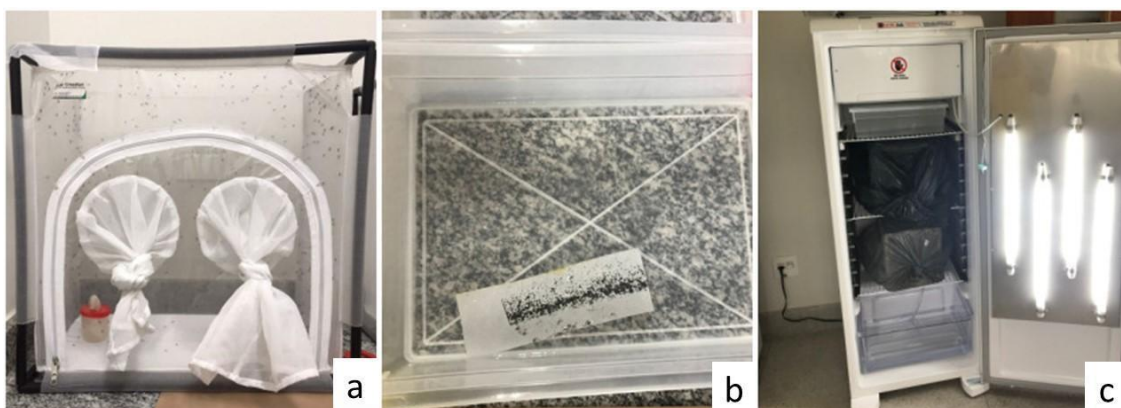
4.1. Cepas de *A. aegypti*

Para avaliação da toxicidade de extratos de café de qualidade inferior no desenvolvimento de mosquitos foi utilizada a cepa Rockefeller de *A. aegypti* do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos da Universidade Federal de Minas Gerais.

Pedaços de papel-filtro contendo ovos de *A. aegypti* foram encaminhados para o Laboratório de Biologia Parasitária II (BIOPAR II), do Departamento de Medicina, da Universidade Federal de Lavras. Para realização da série de experimentos, foi utilizado o insetário mantido à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $57 \pm 4,5\%$ e fotoperíodo de 12C:12E h.

Para eclosão, os ovos foram colocados em recipientes plásticos ($38 \times 28 \times 12$ cm) contendo água da torneira decolorada (Figura 7b) e mantidos em câmara climática (Figura 7c) sob temperatura média de $27,3 \pm 1,9^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $59 \pm 13\%$ por 6 dias.

Figura 7 - Colônia de *Aedes aegypti* da Universidade Federal de Lavras

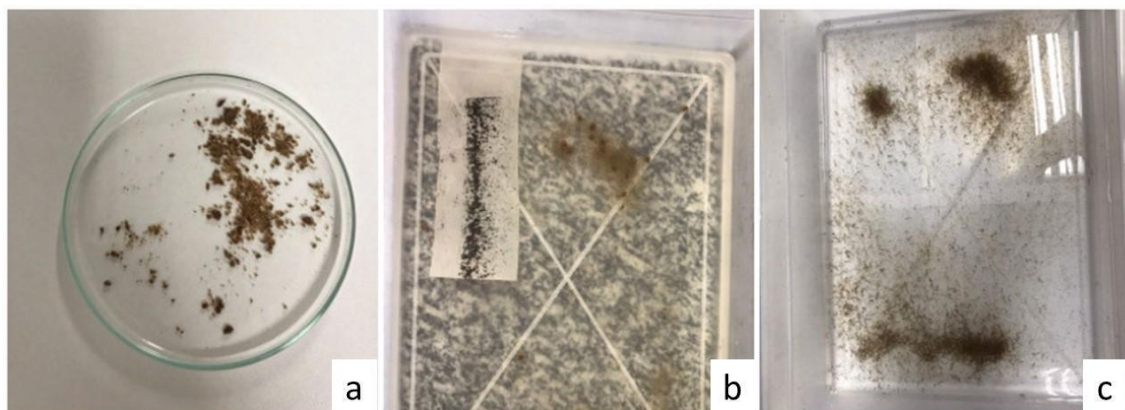


Legenda: Gaiola com adultos de *Aedes aegypti* com solução açucarada a 30% (a). Bacia de água decolorada contendo uma fita de ovos desidratados (b). Câmara climática na fase clara com a bacia de água com os ovos de *A. aegypti* (c). Fonte: Do autor, 2023.

As larvas de 1º ínstar foram alimentadas com ração de peixe (Alcon®) macerada e autoclavada (Figura 8a). A partir do segundo estágio de desenvolvimento (L2), as larvas

foram alimentadas com ração de peixe (Alcon®) inteira e a troca de água foi realizada em intervalos de dois dias (Figuras 8b e 8c).

Figura 8 - Placa contendo ração macerada fornecida para larvas L1 de *Aedes aegypti* e cuba com a água suja e após a troca por uma nova água declorada

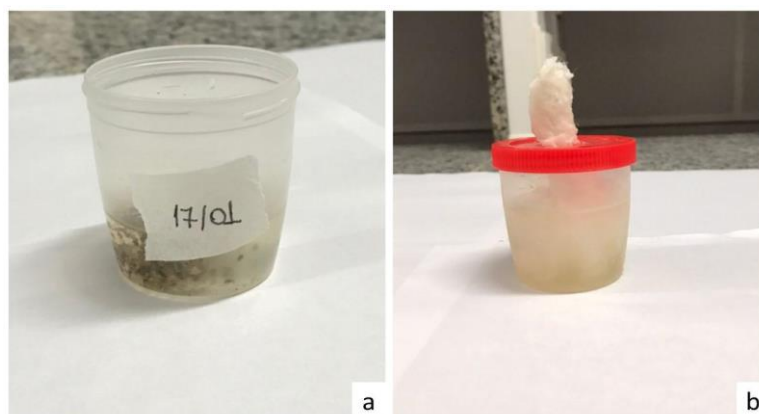


Legenda: a. ração de peixe macerada; b. Cuba com água declorada e suja com fita de ovos de *Aedes aegypti* e larvas; c. Cuba com água limpa recém trocada e presença de larvas. Fonte: Do autor, 2023

Após 7 dias do surgimento das primeiras larvas foi possível observar as primeiras pupas, que foram coletadas com uma pipeta Pasteur descartável e transferidas para frascos de coletor universal estéril 80 mL, previamente identificados com a data correspondente ao dia da coleta (Figura 9a).

Para emergência dos adultos, as pupas em média 50 em cada frasco coletor foram colocadas em gaiolas próprias (50 × 50 × 30 cm) para insetos (LabCreation®) (Figura 7a). Os recipientes com as pupas foram mantidos por aproximadamente 3 dias dentro da gaiola para que todos os adultos pudessem emergir.

Figura 9- Recipientes utilizados para separar as pupas das larvas e para alimentação dos adultos na colônia de *Aedes aegypti*



Os adultos emergidos foram alimentados *ad libitum* com solução açucarada a 30% (Figuras 7a e 9b). Para a obtenção de ovos, fêmeas foram alimentadas (repasto sanguíneo) com sangue de Hamster Golden (*Mesocricetus auratus*). O procedimento de alimentação em hamster consistia primeiramente na sedação do animal e esse processo se iniciava com a anestesia do hamster utilizando uma mistura de Ketamina (100-200 mg/kg animal) e Xilazina (10 mg/kg animal), totalizando 300 uL para um animal de 100-120 g. A anestesia foi aplicada a partir de injeção intraperitoneal, com agulha de 0,38 × 13 mm. Na ausência de reflexo, o animal foi colocado na gaiola com os mosquitos, onde permanecia por um período de aproximadamente 30 minutos.

Passados os 30 minutos o animal foi retirado e devolvido ao Biotério Experimental do Laboratório de Biologia Parasitária II onde ficava por no mínimo 15 dias até ser utilizado novamente para alimentação dos insetos. Em nossos estudos os hamsters foram utilizados por no máximo 3 três vezes e após esse período o animal passava por um programa de adoção de animais previamente aprovado pelo CEUA, onde o receptor assinava um termo de responsabilidade (Anexo II).

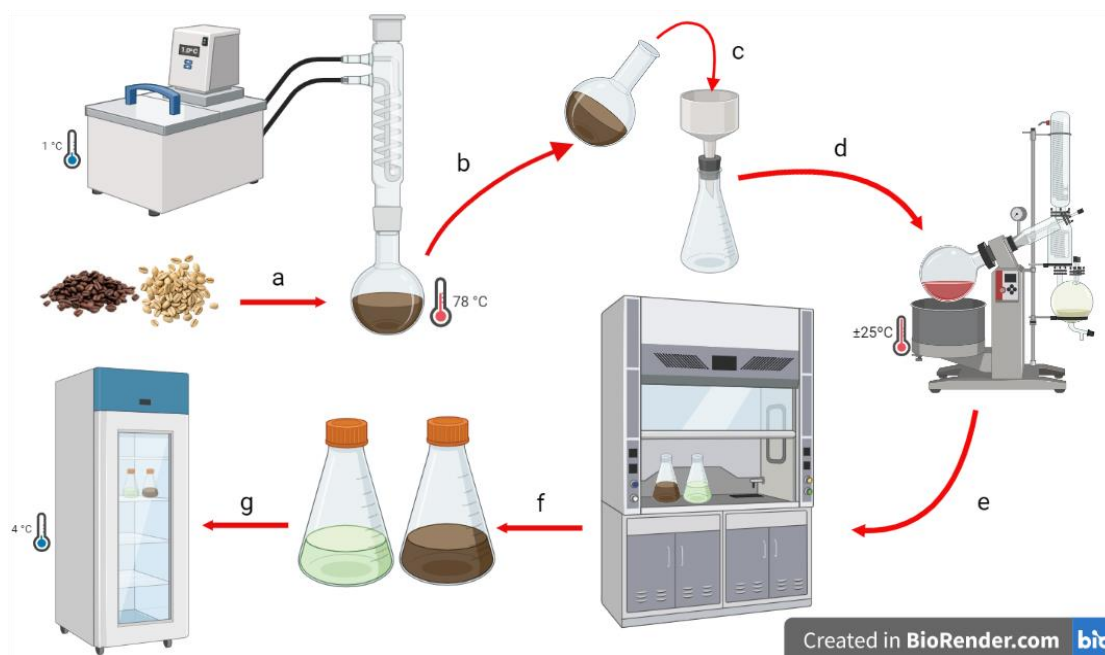
No terceiro dia subsequente à alimentação sanguínea, um frasco coletor universal estéril de 80 mL (modificado) de cor preta, contendo papel-filtro e 50% de sua capacidade contendo água de clorada (Figura 4h) foi colocado na gaiola para que as fêmeas pudessem realizar a oviposição. Após 3 dias da inserção do frasco coletor, o mesmo foi retirado e o papel-filtro contendo os ovos foi colocado em recipientes plásticos com papel toalha para serem desidratados e então armazenados por no máximo 90 dias, para utilização nos experimentos de toxicidade.

5.2 Amostragem e obtenção dos extratos de café

O processo de extração de extratos de café verde e torrado envolveu a utilização de grãos de café de qualidade inferior da safra 2019/2020 do sul de Minas Gerais. Os grãos verdes foram triturados em um liquidificador industrial, resultando em 1 kg de grão de café verde triturado, enquanto o restante foi torrado e posteriormente moído para obter café com torração média. Ambas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento da utilização.

A preparação dos extratos seguiu a técnica de refluxo simples sólido-líquido, com uso de metanol como solvente. O processo de extração ocorreu à 78°C, com um tempo de extração de 4 h e uma proporção de líquido-sólido de 5:1. Os grãos processados (Figura 10a) foram submetidos a um processo de extração, em que foram colocados em um balão volumétrico contendo etanol (Figura 10b). Esse sistema foi conectado a um condensador e a uma fonte de calor, fazendo com que a solução entrasse em ebulição, o vapor sendo condensado e o líquido precipitando novamente para o fundo do balão. Ao final de 4 h, o balão foi desconectado, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e, em seguida, filtrada para separar os componentes sólidos do líquido (Figura 10c). O extrato resultante, com alta concentração de metanol, foi submetido ao processo de remoção do excesso de metanol em um rotavapor (Rotavapor Buchi R-144) em banho maria (Figura 10d). Após essa etapa, o extrato foi colocado em uma capela para permitir que o restante do metanol evaporasse à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 horas (Figura 10e). Finalmente, os extratos de café verde e torrado ficaram prontos para uso e foram mantidos em geladeira a uma temperatura média de 4°C para sua conservação (Figura 10f-g).

Figura 10 - Esquema resumido da metodologia empregada para obtenção de extrato de café verde e torrado



Fonte: Do Autor, Criado no site <https://app.biorender.com/> em 2023

A caracterização química dos extratos de café e seus respectivos rendimentos foram realizados por Fernandes et al. (2022) no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. O rendimento dos extratos foi de $13,34 \pm 1,48\text{g}$ para o extrato de café torrado e $3,44 \pm 0,81\text{g}$ para o extrato de café verde. Os compostos presentes e suas concentrações (mg g^{-1}) são apresentadas na Tabela 1. Em ambos os extratos, o ácido cafeico foi o composto mais abundante, com concentrações de $43,75 \text{ mg g}^{-1}$ no extrato de café verde e $4,5 \text{ mg g}^{-1}$ no extrato de café torrado.

Tabela 1 - Compostos presentes nos extratos de café verde e torrado identificados por meio da técnica de HPLC

Composto	Concentração (mg g^{-1})	
	CV	CT
Ácido gálico	NE	0,001
Catequina	NE	0,012
Ácido clorogênico	15,096	0,019
Ácido cafeico	43,752	4,500
Vanilina	0,323	0,008
Ácido ferúlico	0,224	NE
Ácido m-cumárico	NE	0,007
Ácido o-cumárico	0,526	N/E
Resveratrol	0,247	N/E

Legenda: CV = café verde; CT = café torrado e NE - Não encontrado

5.3 Pré-teste de toxicidade dos solventes e preparação das soluções a serem avaliadas

Para avaliar a toxicidade dos extratos de café sem a interferência do solvente, foram preparados recipientes (Copos descartáveis de 250 mL) contendo 15 larvas de 3º instar, água e os solventes de modo que no final as concentrações de DMSO e Tween nos recipientes foram 25% (6,25 mL), 15% (3,75 mL), 10% (2,5 mL) e 1% (0,25 mL). A partir do pré-teste, definiu-se que seria utilizados os solventes a 1% para as soluções do experimento de exposição aos extratos. Sendo as seguintes soluções estoque utilizadas nos bioensaios:

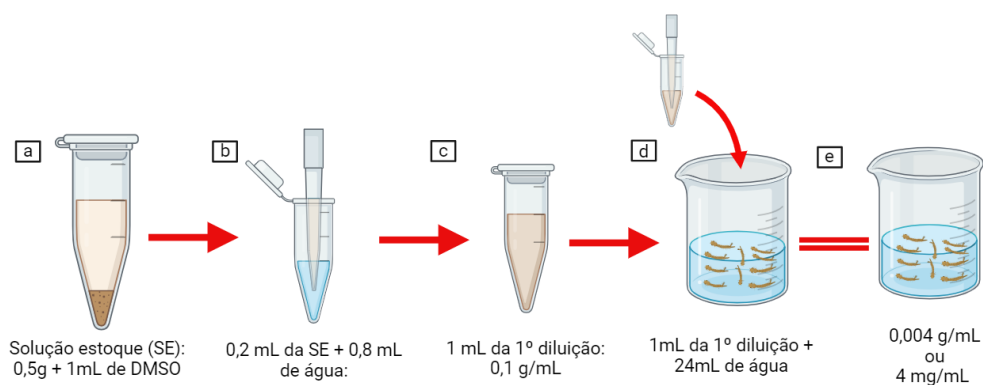
- 0,5 g de extrato de café verde diluído em 1 mL de DMSO (**CVD**);
- 0,5 g de extrato de café verde diluído em 1 mL de TWEEN80 (**CVT**);
- 0,5 g de extrato de café torrado diluído em 1 mL de DMSO (**CTD**);
- 0,5 g de extrato de café torrado diluído em 1 mL de TWEEN80 (**CTT**).

5.4 Bioensaio de toxicidade dos extratos para larvas de *A. aegypti*

O bioensaio foi realizado de acordo com as normas técnicas estabelecidas pela OMS (2005) com modificações referentes à quantidade de larvas e mL de água. As quatro soluções estoque foram utilizadas em diluições seriadas, de acordo com as normas técnicas estabelecidas pela OMS (2005).

Para a maior concentração (4 µL/mL), um volume de 200 µL da solução estoque foram adicionados em 800 µL de água deionizada e homogeneizado em vortex, tendo então uma concentração de 0,1 mg/mL. Finalmente, 1 mL dessa solução foi adicionada a 24 mL de água declorada, o que resultou em uma concentração final de 4 µL do extrato/mL, sendo a concentração final do solvente de 0,8% (Figura 11). Os bioensaios foram realizados com as quatro soluções estoque nas seguintes diluições: 4 µL/mL; 2 µL/mL; 1,6 µL/mL; 1,2 µL/mL; 1 µL/mL; 0,48 µL/mL; 0,25 µL/mL e 0,12 µL/mL.

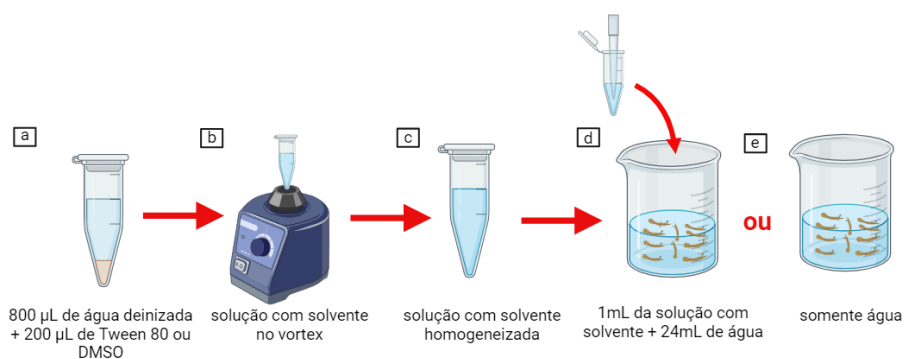
Figura 11 - Preparação das soluções utilizadas no experimento



Legenda: **a-** solução estoque com 0,5 g de extrato de café mais 1 mL do solvente (DMSO ou Tween. **b-** retirou-se 0,2 mL da solução estoque e adicionou-se em 0,8 mL de água deionizada. **c-** a solução foi homogeneizada em vortex e no final obteve-se a concentração de 0,1 g/mL na 1ª diluição. **d-** após esse processo foi adicionado 1 mL da primeira solução em 24 mL de água deionizada contendo 15 larvas 3º ÍNSTAR de *Aedes aegypti* **e-** no final obteve-se concentração de 0,004 g/mL, 15 larvas e menos de 1% do solvente na solução final. Fonte: Do Autor, Criado no site <https://app.biorender.com/> em 2023

Os bioensaios, para cada uma das oito concentrações, de cada uma das quatro soluções estoque foram realizados em quatro repetições em dois dias diferentes. Foram utilizados três grupos controle: (1) água: 25 mL de água deionizada; (2) DMSO: 24,8 mL de água deionizada e 0,2 mL do solvente DMSO e (3) do Tween 80: 24,8 mL de água deionizada e 0,2 mL do solvente Tween 80. Para cada grupo foi adicionado um total de 15 larvas de 3º ínstar , pois são mais resistentes ao manuseio e maiores ao olho nu, aos 25 mL da solução teste e controle (Figura 12).

Figura 12 - Preparação das soluções utilizadas nos tratamentos controles nos bioensaios com larvas de *Aedes aegypti*



Legenda: **a-** solução de 200 µL de DMSO c ou Tween mais 800 µL de água deionizada .**b-** solução sendo homogeneizada no vortex. **c-** solução homogeneizada. **d-** adição de 1 mL da solução com solvente (DMSO ou Tween 80) em 24 mL de água deionizada contendo 15 larvas de *Aedes aegypti* **e-** ou então temos 25 mL

de água de clorada contendo 15 larvas de *A. aegypti* sem adição de solventes. Fonte: Do Autor, Criado no site <https://app.biorender.com/> em 2023

A mortalidade foi avaliada às 24 h, 48 h e 72 h após a exposição aos tratamentos. Foram consideradas mortas as larvas que permaneciam imóveis após um estímulo mecânico (contato com uma espátula de ferro autoclavada e higienizada). Após 24 h do teste, a ração de peixe triturada foi adicionada em cada recipiente (copos descartáveis de 250 mL).

5.5 Toxicidade do composto majoritário para larvas de *A. aegypti*

Para avaliar a toxicidade do composto majoritário (CM) do extrato de café foi utilizada a metodologia de Rosett et al. (2023) com modificações, onde a dose foi calculada com base na seguinte fórmula:

Equação 1 - Equação utilizada para calcular a quantidade de composto a ser utilizado no bioensaio de toxicidade do composto majoritário

$$DOSE \ A \ SER \ TESTADA = \frac{dose \ letal \ 90}{(concentração \ do \ CM \ presente \ no \ extrato \div 100)}$$

Onde a dose letal 90 foi obtida através dos extratos que causou maior mortalidade (CTT); a concentração do CM no extrato foi obtida com os dados de Fernandes et al. (2022) referentes à maior concentração de ácido cafeico em 1g de extrato. Foram utilizadas 6,42 mg de ácido cafeico (Sigma-Aldrich ®; pureza $\geq 98\%$) homogeneizado em Tween 80, de acordo com o mesmo protocolo esquematizado na Figura 11. Para cada recipiente (copos descartáveis de 250 mL) foi adicionado 24 mL de água declorada, 15 larvas de *A. aegypti* e 1 mL da solução de ácido cafeico (6,42mg) em Tween 80.

O bioensaio foi realizado conforme descrito no subitem 5.4.

5.6 Análise estatística

Para determinação das doses letais 50, 90 e 99 dos extratos de café para as larvas de *A. aegypti* utilizou-se a função logit por meio do pacote DRC (RITZ; STREBIG, 2016) no software R (R CORE, 2021) com um intervalo de confiança de 95%. A função logit foi calculada com base na seguinte fórmula:

Equação 2 - Função logit utilizada para calcular as Doses Letais 50, 90 e 99

$$(Y): f(x) = \frac{1}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Onde o limite inferior é 0 o limite superior é 1; (e) é o ponto de inflexão da curva dose-resposta correspondente ao valor da DL50; (b) é proporcional ao slope da concentração (e) e x corresponde ao valor da concentração (RITZ et al., 2015). Para a confecção dos gráficos, análises de regressão, ANOVA e o teste de tukey foi usado o programa GraphPad Prism Versão 10.1.0.

6 RESULTADOS

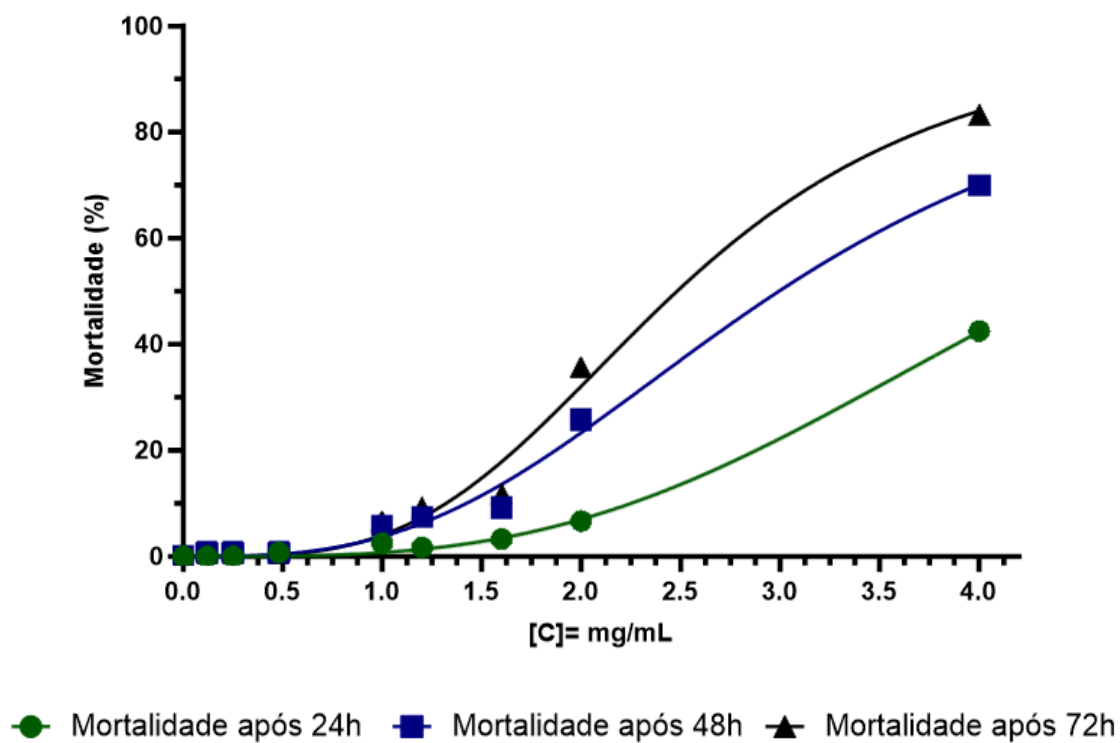
Os bioensaios foram realizados em condições de laboratório sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $57 \pm 4,5\%$ e fotofase de 12h.

6.1 Avaliação da toxicidade do extrato de café verde

6.1.1 Efeito do extrato de café verde em solvente DMSO 1% sobre larvas de *A. aegypti*

Às 24 h após a exposição ao tratamento com o extrato de café verde diluído em água deionizada e DMSO a 1% (CVD), foi possível verificar que na concentração de 4 mg/mL a mortalidade das larvas foi de $42,5 \pm 13,7\%$. Às 48 h após a exposição a mortalidade na maior concentração de extrato de café verde (4 mg/mL) teve um aumento de 27,5% em comparação à mortalidade observada às 24 h. Esse aumento no número de larvas mortas foi observado na maioria das concentrações, exceto na concentração de 0,48 mg/mL, às 72 horas foi observado que a porcentagem de mortalidade das larvas na maior concentração (4 mg/mL) foi de 83%. A curva de dose-resposta apresentou um aumento exponencial de mortalidade após a concentração 1,6 mg/mL (Gráficos 1).

Gráfico 1 - Curva de dose e resposta da mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* às 24, 48 e 72 h após a exposição ao tratamento Café Verde e DMSO como solvente

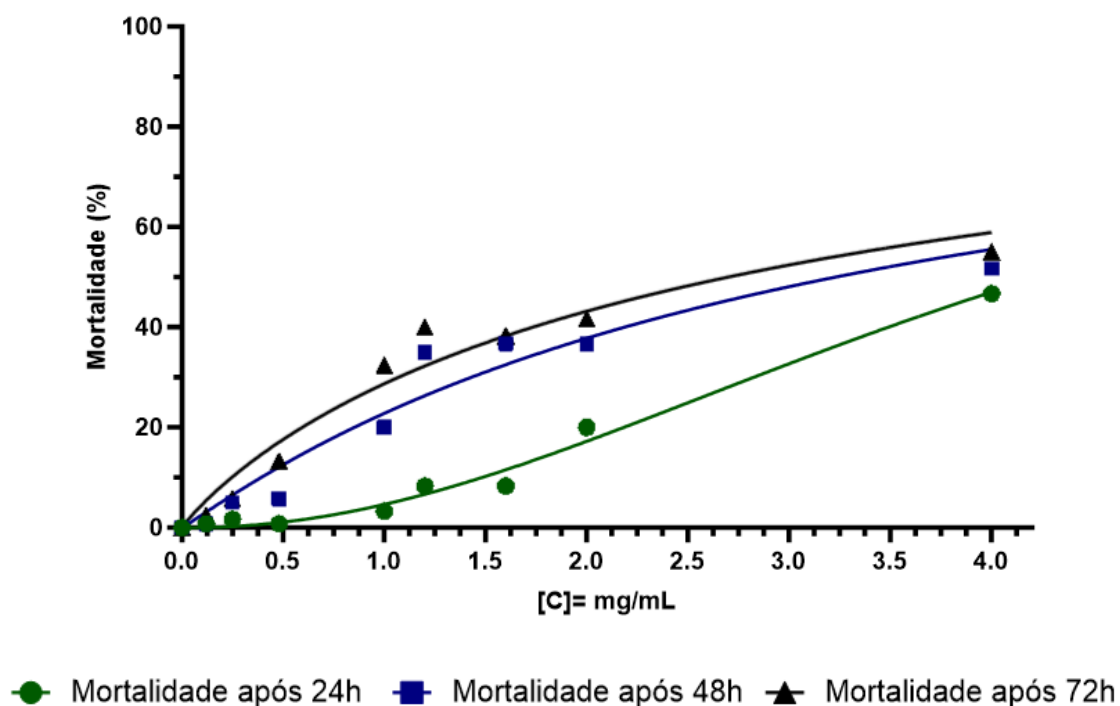


Fonte: Do Autor, 2023

6.1.2 Efeito do extrato de café verde em solvente DMSO 1% sobre larvas de *A. aegypti*

Ao avaliar o extrato de café verde diluído em Tween (CVT) às 24 horas após a exposição, observou-se mortalidade de 46,7% na maior concentração testada (4 mg/mL). Às 48 horas, na maior concentração, houve aumento de 5% em relação aos resultados obtidos às 24 horas após a exposição. Além disso, nas demais concentrações, foram observados aumentos na mortalidade de larvas de *A. aegypti*. Na concentração de 1,6 mg/mL houve aumento de 28,4% em relação aos valores obtidos nas primeiras 24 horas. Verificou-se um efeito progressivo do extrato de café verde diluído em Tween 80 sobre a mortalidade das larvas de *A. aegypti*. Às 72 h após exposição a mortalidade registrada foi abaixo do valor encontrado no bioensaio de toxicidade do CVD porém sua curva de dose e resposta se manteve em constância sem aumento exponencial (Gráficos 2).

Gráfico 2 - Curva de dose e resposta da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* às 24, 48 e 72h após a exposição ao tratamento Café Verde e Tween como solvente



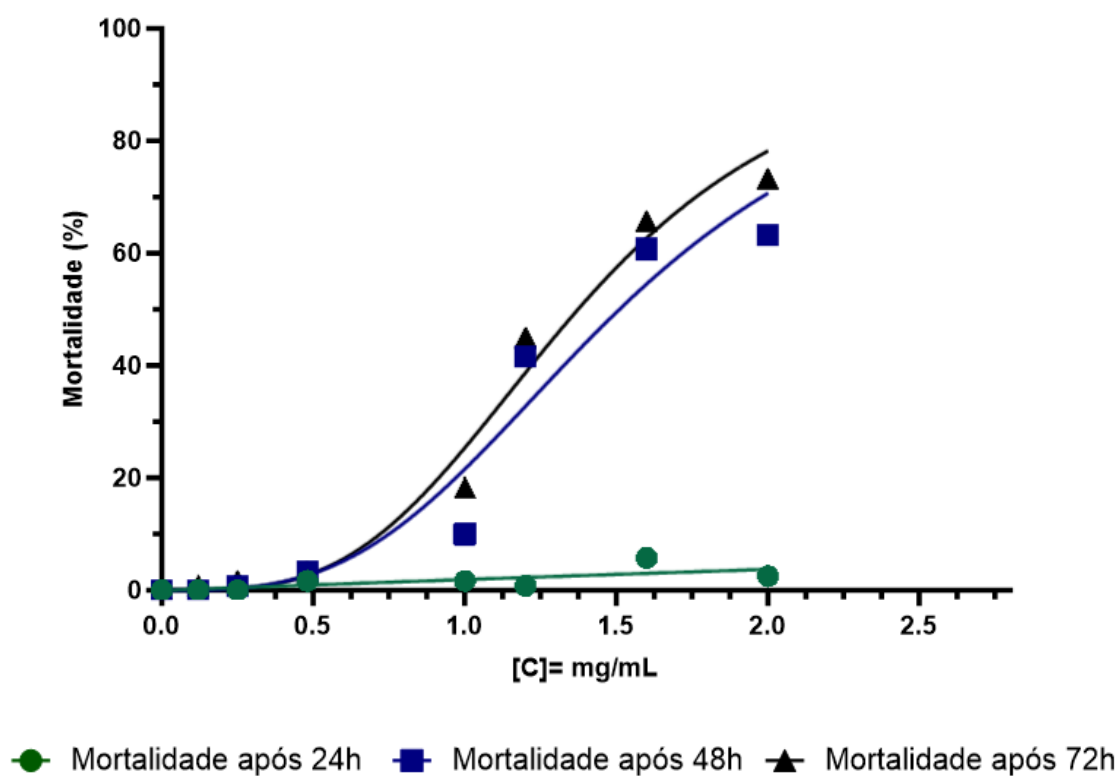
Fonte: Do Autor, 2023

6.2 Avaliação da toxicidade do extrato de café torrado

6.2.1 Efeito do extrato de café torrado em solvente DMSO 1% sobre larvas de *A. aegypti*

No extrato de café torrado e DMSO (CTD) a maior concentração (4 mg/mL) não foi possível observar a mortalidade. Às 24 horas de exposição das larvas a mortalidade observada na concentração de 2 mg/mL foi de 2,5%. Às 48 horas de exposição das larvas ao tratamento CTD verificou-se um aumento na mortalidade de 60,8% na concentração de 2 mg/mL. Nas demais concentrações evidenciou-se aumento no número de larvas mortas. Às 72 h de exposição a mortalidade das larvas atingiu um aumento de 70,8% se comparado com as primeiras 24 horas de exposição (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Curva de dose e resposta da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* às 24, 48 e 72h após a exposição ao tratamento Café Torrado e DMSO como solvente

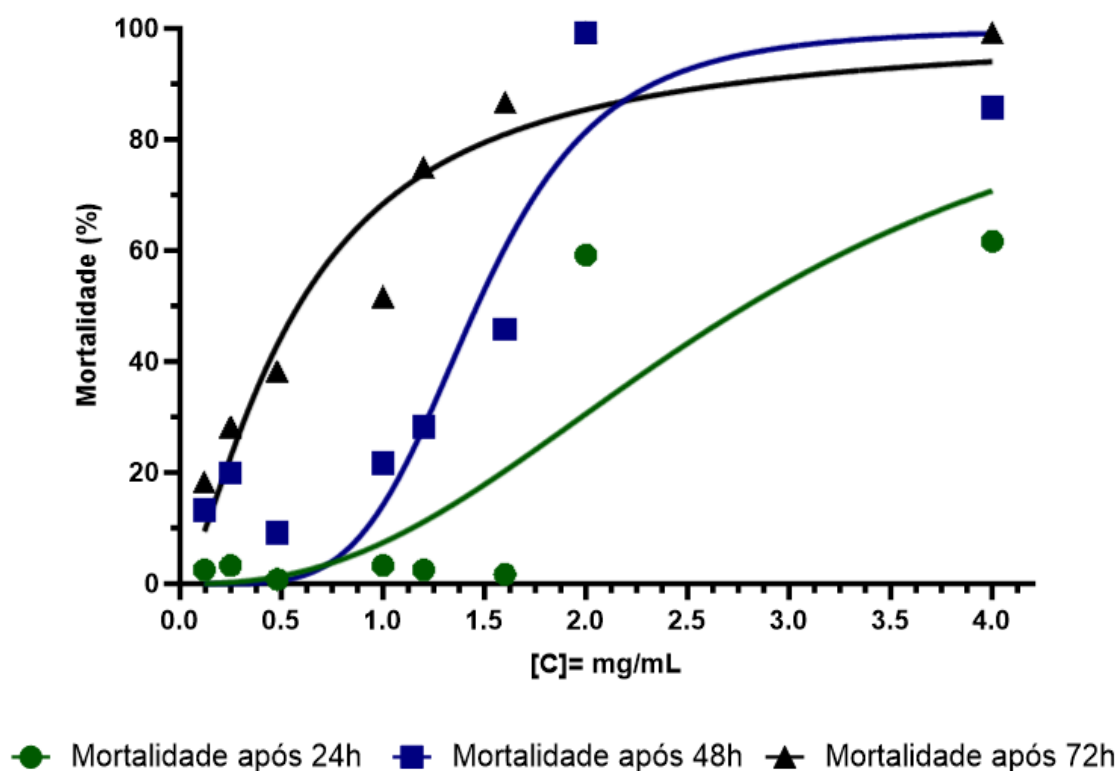


Fonte: Do Autor, 2023

6.2.2 Efeito do extrato de café torrado em solvente Tween 1% sobre larvas de *A. aegypti*

No experimento com café torrado mais Tween como solvente (CTT), a mortalidade de larvas às 24 horas foi de 61,7% na maior concentração (4mg/mL), de 59,2% para 2 mg/mL. Ambas as médias foram superiores à mortalidade registrada às 72 horas do extrato de café verde com Tween (55%). A mortalidade de larvas registrada às 48 horas após a exposição teve um aumento de 24,1% (4 mg/mL), vale ressaltar que na concentração 2 mg/mL a mortalidade de larvas registrada após 48 h de exposição ao tratamento CTT ficou próximo dos 100%. Às 72 h a mortalidade foi próxima a 100% nas concentrações de 4 e 2 mg/mL. Nas demais concentrações as médias de mortalidade também tiveram aumento (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Curva de dose e resposta da mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* às 24, 48 e 72h após a exposição ao tratamento Café Torrado e Tween como solvente

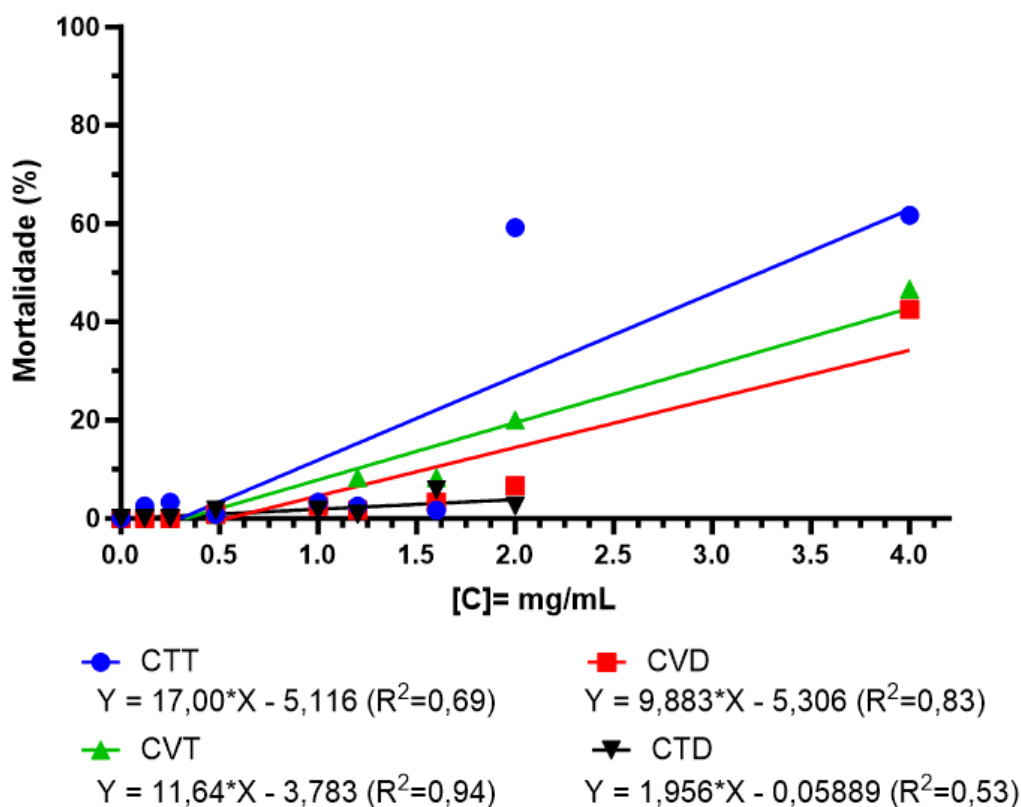


Fonte: Do Autor, 2023

6.3 Toxicidade dos extratos para larvas de *A. aegypti*

Os tratamentos CTT, CVD e CVT demonstraram relações fortes e altamente significativas ($p=0,0056$; $p=0,0007$; $p<0,0001$), com coeficientes de inclinação de 17; 9,9 e 11,64, respectivamente, explicando 69%, 83% e 94% da variação nos dados. Em contrapartida, o tratamento CTD, embora significativo ($p=0,0395$), apresentou relação menos pronunciada, com coeficiente de inclinação de 1,96 e uma explicação de 53% da variação nos dados (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Análise da regressão e variabilidade entre diferentes tratamentos em larvas de *Aedes aegypti* após 24 de exposição

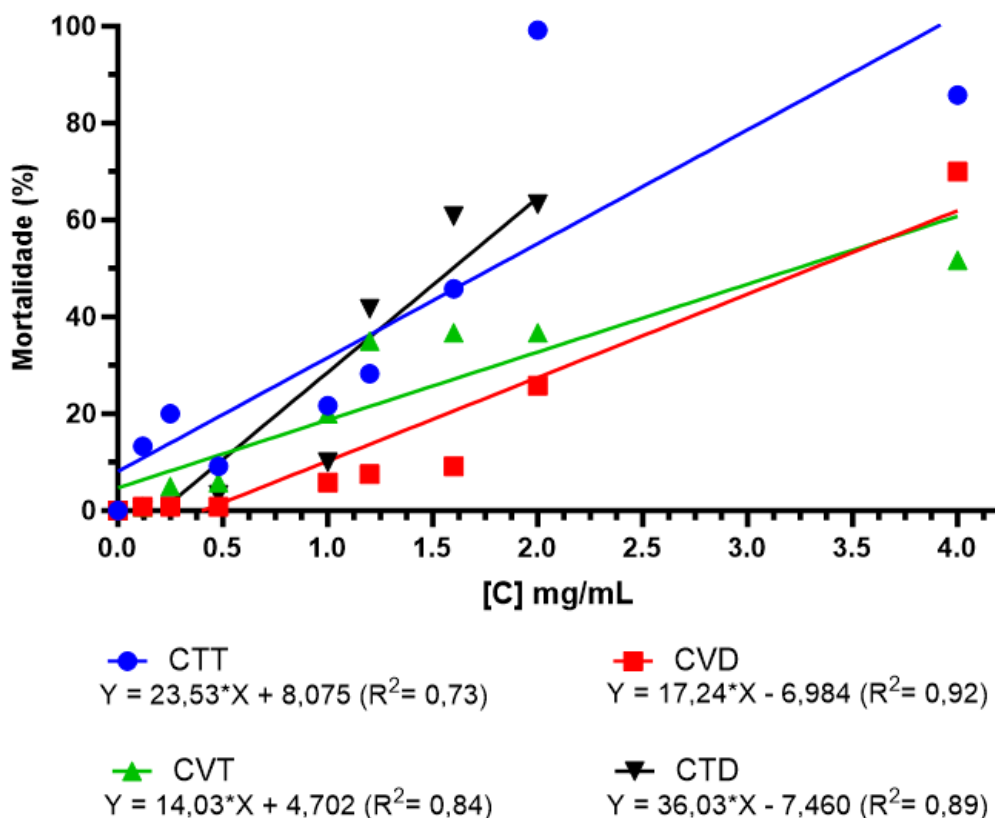


Fonte: Do Autor, 2023

Às 48 h ocorreram relações robustas entre os tratamentos CTT ($p=0,0033$), CVD ($p<0,0001$), CVT ($p=0,0005$) e CTD ($p=0,0004$). O tratamento CTT exibiu relação sólida, com um coeficiente de inclinação de 23,53 e explicação de 73% da variação nos dados. O tratamento CVD demonstrou relação extremamente forte, com coeficiente de inclinação de 17,24 e explicação de 92%. O tratamento CVT também revelou relação forte, com um coeficiente de inclinação de 14,03 e explicação de 84%. O tratamento CTD

apresentou relação muito forte, com coeficiente de inclinação de 36,03 e explicação de 89%. Os resultados das análises de significância para os tratamentos CTT, CVD e CVT são de F(1,7) alcançando 19,06, 75,63 e 37,38, respectivamente. A análise do tratamento CTD, por sua vez, apresentou um grau de significância estatística ainda mais pronunciado, com um valor de F(1,6) de 48,81 (Gráfico 6)

Gráfico 6 - Análise da regressão e variabilidade entre diferentes tratamentos em larvas de *Aedes aegypti* após 48h de exposição

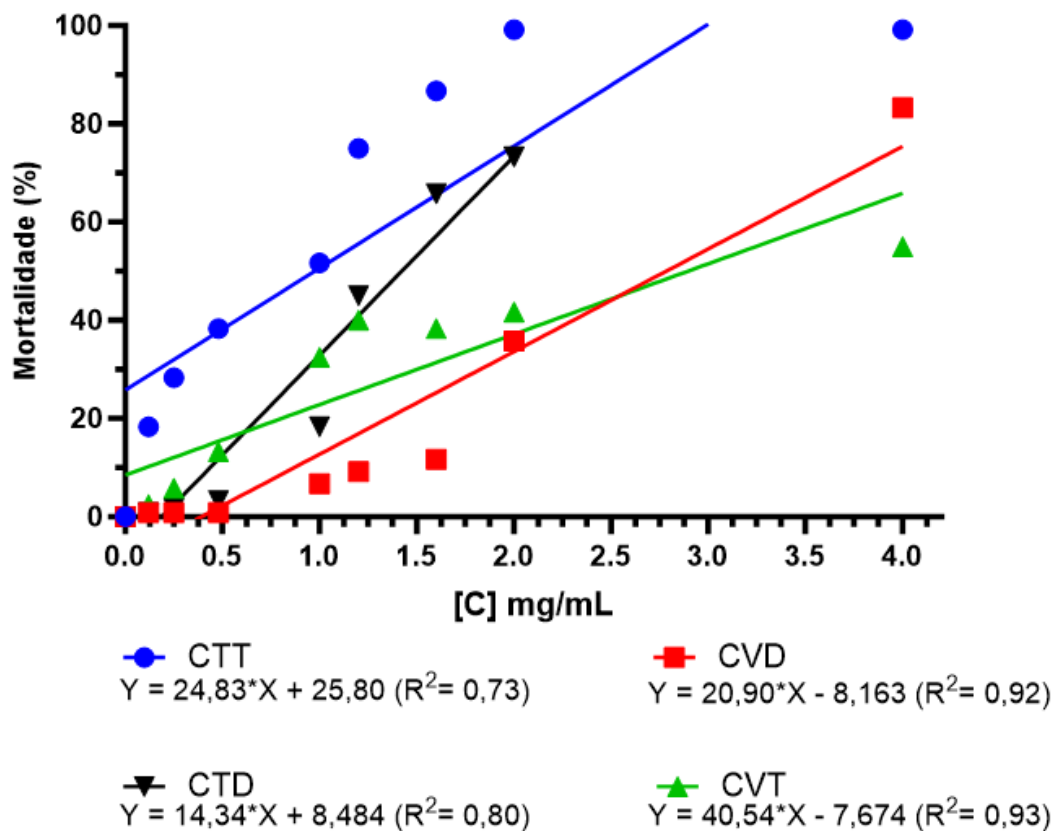


Fonte: Do Autor, 2023

Houve relações substanciais e altamente significativas entre os tratamentos (CTT, CVD, CVT e CTD) às 72 h do tratamento das larvas de *A. aegypti*. O tratamento CTT ($p=0,0032$) apresentou relação robusta, coeficiente de inclinação de 24,83 e explicação de 73% da variação dos dados. O tratamento CVD teve relação altamente significativa ($p<0,0001$), com coeficiente de inclinação de 20,90 e explicação de 92%. O tratamento CVT apresentou relação significativa ($p=0,0012$), com coeficiente de inclinação de 14,34 e explicação de 79,9%. O tratamento CTD revelou uma relação significativa ($p<0,0001$), com um coeficiente de inclinação de 40,54 e uma explicação de 93% das variáveis. Além disso, os resultados dos testes de significância F(1,7) foram de 19,24, 82,59 e 27,77 para

os tratamentos CTT, CVD e CVT, respectivamente, juntamente com o tratamento CTD com F(1,6) igual a 83,37 (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Análise da regressão e variabilidade entre diferentes tratamentos em larvas de *Aedes aegypti* após 72h de exposição



Fonte: Do autor, 2023

6.4 Determinação das Doses Letais dos extratos de café

A dose letal (DL) necessária para matar 90% da população de *A. aegypti* às 72 h após exposição ao tratamento de café torrado e Tween 80 foi 3,8% menor que a do tratamento à base de café verde e DMSO. A DL50 do extrato de café torrado e Tween 80 foi de $0,33 \pm 0,22$ mg/mL (Tabela 1).

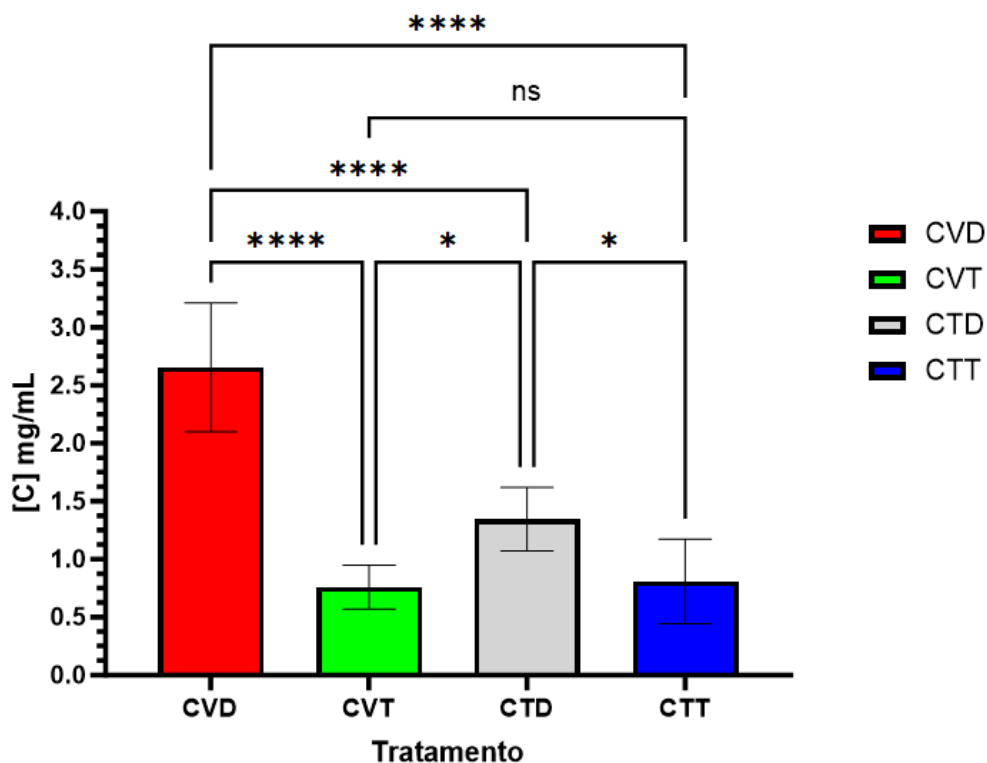
Tabela 2 - Doses letais 50, 90 e 99 necessárias para matar larvas de *Aedes aegypti* às 72 h de exposição dos tratamentos de café torrado e café verde com os solventes DMSO e Tween

Tratamento	n	χ^2	p	*b	*e	DL ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	DL ₉₀ (mg.mL ⁻¹)	DL ₉₉ (mg.mL ⁻¹)
CTT	120	37,52	0	-1,454	32,521	$0,33 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,14$	$7,67 \pm 1,5$
CTD	120	19,04	0,0019	-2,674	143,526	$1,43 \pm 0,05$	$3,26 \pm 0,3$	$8 \pm 1,3$
CVT	120	9,87	0,13	-1,029	256,95	$2,57 \pm 0,25$	$21,76 \pm 5,87$	$107,3 \pm 13,6$
CVD	120	88,96	0	-2,995	253,27	$2,53 \pm 0,1$	$5,27 \pm 0,45$	$11,75 \pm 1,7$

Legenda: CVD = Extrato de café verde e DMSO; CVT = Extrato de café verde e Tween); CTD = Extrato de café torrado e DMSO e CTT = Extrato de café torrado e Tween 80). Fonte: Do autor, 2023.

Para analisar os efeitos dos tratamentos CVD, CVT, CTD e CTT na DL50, conduzimos uma análise de variância (ANOVA), da qual resultou um valor de $F(3, 476) = 7204$, com um p-valor menor que 0,0001, indicando uma diferença altamente significativa entre os grupos em relação à DL50. Posteriormente, empregamos testes post-hoc de Tukey para investigar as discrepâncias específicas entre os grupos. Os resultados apontaram para diferenças estatisticamente significativas entre todos os tratamentos ($p < 0,0001$), exceto no caso do tratamento CVT, que não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento CVD ($p = 0,1098$) (Gráfico 8)

Gráfico 8 – Comparação estatística utilizando o teste de Tukey dos resultados da DL50 entre diferentes tratamentos.



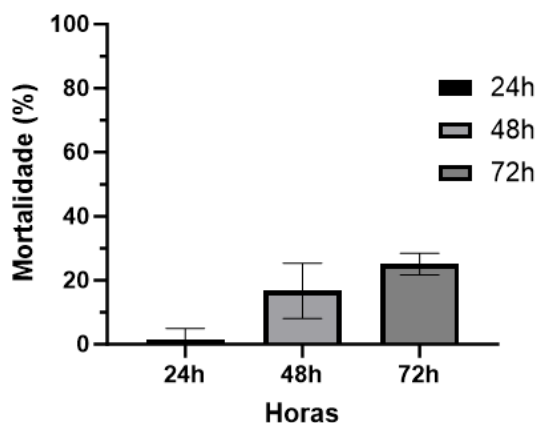
Legenda: a- Extrato de café verde e DMSO a 1%; b- Extrato de café verde e Tween 1%; c- Extrato de café torrado e DMSO a 1%; d- Extrato de café torrado e Tween a 1%; ns – Não significativo

Fonte: Do autor, 2023

6.5 Avaliação da toxicidade do composto majoritário para larvas de *A. aegypti*

O composto majoritário ácido cafeico na concentração de 6,42 mg/mL apresentou porcentagem de mortalidade de larvas de $1,7 \pm 0,5\%$ às 24 h, sendo que às 48 e 72 h as mortalidades foram de $16,7 \pm 1,3\%$ e de $25 \pm 0,5\%$, respectivamente (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* às 24, 48 e 72 h após a exposição ao tratamento de toxicidade do composto majoritário



fonte: Do Autor, 2023

7 DISCUSSÃO

Aedes aegypti é vetor de patógenos de importância médico-veterinária, como a Dengue, sendo que seu controle envolve a eliminação mecânica de criadouros, ações de educação em saúde e o uso de inseticidas sintéticos. No entanto, o uso indevido desses inseticidas contribuiu para a seleção de populações resistentes. Alternativas como o *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTi) foram usadas, mas sua baixa persistência no ambiente limitou sua eficácia. Outras opções incluem insetos transgênicos ou infectados com bactérias do gênero *Wolbachia*, que estão sendo testados como métodos alternativos de controle (LORENZ e CHIARAVALLOTTI-NETO, 2022; VALLE et al., 2019; NAKAZAWA et al., 2020; MOREIRA et al., 2009; 2012).

Além disso, produtos botânicos como óleos essenciais e extratos vegetais também vem sendo utilizados como estratégia alternativa para o controle de *A. aegypti* (DOS SANTOS et al., 2023). Embora a pesquisa específica sobre o uso de café (*Coffea arabica* ou *Coffea canephora*), especialmente utilizando grãos de café verde, seja limitada na literatura, alguns autores já documentaram sua atividade biológica para *A. aegypti* (ELLIAS et al., 2015; SATHO et al., 2015).

No presente estudo foi observado que os extratos de café torrado e verde possuem toxicidade para larvas de *A. aegypti*. Embora tenhamos usado o método da OMS (2005) para avaliar a toxicidade dos extratos não há nenhuma diretriz quanto à porcentagem de mortalidade ideal para indicar um potencial bioinseticida, sendo assim autores como Muturi et al. (2017) e Pereira-Filho et al. (2021) adotaram uma mortalidade entre 90% - 100% para considerar que o produto botânico seja considerado como efetivo no controle de *A. aegypti*.

Observamos que o tratamento CTT apresentou mortalidade superior a 90% na concentração de 4 mg/mL, o que demonstra sua efetividade no controle de larvas de *A. aegypti*. Outros autores também observaram mortalidade (acima de 90%) das larvas quando tratados com extratos de café; contudo, em nosso estudo utilizamos doses bem abaixo daquelas utilizadas por esses autores e obtemos resultados semelhantes (LARANJA et al., 2003; GUIRADO e BICUDO 2009; TANGTRAKULWANICH et al.,

2022; THANASOPONKUL et al., 2023). Com exceção do estudo feito por Drago et al. (2021) que observou uma baixa mortalidade de larvas tratadas com extrato de café. Acreditamos que essa diferença de resultado seja devido à metodologia empregada pelos autores durante a extração dos extratos de café. Por exemplo, Laranja (2003) avaliaram os efeitos de borra de café e verificaram mortalidade de 100% das larvas L2 e L3 de *A. aegypti*. Porém a borra de café é um subproduto, e as concentrações de compostos químicos, como o ácido cafeico e clorogênico são menores aos encontrados no nosso extrato de café como relatado por Ramón-Gonçalves et al. (2019) e Fernandes et al. (2022.) e por isto foram necessárias doses maiores para causar efeito tóxico para as larvas de *A. aegypti*.

O café e seus metabólitos podem possuir efeitos tóxicos sobre as larvas de *A. aegypti*, porém é necessária uma padronização do método de extração para melhores resultados frente ao controle de *A. aegypti*. Como mencionado anteriormente (subitem 2.4.2), a torrefação dos grãos de café ocorre em temperaturas elevadas, o que pode contribuir para a degradação de alguns metabólitos e formação de novos compostos. Esses compostos podem amplificar o efeito tóxico do extrato de café para as larvas de *A. aegypti* ou serem eles os responsáveis pela toxicidade. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos com café torrado causaram maior mortalidade. Tangtrakulwanich et al. (2022) relataram que diferenças na torrefação do café causaram diferentes índices de mortalidade de *A. aegypti*. Evidenciaram que o extrato proveniente de torra clara às 24 h após exposição resultou em mortalidade de 90%, enquanto os de torra média e escura resultaram em mortalidade inferior a 80% das larvas.

A análise cromatográfica do extrato de café verde usado no presente trabalho evidenciou maior concentração de ácido cafeico (43,752 mg por 1g de extrato) quando comparado com o extrato de café torrado (4,5 mg por 1g de extrato), segundo Fernandes et al., (2022). No nosso estudo, surpreendentemente, o tratamento CTT causou maior mortalidade em larvas do que o CVT. Esse resultado se assemelha ao de Eastep et al. (2012), os quais utilizaram o café descafeinado e comum para avaliar a toxicidade em larvas de *Aedes albopictus* e verificaram que doses mais baixas causaram maior índice de mortalidade do que doses altas. Outro estudo que sustenta esta observação foi realizado por Guirado e Bicudo (2009) onde investigou-se a influência da quantidade de borra de café na água sobre a mortalidade das larvas. Observaram que concentração de 75 mg/mL de borra de café resultou em mortalidade de larvas na faixa de 70 a 90%,

enquanto a maior concentração (300 mg/mL) verificou-se mortalidade de 60%. Este fenômeno pode ser descrito como um "efeito paradoxal", termo inicialmente proposto por Eagle (1949), em seu estudo, o autor constatou que doses mais altas de antibiótico tinha níveis paradoxalmente melhores de sobrevivência do que no grupo tratado com doses mais baixas. Desde então esse fenômeno vem sendo observado em diversos estudos na área da toxicologia e farmacologia (PRASETYOPUTRI et al., 2019)

Durante o processo de diluição do tratamento CTD, observamos que não houve solubilização adequada em água; no entanto, a partir da concentração de 2 mg/mL, a solução se tornava homogênea. O solvente Tween é um composto tensoativo não iônico, também conhecido como surfactante, que não possui íons carregados em sua estrutura química, atuando na redução da tensão superficial entre duas fases, como água e óleo (STRICKLEY, 2004). Devido a essa propriedade, o Tween tem sido amplamente utilizado na indústria farmacêutica para melhorar a entrada de certas substâncias nas membranas biológicas (REGE et al., 2001).

Por outro lado, o DMSO é uma molécula hidrofílica, miscível em água e com alta afinidade por ela (TARIQ et al., 2022). Em nosso estudo com extrato de café torrado, constatamos que a presença de DMSO na solução não foi suficiente para solubilizar o extrato em água, provavelmente devido à natureza lipofílica do extrato de café torrado e a predileção do DMSO por moléculas de água. Durante nossos pré-testes, observamos que concentrações contendo mais de 1% de DMSO (ou seja, superior a 250 µL) resultaram na mortalidade das larvas, inviabilizando o aumento da concentração de DMSO para solubilizar o extrato. Esta observação é relevante para a interpretação dos resultados do estudo, especialmente ao considerar as concentrações utilizadas nas análises de mortalidade. A miscibilidade inadequada entre o extrato de café torrado com DMSO e a água pode influenciar nos efeitos biológicos e as respostas observadas nos testes de toxicidade para *A. aegypti*, além de indicar que diferentes solventes podem amplificar ou inibir os efeitos dos extratos de café.

Determinações de doses letais (DL) necessárias para matar uma parcela da população com aplicação de produtos botânicos de café são escassas na literatura, sendo esse a primeira análise de DL com o uso de extrato de café verde. Os resultados obtidos de DL50 dos tratamentos CVD e CVT são semelhantes ao estudo feito por Essa et al. (2022), os quais avaliaram os efeitos de um óleo de café em sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) e estimaram a DL50 em 1,8 ppm.

Extratos da espécie *Spermacoce verticillata* (Rubiaceae) causaram DL50 em 115,8 mg/mL para o caule; 83,8 mg/mL e 209,1 mg/mL para as partes aéreas com uso de dois solventes (hexano e hexano-EtOAc 9:1) e 91,8 mg/mL para as raízes (OLIVEIRA et al., 2010). Esses valores estão muito acima dos nossos estudos, demonstrando que o uso de diferentes solventes pode interferir na ação do extrato sobre insetos.

O ácido cafeico, quando testado de forma isolada em *A. aegypti*, embora não tenha se mostrado altamente tóxico quanto os extratos, obtivemos certa toxicidade para as larvas. Esse composto apresentou atividade biológica para outros insetos (PUNIA et al., 2023), como por exemplo, Saratha et al., (2016) constatou que o Ácido cafeico causou repelência em adultos de *A. aegypti*, Joshi et al. (2014) demonstraram que o ácido cafeico atuou como um inibidor da tripsina, importante enzima na digestão de *Helicoverpa armígera* (Lepidoptera: Noctuidae), tendo duas hipóteses para o mecanismo de ação i) bloqueio da região ligante do sítio alvo; ii) inibição competitiva, a ingestão de inibidores de tripsina, como os purificados por Pontual et al., (2014) através de extratos de plantas, pode levar ao bloqueio de enzimas digestivas impedindo a absorção de aminoácidos e levando larvas de *A. aegypti* a morte por inanição. Além disso, o composto no mesmo estudo de Joshi et al. (2014) inibiu a atividade da glutathione S-transferase (GST) e do citocromo P450 (CYP450) responsáveis pela desintoxicação nos insetos. Isso pode explicar em partes a mortalidade registrada nos bioensaios uma vez que a não desintoxicação pode resultar em mortalidade de larvas de *A. aegypti*.

No presente estudo observou-se sinergismo e entre as substâncias presentes nos extratos capazes de aumentar a ação do composto majoritário, não obstante, pode haver outros compostos em menor quantidade e capazes de causar efeito tóxico para as larvas. Esse mesmo comportamento com compostos majoritários de produtos botânicos foi constatado por Rosett et al. (2023).

O ácido clorogênico, um composto fenólico foi encontrado em quantidade 15,096 mg.g⁻¹ no extrato de café verde e 0,019 mg.g⁻¹ e no extrato de café torrado (FERNANDES et al., 2022). Nos estudos de Reese e Beck (1976) não foram observados efeitos tóxicos do ácido clorogênico em insetos. Contudo os estudos de Ikonen et al. (2001), Kandu et al. (2019) e Liao et al. (2020) verificaram que o composto possui alto potencial tóxico para diferentes espécies de insetos. Como por exemplo, Wang et al. (2023) relataram que o ácido clorogênico está associado à expressão do gene P450, responsável pela desintoxicação no organismo dos insetos, e que possivelmente o

composto em baixas doses pode atuar como inibidor gênico, o que impede a desintoxicação dos insetos.

Em estudo de Kandu et al. (2018) com *S. litura* foi concluído que o ácido clorogênico e a catequina inibiram significativamente o crescimento larval desse inseto. Por meio de HPLC, Fernandes et al. (2022) constataram que a catequina foi encontrada somente no extrato de café torrado ($0,012 \text{ mg.g}^{-1}$). Esta substância afetou o epitélio do intestino médio de larvas de *A. aegypti* e causou 100% de mortalidade em baixas concentrações (ELUMALAI et al., 2016).

Em nosso trabalho, verificamos que a sinergia entre o ácido cafeico, ácido clorogênico e a catequina, somado ao efeito paradoxal, possa ser a responsável pela maior mortalidade nos extratos de CTD e CTT se compararmos com os extratos de CVD e CTT. Portanto, mais estudos com esses compostos absolutos com larvas de *A. aegypti* são necessários para maior compreensão a respeito dos mecanismos envolvidos na toxicidade de substâncias presentes nos extratos de café para *A. aegypti*.

Os resultados obtidos reforçam a viabilidade do uso de extratos de café de inferior qualidade como alternativa promissora para o controle de *A. aegypti*.

As arboviroses continuam a representar um desafio significativo para a saúde pública, e por isto abordagens inovadoras e sustentáveis, como substâncias derivadas do extrato de café inferior, podem ter um papel fundamental na redução da propagação dessas doenças e na mitigação do impacto socioeconômico associado. O desenvolvimento de alternativas eficazes e seguras para o controle de vetores é essencial para proteger a saúde da população global e fortalecer os sistemas de saúde diante das ameaças emergentes. Nesse contexto, o estudo apresentado contribui para uma base sólida de conhecimento e abre caminho para futuras investigações e aplicações práticas na busca por soluções mais eficientes e sustentáveis no combate de doenças transmitidas por mosquitos.

8 CONCLUSÕES

- Os extratos de café torrado e verde de qualidade inferior são eficientes no controle de larvas de *A. aegypti* e por isto apresentam potencial para ser usado no manejo desse inseto.
- O solvente Tween 80 potencializa a ação inseticida do extrato de café torrado no controle de *A. aegypti*.
- O café torrado e Tween 80 são tóxicos para *A. aegypti* com menores valores de para matar 50%, 90% e 99% da população.
- O majoritário ácido cafeico apresenta toxicidade para larvas de *A. aegypti*; entretanto, sua toxicidade é potencializada em função dos componentes minoritários presentes no café.

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, A.; NEFF, E.; GEARY, A.; HUSSER, M. C.; WILSON, K.; NORRIS, S. M.; DHARMARAJAN, G.; KARIM, S. Laboratory colonization by *Dirofilaria immitis* alters the microbiome of female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2020.
- ADITAMA, W.; SITEPU, Z. F. Y. The effectiveness of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) grounds on mortality and growth of *Aedes aegypti* larva. 2019.
- ALLMAN, M. J.; FRASER, J. E.; RITCHIE, S. A.; JOUBERT, D. A.; SIMMONS, C. P.; FLORES, H. A. Wolbachia's deleterious impact on *Aedes aegypti* egg development: the potential role of nutritional parasitism. **Insects**, v. 11, n. 11, p. 735, 2020.
- ALPHEY, Luke et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 295-311, 2010.
- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; SHIAO, S.-H.; RAIKHEL, A. S. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 16, p. 3071-3078, 2006.
- BALZANO, Michele et al. Spent espresso coffee grounds as a source of anti-proliferative and antioxidant compounds. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 59, p. 102254, 2020.
- BANDI, C.; TREES, A. J.; BRATTIG, N. W. Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. **Veterinary parasitology**, v. 98, n. 1-3, p. 215-238, 2001.
- BARRERA, R.; AMADOR, M.; DIAZ, A.; SMITH, J.; MUNOZ-JORDAN, J.; ROSARIO, Y. Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. **Medical and veterinary entomology**, v. 22, n. 1, p. 62-69, 2008.
- BONDS, Jane AS; COLLINS, C. Matilda; GOUAGNA, Louis-Clément. Could species-focused suppression of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, and *Aedes albopictus*, the tiger mosquito, affect interacting predators? An evidence synthesis from the literature. **Pest Management Science**, 2022.
- BRADY, O. J.; HAY, S. I. The global expansion of dengue: how *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 191-208, 2020.
- Brasil / Ministério da Saúde. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 160 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRASIL / Ministério da Saúde. INFORME SEMANAL Nº12 ARBOVIROSES URBANAS: SE 22. 07 de Junho de 2023. Acessado dia 10 de agosto de 2023 em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/resposta-a-emergencias/coes/arboviroses/atualizacao-dos-casos/informe-semanal-coe-arboviroses-07-06/view>>

Brasil / Ministério da Saúde. Manual sobre Medidas de Proteção à Saúde dos Agentes de Combate às Endemias: Arboviroses Transmitidas pelo *Aedes aegypti*. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

Brasil / Ministério da Saúde. Orientações técnicas para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRENGUES, Cécile et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 87-94, 2003.

CALLIGARIS, S. et al. Insights into the physicochemical properties of coffee oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 12, p. 1270-1277, 2009.

CAMARGO S. History of *Aedes aegypti* eradication in the Americas. Bull. **World Health Organ.** 36: 602–603. 1967.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 23-46, 2001.

CAPURRO ML , Carvalho DO , Garziera L , Pedrosa MC , Damasceno I et al. Descrição dos aspectos sociais que envolvem as liberações de mosquitos transgênicos no Brasil . **Jornal Internacional de Pesquisa Científica Recente**, 7 : 10363 – 10369. 2016

CASALS, J.; WHITMAN, L. Mayaro virus: A new human disease agent: I. Relationship to other Arbor Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1004-1011, 1957.

CHRISTOPHERS, S. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. ***Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure.**, v., n., p., 1960.

CLIFFORD, M.N. **Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**. [s.l.]: Springer Verlag, 2012.

CLOPTON, J. R. A circadian rhythm in spontaneous locomotor activity in the larvae and pupae of the mosquito, *Culiseta incidens*. **Physiological Entomology**, v. 4, n. 3, p. 201-207, 1979.

COLLET, M. L. et al. Frequency of the Val1016Ile mutation on the kdr gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in south Brazil. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 10.4238, 2016.

CRAWFORD, Jacob E. et al. Efficient production of male Wolbachia-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 482-492, 2020.

DA SILVA, Carina Quintanilha et al. Risk assessment of coffees of different qualities and degrees of roasting. **Food Research International**, v. 141, p. 110089, 2021.

DA SILVA, Monalisa R. et al. Modeling the impact of genetically modified male mosquitoes in the spatial population dynamics of *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9112, 2022.

DALTO, Cathiana et al. EDUCAÇÃO EM SAÚDE ABORDANDO TEMA “DENGUE” DE FORMA INTERPROFISSIONAL: RELATO DE EXPERIÊNCIA. **Revista Saúde.Com**. 2021.

DAVIS, AARON P.; TOSH, JAMES; RUCH, NICOLAS; *et al.* Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357–377, 2011.

DE CURCIO, J. S.; SALEM-IZACC, S. M.; NETO, L. M. P.; NUNES, E. B.; ANUNCIACÃO, C. E.; DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, E. Detection of Mayaro virus in *Aedes aegypti* mosquitoes circulating in Goiania-Goias-Brazil. **Microbes and Infection**, v. 24, n. 4, p. 104948, 2022.

DERRAIK, José GB; SLANEY, David. The toxicity of used coffee grounds to the larvae of *Ochlerotatus* (Finlaya) *notoscriptus* (Skuse)(Diptera: Culicidae). **Ann Med Entomol**, v. 14, p. 14-24, 2005.

DICKSON, L. B.; SHARAKHOVA, M. V.; TIMOSHEVSKIY, V. A.; FLEMING, K. L.; CASPARY, A.; SYLLA, M.; BLACK IV, W. C. Reproductive incompatibility involving Senegalese *Aedes aegypti* (L.) is associated with chromosome rearrangements. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004626, 2016.

DIENG, Hamady et al. Coffee, its roasted form, and their residues cause birth failure and shorten lifespan in dengue vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 14782-14794, 2017.

DJERRAB, Doña et al. Photoperiod-dependent transcriptional modifications in key metabolic pathways in *Coffea arabica*. **Tree Physiology**, v. 41, n. 2, p. 302-316, 2021.

DORZABAN, Hedayat et al. Mosquito surveillance and the first record of morphological and molecular-based identification of invasive species *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae), southern Iran. **Experimental Parasitology**, v. 236, p. 108235, 2022.

DOS SANTOS, D. R. et al. New weapons against the disease vector *Aedes aegypti*: from natural products to nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 123221, 2023.

DRAGO, A. et al. Efficacy of used coffee grounds as larvicide against *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) and *Ae. aegypti* Linné, 1762 (Diptera: Culicidae). **Journal of the European Mosquito Control Association**, v. 39, n. 1, p. 27-30, 2021.

EAGLE, Harry. A paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin in vitro. **Science**, v. 107, n. 2767, p. 44-45, 1948.

EASTEP, N. E.; ALBERT, R. E.; ANDERSON, J. R. Modulation of La Crosse virus infection in *Aedes albopictus* mosquitoes following larval exposure to coffee extracts. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 66,2012.

ELLIAS, S. S.; DIENG, H.; AB MAJID, A. H. EFFECTS OF DIFFERENT COFFEE EXTRACTS ON THE EGG FERTILITY AND LIFESPAN OF DENGUE VECTORS (*Aedes albopictus* AND *Aedes aegypti*)(DIPTERA: CULICIDAE).

ELUMALAI, Devan et al. Larvicidal activity of catechin isolated from *Leucas aspera* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 115, p. 1203-1212, 2016.

EMBRAPA CAFÉ, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produtividade média dos Cafés do Brasil estimada para 2023 é de 29 sacas por hectare**. [www.embrapa.br](https://www.embrapa.br/caffe/busca-de-noticias/-/noticia/77979989/produtividade-media-dos-cafes-do-brasil-estimada-para-2023-e-de-29-sacas-por-hectare?p_auth=P58mEmm0). Disponível em: <https://www.embrapa.br/caffe/busca-de-noticias/-/noticia/77979989/produtividade-media-dos-cafes-do-brasil-estimada-para-2023-e-de-29-sacas-por-hectare?p_auth=P58mEmm0>. Acesso em: 25 fev. 2023.

ESSA, E.; ABU EL-HASSAN, G. M.; FARAG, S. M. Biochemical Composition, Toxicity and Bioactivities of the Essential Oil extracted from *Coffea arabica* L. husks against the Cotton Leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology**, v. 15, n. 3, p. 37-49,2022.

FARIAS, F. M. *Psychotria myriantha* müll arg.(rubiaceae): Caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades anti-quimiotáxica e sobre o sistema nervoso central. 2006.

FEBRIANTO, Noor Ariefandie; ZHU, Fan. Coffee bean processing: Emerging methods and their effects on chemical, biological and sensory properties. **Food Chemistry**, p. 135489, 2023.

FIAZ, Muhammad et al. Behavioral and ultrastructural effects of novaluron on *Aedes aegypti* larvae. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 93, p. 104974, 2021.

FOSTER, W. A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annual review of entomology**, v. 40, n. 1, p. 443-474, 1995.

FRANCO O. História da febre-amarela no Brasil. Divisão de Cooperação e Divulgação. 1976.

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P.-U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biología)**, v. 2, n. 3, p., 2011.

GARCIA, Gabriela de Azambuja et al. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006227, 2018.

GARZÓN, M. J.; MAFFEY, L.; LIZUAIN, A.; SOTO, D.; DIAZ, P. C.; LEPORACE, M.; SALOMÓN, O. D.; SCHWEIGMANN, N. J. Temperature and photoperiod effects on dormancy status and life cycle parameters in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*

from subtropical Argentina. **Medical and veterinary entomology**, v. 35, n. 1, p. 97-105, 2021.

GILKES, Carlton D. et al. Yellow fever in Trinidad and the development of resistance in *Aedes aegypti* Linn, to DDT formulations. **West Indian Medical Journal**, v. 5, n. 2, p. 73-89, 1956.

GONZALES, K. K.; HANSEN, I. A. Artificial diets for mosquitoes. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 12, p. 1267, 2016.

GORDH, G.; HEADRICK, D. **A dictionary of entomology**: Cabi, 2001

GRAPHPAD SOFTWARE. **GraphPad Prism**. Versão 10.1.0. San Diego, CA, EUA, 2023

GUIRADO, M. M.; DE CAMPOS BICUDO, H. E. M. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): suspension concentration and age versus efficacy. **BioAssay**, v. 2, 2007.

GWEE, X. W. S.; CHUA, P. E. Y.; PANG, J. Global dengue importation: a systematic review. **BMC infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2021.

HANSEN, I. A.; ATTARDO, G. M.; RODRIGUEZ, S. D.; DRAKE, L. L. Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. **Frontiers in physiology**, v. 5, n., p. 103, 2014.

HARBACH, R. **Mosquito Taxonomic Inventory** secondary title: MTI, 2023. June 24 2023.

HEJNA, Aleksander. Potential applications of by-products from the coffee industry in polymer technology – Current state and perspectives. **Waste Management**, v. 121, n. 3, p. 296–330, 2021.

ICO, Organização Internacional do Café. **Banco de dados mundial de estatísticas do café | Organização Internacional do Café**. Icocoffee.org. Disponível em: <<https://icocoffee.org/pt/what-we-do/world-coffee-statistics-database/>>. Acesso em: 25 fev. 2023.

ICO, Organização Internacional do Café. **International Coffee Organization - Aspectos botânicos**. www.ico.org. Disponível em: <https://www.ico.org/pt/botanical_p.asp> e acessado em 25 de fevereiro de 2023.

IKONEN, Arsi; TAHVANAINEN, Jorma; ROININEN, Heikki. Ácido clorogênico como defesa anti-herbívora de salgueiros contra besouros das folhas. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 99, n. 1, pág. 47-54, 2001.

ISMAN, M. B. A renaissance for botanical insecticides?. **Pest Management Science**, v. 71, n. 12, p. 1587-1590, 2015.

- JANISSEN, Brendan; HUYNH, Tien. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. **Resources, Conservation and recycling**, v. 128, p. 110-117, 2018.
- JOSHI, R. S. et al. Way toward “dietary pesticides”: Molecular investigation of insecticidal action of caffeic acid against *Helicoverpa armigera*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 45, p. 10847-10854, 2014.
- JULIANO, S. A.; LOUNIBOS, L. P. 14 invasions by mosquitoes: the roles of behaviour across the life cycle. **Biological invasions and animal behaviour**, v. 245, n., p. 221-244, 2016.
- KADJO, Yapo Marie-Ange Edwige et al. Insecticide Resistance and Metabolic Mechanisms in *Aedes aegypti* from Two Agrosystems (Vegetable and Cotton Crops) in Côte d'Ivoire. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 23, n. 9, p. 475-485, 2023.
- KAKOOZA-MWESIGE, Angelina; TSHALA-KATUMBAY, Desire; JULIANO, Sharon L. Viral infections of the central nervous system in Africa. **Brain research bulletin**, v. 145, p. 2-17, 2019.
- KRAEMER, M. U. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature microbiology**, v. 4, n. 5, p. 854-863, 2019.
- KUMAR, Nirmal P. et al. Morphological and molecular characterization of *Aedes aegypti* variant collected from Tamil Nadu, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 59, n. 1, p. 22-28, 2022.
- KUNDU, Anish; MISHRA, Shruti; VADASSERY, Jyothilakshmi. Spodoptera litura-mediated chemical defense is differentially modulated in older and younger systemic leaves of *Solanum lycopersicum*. **Planta**, v. 248, p. 981-997, 2018.
- KUNDU, Anish; VADASSERY, Jyothilakshmi. Chlorogenic acid-mediated chemical defence of plants against insect herbivores. **Plant Biology**, v. 21, n. 2, p. 185-189, 2019.
- LARANJA, A. T.; MANZATTO, A. J.; CAMPOS BICUDO, H. E. M. D. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. **Genetics and molecular biology**, v. 26, p. 419-429, 2003.
- LEROY, Thierry; RIBEYRE, Fabienne; BERTRAND, Benoit; *et al.* Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 229–242, 2006.
- LIAO, Yinyin et al. Induced biosynthesis of chlorogenic acid in sweetpotato leaves confers the resistance against sweetpotato weevil attack. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 513-522, 2020.
- LIU, H. et al. Climate change and *Aedes albopictus* risks in China: current impact and future projection. **Infectious diseases of poverty**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2023.
- LONG, K. C.; ZIEGLER, S. A.; THANGAMANI, S.; HAUSSER, N. L.; KOCHER, T. J.; HIGGS, S.; TESH, R. B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes*

aegypti. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750, 2011.

LORENZ, C.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Control methods for *Aedes aegypti*: Have we lost the battle? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 49, p. 102428, 2022.

LUTZ, E. K.; GREWAL, T. S.; RIFFELL, J. A. Computational and experimental insights into the chemosensory navigation of *Aedes aegypti* mosquito larvae. **Proc Biol Sci**, v. 286, n. 1915, p. 20191495, 2019.

LUTZ, E. K.; HA, K. T.; RIFFELL, J. A. Distinct navigation behaviors in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* mosquito larvae. **J Exp Biol**, v. 223, n. Pt 7, p., 2020.

MACFIE, J. S. Morphological changes observed during the development of the larva of *Stegomyia fasciata*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 7, n. 3, p. 297-307, 1917.

MACHADO, Francisco P. et al. Nanoemulsion of *Ocotea indecora* (Shott) Mez essential oil: Larvicidal effects against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 192, p. 116031, 2023.

MACIEL-DE-FREITAS, Rafael et al. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92424, 2014.

MACORIS, MDLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saude Publica** 33: 521–522.

MARTINS, Ademir Jesus et al. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. 2009.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015.

MCCREA, A. R.; EDGERTON, E. B.; OLIVER, G. T.; O'NEILL, F. M.; NOLAN, T. J.; LOK, J. B.; POVELONES, M. A novel assay to isolate and quantify third-stage *Dirofilaria immitis* and *Brugia malayi* larvae emerging from individual *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.

MCHAFFIE, J. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia pipientis*: a thorough investigation of the symbiosis responsible for canine heartworm disease. **Parasitology research**, v. 110, n., p. 499-502, 2012.

MELO, Sebastião J. et al. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 3, p. 1444-1451, 2021.

MERCADO-REYES, Marcela et al. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2019.

- MESSINA, Jane P. et al. The many projected futures of dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 230-239, 2015.
- MIRANDA, F. R. et al. Biological, histological and immunohistochemical studies on the toxicity of spent coffee grounds and caffeine on the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116307, 2021.
- MIRTH, C. K.; ALVES, A. N.; PIPER, M. D. Turning food into eggs: insights from nutritional biology and developmental physiology of *Drosophila*. **Current opinion in insect science**, v. 31, n., p. 49-57, 2019.
- MONTAÑO-REYES, Abraham et al. Susceptibility and alterations by diflubenzuron in larvae of *Aedes aegypti*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 102, n. 2, p. e21604, 2019.
- MONTEIRO, M. C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, v. 134, n.1, p. 611-614, set./2012.
- MOREIRA, L. A. et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009.
- MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; MANSUR, J. Resistência e inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. *Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos*. 1ed. Rio de Janeiro: INCT-EM, p. 1-23, 2012.
- MOTA, M. T. D. O. et al. Mosquito-transmitted viruses—the great Brazilian challenge. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 38-50, 2016.
- MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. D. S.; DE FIGUEIREDO, R. P.; GIMAQUE, J. B. L.; DOS SANTOS GALUSSO, E.; KRAMER, V. M.; DE OLIVEIRA, C. M. C.; NAVECA, F. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.
- MOYES, Catherine L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005625, 2017.
- MUNDIM-POMBO, A. P. M.; CARVALHO, H. J. C. D.; RODRIGUES RIBEIRO, R.; LEÓN, M.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. *Aedes aegypti*: egg morphology and embryonic development. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2021.
- MUNYENDO, Leah M. et al. Coffee phytochemicals and post-harvest handling—A complex and delicate balance. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 102, p. 103995, 2021.
- MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical journal armed forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

- MUTURI, Ephantus J. et al. Combined toxicity of three essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 6, p. 1684-1691, 2017.
- NAKAZAWA, M. M. et al. Efficacy and persistence of *Bacillus thuringiensis* svar. israelensis (Bti) and pyriproxyfen-based products in artificial breeding sites colonized with susceptible or Bti-exposed *Aedes aegypti* larvae. **Biological Control**, v. 151, p. 104400, 2020.
- NASIR, S.; JABEEN, F.; ABBAS, S.; NASIR, I.; DEBBOUN, M. Effect of climatic conditions and water bodies on population dynamics of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of arthropod-borne diseases**, v. 11, n. 1, p. 50, 2017.
- NORMILE, Dennis. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. 2013.
- OECD, T. O. F. E. C. A. D. Consensus Document on the Biology of Mosquito *Aedes aegypti*. **Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology**, v., n., p., 2018.
- OLIVEIRA, Patrícia V. et al. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 107, p. 403-407, 2010.
- Organização Mundial da Saúde. (OMS). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>. 2005
- Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde. Atualização Epidemiológica: Dengue na Sub-região da América Central. 31 de julho de 2023. Washington, D.C. OPAS/OMS. 2023a
- Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde. Dengue. Washington, D.C. OPAS/OMS. 2023b. Acessado dia 10 de agosto de 2023 em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>>
- ORTIZ, Diana I.; KANG, Wenli; WEAVER, Scott C. Susceptibility of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with epidemic (subtype IC) and enzootic (subtypes ID, IIIC, IIID) Venezuelan equine encephalitis complex alphaviruses. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 6, p. 1117-1125, 2008.
- PACHECO BORGES, L.; ALVES AMORIM, V. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, p., 2020.
- PANDEY, Ashok et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.
- PATAY, É. B.; BENCSIK, T.; PAPP, N. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 9, n. 12, p. 1127-1135, 2016/12/01/ 2016.

PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects—a review. **Plant Protection Science**, v. 52, n. 4, p. 229-241, 2016.

PEREIRA FILHO, Adalberto Alves et al. Larvicidal activity of essential oils from Piper species against strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 685864, 2021.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 340-372, 2010.

PEREIRA, T. N.; CARVALHO, F. D.; DE MENDONÇA, S. F.; ROCHA, M. N.; MOREIRA, L. A. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007518, 2020.

PILAQUINGA, Fernanda et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L. (Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **PLoS One**, v. 14, n. 10, p. e0224109, 2019.

PONTUAL, Emmanuel Viana et al. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology research**, v. 113, p. 727-733, 2014.

PRASETYOPUTRI, Anggia et al. The eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin?. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 4, p. 339-354, 2019.

PROMMOOL, Tanapan et al. High performance dengue virus antigen-based serotyping-NS1-ELISA (plus): A simple alternative approach to identify dengue virus serotypes in acute dengue specimens. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009065, 2021.

PUNIA, Abhay et al. Impact of caffeic acid on growth, development and biochemical physiology of insect pest, *Spodoptera litura* (Fabricius). **Heliyon**, v. 9, n. 3, 2023.

R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing 2021. Acessado em 10 de agosto de 2023 em: <https://www.r-project.org/>

RAMASAMY, R.; SURENDRAN, S. N.; JUDE, P. J.; DHARSHINI, S.; VINOBABA, M. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 11, p. e1369, 2011.

RAMÓN-GONÇALVES, M. et al. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. **Waste Management**, v. 96, p. 15-24, 2019.

RAO, Scott. **The coffee roaster's companion**. Canada: Scott Rao, 2014.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

REESE, John C.; BECK, Stanley D. Effects of allelochemicals on the black cutworm, *Agrotis ipsilon*; effects of catechol, L-dopa, dopamine, and chlorogenic acid on larval growth, development, and utilization of food. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 69, n. 1, p. 68-72, 1976.

REGE, B. D. et al. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 11, p. 1776-1786, 2001.

REGILME, Maria Angenica F. et al. The influence of roads on the fine-scale population genetic structure of the dengue vector *Aedes aegypti* (Linnaeus). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009139, 2021.

RITZ, C.; Strebig, J.C. Package “Drc”: Analysis of Dose-Response Curves. 2016. Acessado em 08 de agosto de 2023 em: <https://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf>

RITZ, Christian et al. Dose-response analysis using R. *PloS one*, v. 10, n. 12, p. e0146021, 2015.

RIVERA-PÉREZ, C.; CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G. How micronutrients influence the physiology of mosquitoes. **Current opinion in insect science**, v. 23, n., p. 112-117, 2017.

ROCHA, Marcele Neves et al. Pluripotency of Wolbachia against Arboviruses: the case of yellow fever. **Gates Open Research**, v. 3, 2019.

RODRIGUES, N. P.; BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 2, p. 105-115, 2013.

ROUSH, Richard; TABASHNIK, Bruce E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. Springer Science & Business Media, 1990.

RYAN, Sadie J. et al. Global expansion and redistribution of *Aedes*-borne virus transmission risk with climate change. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007213, 2019.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2007.

SANTOS, Daniele et al. Inhibition of *Aedes aegypti* DNA topoisomerase II by etoposide: Impact on survival and morphology of larvae and pupae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 247, p. 109066, 2021.

SARATHA, R.; MATHEW, N. Development of a mosquito attractant blend of small molecules against host-seeking *Aedes aegypti*. *Parasitology research*, v. 115, p. 1529-1536, 2016.

SARINO, Jun Noel C. et al. Classification of coffee bean degree of roast using image processing and neural network. **International Journal of Scientific and Technology Research**, v. 8, n. 10, p. 3231-33, 2019.

SARWAR, M. Typical flies: Natural history, lifestyle and diversity of Diptera. In: (Ed.). **Life Cycle and Development of Diptera**: IntechOpen, 2020,

SATHO, T. et al. Coffee and its waste repel gravid *Aedes albopictus* females and inhibit the development of their embryos. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 1-15, 2015.

SATHO, Tomomitsu et al. Coffee and its waste repel gravid *Aedes albopictus* females and inhibit the development of their embryos. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1-15, 2015.

SCAVO, N. A.; ZECCA, I. B.; SOBOTYK, C.; SALEH, M. N.; LANE, S. K.; OLSON, M. F.; HAMER, S. A.; VEROCAI, G. G.; HAMER, G. L. High prevalence of canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in pet dogs in south Texas, USA, with evidence of *Aedes aegypti* mosquitoes contributing to transmission. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 407, 2022.

SILVA, M. F. et al. Design and evaluation of non-conventional extraction for bioactive compounds recovery from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 177, p. 418-430, jan./2022.

SILVA, Juan J. et al. Fitness costs in the presence and absence of insecticide use explains abundance of two common *Aedes aegypti* kdr resistance alleles found in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 11, p. e0011741, 2023.

SILVÉRIO, Maíra Rosato Silveiral et al. Plant natural products for the control of *Aedes aegypti*: The main vector of important arboviruses. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3484, 2020.

SISTI, Laura et al. Durability of biopolymeric composites formulated with fillers from a by-product of coffee roasting. **Polymer Composites**, v. 43, n. 3, p. 1485-1493, 2022.

SLATKO, B. E.; TAYLOR, M. J.; FOSTER, J. M. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. **Symbiosis**, v. 51, n., p. 55-65, 2010.

SOARES, I. M. N.; POLONIO, J. C.; ZEQUI, J. A. C.; GOLIAS, H. C. Molecular techniques for the taxonomy of *Aedes Meigen, 1818* (Culicidae: Aedini): a review of studies from 2010 to 2021. **Acta Tropica**, v., n., p. 106694, 2022.

SOGHIGIAN, J.; ANDREADIS, T. G.; LIVDAHL, T. P. From ground pools to treeholes: convergent evolution of habitat and phenotype in *Aedes* mosquitoes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2017.

SONG, Byung-Hak et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of neuroimmunology**, v. 308, p. 50-64, 2017.

SOPER FL 1965. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 887–891.

SPENCE BEAULIEU, Meredith R.; REISKIND, Michael H. Comparative vector efficiency of two prevalent mosquito species for dog heartworm in North Carolina. **Journal of medical entomology**, v. 57, n. 2, p. 608-614, 2020.

STORK, N. E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? **Annual review of entomology**, v. 63, n., p. 31-45, 2018.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical research**, v. 21, p. 201-230, 2004.

SUWANMANEE, San et al. Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. **Acta tropica**, v. 188, p. 244-250, 2018.

TABACHNICK, W. J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14-26, 1991.

TANGTRAKULWANICH, K.; SUWANNAWONG, B.; NAKRUNG, P. The Comparative study of arabica used coffee grounds and temephos in controlling the *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Food Science and Agricultural Technology (JFAT)**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2022.

TARIQ, N. et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a stabilizing co-solvent for G-quadruplex DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 282, p. 106741, 2022.

TENNESSEN, J. M.; BERTAGNOLLI, N. M.; EVANS, J.; SIEBER, M. H.; COX, J.; THUMMEL, C. S. Coordinated metabolic transitions during *Drosophila* embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 5, p. 839-850, 2014.

THANASOPONKUL, W. et al. Spent Coffee Grounds and Novaluron Are Toxic to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. **Insects**, v. 14, n. 6, p. 564, 2023.

THOMPSON, Ryan; MARTIN DEL CAMPO, Jorge; CONSTENLA, Dagna. A review of the economic evidence of *Aedes*-borne arboviruses and *Aedes*-borne arboviral disease prevention and control strategies. **Expert review of vaccines**, v. 19, n. 2, p. 143-162, 2020.

TRAN, Hue T. M.; VARGAS, Carlos Alberto Cordero; SLADE LEE, L.; *et al.* Variation in bean morphology and biochemical composition measured in different genetic groups of arabica coffee (*Coffea arabica* L.). **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 3, 2017.

UEMURA, Nozomi et al. Concomitant knockdown resistance allele, L982W+ F1534C, in *Aedes aegypti* has the potential to impose fitness costs without selection pressure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 193, p. 105422, 2023.

- VAIRO, Francesco et al. Chikungunya: epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 4, p. 1003-1025, 2019.
- VALLE, Denise et al. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.
- VIANA, V. C. R. et al. Green Nanobioinsecticide of a Brazilian endemic plant for the *Aedes aegypti* control. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 32, p. 100992, 2023.
- VIANA-MEDEIROS, P. F. et al. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (*Aedes aegypti*) populations. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 4, p. 340-350, 2017.
- VILLAMIL-GÓMEZ, Wilmer E. et al. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 135-138, 2016.
- VOGEL, K. J.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. 5057-5062, 2015.
- WANG, Ran et al. Toxicity, baseline of susceptibility, detoxifying mechanism and sublethal effects of chlorogenic acid, a potential botanical insecticide, on *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1150853, 2023.
- WIGGINS, K.; EASTMOND, B.; ALTO, B. W. Transmission potential of Mayaro virus in Florida *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Medical and veterinary entomology**, v. 32, n. 4, p. 436-442, 2018.
- WILKERSON, R. C.; LINTON, Y.-M.; FONSECA, D. M.; SCHULTZ, T. R.; PRICE, D. C.; STRICKMAN, D. A. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133602, 2015.
- WINTGENS, Jean Nicolas et al. **Coffee: growing, processing, sustainable production. A guidebook for growers, processors, traders, and researchers.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- YURAYART, N.; KAEWTHAMASORN, M.; TIAWSIRISUP, S. Vector competence of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (Linnaeus) for *Plasmodium gallinaceum* infection and transmission. **Veterinary parasitology**, v. 241, n., p. 20-25, 2017.
- ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.
- ZHENG, Xiaoying et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. **Nature**, v. 572, n. 7767, p. 56-61, 2019.

ANEXO I

Termo de Responsabilidade de Adoção de Animais do Biotério Experimental da Universidade Federal de Lavras

1. Aceito a adoção do animal descrito abaixo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Concordo com a avaliação realizada pelo responsável de que o animal está com um bom estado de saúde. Entendo que podem existir problemas de saúde que não tenham sido identificados pelos responsáveis, ou pela minha inspeção ou que possam eventualmente surgir em que a UFLA e nem os responsáveis pelo Biotério não faz nenhuma garantia expressa ou implícita em relação à saúde ou ao temperamento do animal.
2. Aceito a responsabilidade pelo cuidado do animal descrito abaixo e farei o que estiver ao meu alcance para cuidar de maneira adequada para um animal de estimação desta espécie, seguindo as orientações dadas pelos responsáveis pelo Biotério.
3. O animal descrito abaixo será considerado como um animal de estimação para mim e minha família e não será vendido, doado, consumido como alimento para qualquer espécie ou como presa. Se o animal descrito abaixo precisar ser liberado dos meus cuidados, farei todos os esforços para garantir tutores responsáveis por ele. Estou ciente de que a UFLA não aceitará o animal, depois de ter saído de suas instalações.
4. Eu reconheço e aceito que:
 - 4.1 Abrigar e cuidar de qualquer animal de laboratório traz consigo certos riscos inerentes que não podem ser eliminados, independentemente dos cuidados tomados para evitar ferimentos.
 - 4.2 O animal tenha, ou pode ter sido, objeto de pesquisa.
 - 4.3 O comportamento animal é imprevisível e os animais podem ferir pessoas, outros animais ou propriedades.
 - 4.4 O animal pode carregar ou estar infectado com organismos, bactérias ou protozoários naturais de seu organismo, o que pode causar problemas em humanos.
 - 4.5 Não há como escrever uma lista completa de todos os possíveis riscos de possuir e cuidar de qualquer animal, incluindo este animal.
5. Ciente de todas essas informações, estou disposto a assumir todos os riscos de adotar e cuidar do animal, incluindo o risco de danos a terceiros. Assim, eu assumo a responsabilidade e concordo em indenizar a UFLA e seus curadores, executivos, funcionários e alunos, com relação a qualquer reivindicação, custos, responsabilidades ou despesas de qualquer tipo que possam surgir da minha adoção, posse ou controle do animal descrito abaixo.
6. Li e compreendi o que precede e assino voluntariamente este Termo de Responsabilidade de Adoção com pleno conhecimento do seu significado.

Espécie: _____ Linhagem: _____

Identificação/ cor: _____ Sexo: F () M () Idade: _____

_____ Peso: _____ Fonte do animal: _____

Histórico do Animal: _____

Informações médicas/comportamentais: _____

Adotante/Tutor

Nome completo: _____ Telefone: () _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Entregue por: _____ Data: __/__/__