

2026

Atividade larvicida e caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. contra *Aedes aegypti*

Costa, Poliana Caruline Rosa da

Universidade Estadual do Norte do Paraná

Costa, Poliana Caruline Rosa da Costa. Atividade larvicida e caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. contra *Aedes aegypti*. Orientador: Diego Resende Rodrigues. 2026. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Campus Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2026.

<https://repositorio.uenp.edu.br/handle/123456789/903>

Baixado de Repositório Institucional UENP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA (PPAGRO)

POLIANA CARULINE ROSA DA COSTA

ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Ruta graveolens* L. CONTRA *Aedes aegypti*

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2026

POLIANA CARULINE ROSA DA COSTA

ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Ruta graveolens* L. CONTRA *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Orientador: Prof. Dr. Diego Resende
Rodrigues

Coorientadora: Prof^ª Dra. Erika Cosendey de
Mello Peixoto

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2026

POLIANA CARULINE ROSA DA COSTA

ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Ruta graveolens* L. CONTRA *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Aprovada em: __/__/2026.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Resende Rodrigues
Profa. Dr. Yves Rafael Bovolenta
Prof. Dr. José Renato da Silva

UENP/CLM
UENP/CLM
UNIVERSIDADE PITÁGORAS
UNOPAR ANHANGUERA

Prof. Dr. Diego Resende Rodrigues
Orientador
Universidade Estadual do Norte do
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e amigos que com amor, coragem e exemplo me mostraram que a origem não define o destino. Àqueles que, como eu, acreditam na força do estudo, que esta dissertação seja prova de que a perseverança transforma vidas e abre caminhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pela força, pela sabedoria e por me sustentar ao longo de toda esta caminhada. Nos momentos de desafios e incertezas, Sua presença me concedeu coragem, fé e perseverança para seguir em frente e alcançar esta importante conquista. Agradeço, de coração, à minha família, meu porto seguro, que tornou possível cada passo desta jornada. À minha mãe, Silvana Rosa da Costa, e ao meu pai, Nilson Xavier da Costa, pelo amor incondicional e pelos exemplos de coragem e força que sempre me inspiraram. Aos meus irmãos, Nataly Rosa da Costa e Vinicius Rosa da Costa, pela cumplicidade, pelo apoio constante e por acreditarem em mim mesmo nos momentos mais desafiadores. Ao meu namorado, Wildemar Andrade Lima, por estar sempre ao meu lado, oferecendo apoio, carinho e incentivo ao longo dessa caminhada. De forma especial, agradeço ao meu orientador e grande amigo, Dr. Diego Resende Rodrigues, cuja generosidade, paciência e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sem sua orientação e acolhimento, esta conquista não seria possível. Aos integrantes do laboratório NESPAP, especialmente à Débora Ribeiro, cuja ajuda foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa. A todos que, de alguma forma, estiveram presentes nesta trajetória, deixo meu sincero agradecimento. Cada gesto de incentivo, cada palavra de apoio e cada demonstração de confiança contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

Epígrafe

Mantenha a fé na crença, se a ciência não curar, pois se não tem remédio, então remediado está. Já é um vencedor quem sabe a dor de uma derrota enfrentar. E a quem Deus prometeu, nunca faltou; na hora certa o bom Deus dará.

Sergio Miriti, *Clareou*.

COSTA, P. C. R. ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Ruta graveolens* L. CONTRA *Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2026.

RESUMO

O aumento dos casos de doenças transmitidas por mosquitos vetores e a resistência associada ao uso contínuo de inseticidas sintéticos reforçam a necessidade de alternativas eficazes e ambientalmente seguras. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade larvicida do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. contra larvas de *Aedes aegypti*, bem como caracterizar quimicamente o extrato. O extrato foi obtido por maceração em solução hidroetanólica a 70%, seguido de concentração e liofilização. Ovos de *A. aegypti* foram coletados por ovitrampas no município de Bandeirantes, Paraná, e as larvas foram criadas até os estágios L3 e L4. Os bioensaios larvicidas foram conduzidos em quadruplicata, com 40 larvas por tratamento, utilizando-se as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg/mL, além de controles positivo e negativo. Após 48 horas de exposição, observou-se mortalidade de 65% nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL, enquanto a concentração de 1 mg/mL promoveu 100% de mortalidade, resultado equivalente ao larvicida comercial. A análise fitoquímica indicou elevados teores de fenólicos totais ($58,76 \pm 1,70$ mg EAG/g) e flavonoides totais ($41,55 \pm 1,30$ mg EQ/g). A análise por LC-MS/MS confirmou a presença de rutina no extrato, não sendo detectada quercetina. Os resultados demonstram o elevado potencial larvicida do extrato hidroetanólico de *R. graveolens*, especialmente na concentração de 1 mg/mL, indicando sua viabilidade como alternativa no controle de *A. aegypti* e justificando estudos futuros para determinação de doses letais e avaliação toxicológica.

Palavras-chave: controle vetorial; extratos vegetais; larvicida botânico; metabólitos secundários; insetos vetores

COSTA, P. C. R. LARVICIDAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE HYDROETHANOLIC EXTRACT OF *Ruta graveolens* L. AGAINST *Aedes aegypti*. Master's Dissertation in Agronomy -State University of Northern Paraná, Luiz Meneghel Campus, Bandeirantes, 2026.

ABSTRACT

The increase in diseases transmitted by mosquito vectors and the resistance associated with the continuous use of synthetic insecticides highlight the need for effective and environmentally safe alternatives. Therefore, this study aimed to evaluate the larvicidal activity of the hydroethanolic extract of *Ruta graveolens* L. against *Aedes aegypti* larvae, as well as to chemically characterize the extract. The extract was obtained by maceration in a 70% hydroethanolic solution, followed by concentration and lyophilization. *A. aegypti* eggs were collected using ovitraps in the municipality of Bandeirantes, Paraná, Brazil, and the larvae were reared to the L3 and L4 stages. Larvicidal bioassays were performed in quadruplicate, with 40 larvae per treatment, using concentrations of 0.25, 0.5, and 1 mg/mL, along with positive and negative controls. After 48 hours of exposure, mortality rates of 65% were observed at concentrations of 0.25 and 0.5 mg/mL, whereas the concentration of 1 mg/mL resulted in 100% mortality, a result equivalent to the commercial larvicide used as positive control. Phytochemical analysis revealed high levels of total phenolics (58.76 ± 1.70 mg GAE/g) and total flavonoids (41.55 ± 1.30 mg QE/g). LC-MS/MS analysis confirmed the presence of rutin in the extract, while quercetin was not detected. These results demonstrate the strong larvicidal potential of the hydroethanolic extract of *R. graveolens*, particularly at the concentration of 1 mg/mL, indicating its viability as an alternative for *A. aegypti* control and supporting further studies to determine lethal doses and assess toxicological safety.

Keywords: vector control; plant extracts; botanical larvicide; secondary metabolites; insect vectors.

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
1.1. Espécie <i>Aedes aegypti</i>	19
1.2. Controle Tradicional do Vetor	21
1.3. Inseticidas Naturais	23
1.4. <i>Ruta graveolens</i> L.....	25
1.5. Características botânicas da <i>Ruta graveolens</i>	27
1.6. Formas usuais e terapêutica da <i>Ruta graveolens</i> pela população	27
1.7. Principais constituintes químicos presentes na espécie <i>Ruta graveolens</i>	29
2. REFERÊNCIAS	31
Capítulo 1: ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE <i>Ruta Graveolens</i> L. CONTRA <i>Aedes aegypti</i>	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Caracterização do experimento	37
2.2. Obtenção do extrato hidroetanólico de <i>Ruta graveolens</i> L.....	37
2.3. Coleta, eclosão e criação de <i>Aedes aegypti</i>	39
2.4. Ensaio de atividade larvicida	40
2.5. Prospecção fotoquímica preliminar	41
2.6. Determinação de compostos fenólicos totais.....	41
2.7. Determinação de flavonoides totais.....	42
2.8. Análise estatística	42
3. RESULTADOS	43
3.1. Atividade larvicida do extrato hidroetanólico de <i>Ruta graveolens</i> L. contra <i>Aedes aegypti</i>	43
3.2. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais do extrato hidroetanólico de <i>Ruta graveolens</i> L.....	45
3.3. Identificação de compostos químicos por LC-MS/MS.....	46
4. DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS	49
ANEXO I - Identificação de rutina e quercetina em extrato hidroalcoólico de arruda a 10%.....	51
ANEXO II – Normas da Revista International Journal of Tropical Insect Science	58

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo Biológico do <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: tuasaude.com.....	21
Figura 2. Obtenção do extrato hidroetanólico de <i>Ruta graveolens</i> L. Fonte: BioRender	38
Figura 3. Coleta, eclosão e criação de <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: BioRender	40
Figura 4. Ensaio de atividade larvicida. Fonte: BioRender	41
Figura 5. Perfil esquemático da Análise de Dados. Fonte: BioRender	42
Figura 6. Índice percentual de mortalidade larval após 24 horas de tratamento com EHERg nas diluições de 0,25 mg/mL (T1), 0,5 mg/mL (T2) e 1 mg/mL (T3), comparados aos controles Positivo (CP) e Negativo (CN).	44

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Espécie *Aedes aegypti*

A espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito pertencente à família Culicidae, amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo, com elevada adaptação aos ambientes urbanos e forte associação com áreas antropizadas (World Health Organization, 2023).

No Brasil, essa espécie destaca-se como o principal vetor de arboviroses de relevância em saúde pública, sendo responsável pela transmissão dos vírus da Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana, enfermidades que representam desafios persistentes aos sistemas de vigilância epidemiológica e assistência à saúde (BRASIL, 2019).

A estreita relação do *A. aegypti* com o ambiente urbano está diretamente associada às suas características ecológicas e comportamentais, uma vez que a espécie apresenta preferência por criadouros artificiais contendo água parada, comumente encontrados em domicílios e áreas peridomiciliares (Maciel-de-Freitas et al., 2007). Entre os principais locais utilizados para oviposição e desenvolvimento das formas imaturas destacam-se caixas d'água, pneus, garrafas, vasos de plantas e recipientes descartáveis, o que favorece a proximidade constante com a população humana e aumenta a eficiência da transmissão viral (Vezzani, 2007).

O ciclo de vida do *A. aegypti* é holometábolo e compreende quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adultos, sendo fortemente influenciado por fatores ambientais como temperatura, umidade e disponibilidade de alimento (Rezende et al., 2008)). Os ovos apresentam elevada resistência à dessecação, podendo permanecer viáveis por vários meses em ambientes secos, característica que contribui para a persistência da espécie mesmo em períodos de estiagem (Rezende et al., 2008).

Após a imersão em água, ocorre a eclosão das larvas, que passam por quatro instares larvais (L1 a L4) antes de atingirem a fase pupal, culminando na emergência do mosquito adulto (Consoli; Oliveira, 1994). Em condições ambientais favoráveis, como temperaturas elevadas e disponibilidade de matéria orgânica, o ciclo completo do *A. aegypti* pode ser concluído em um período inferior a dez dias, favorecendo rápidas elevações populacionais e dificultando o controle do vetor (Consoli; Oliveira, 1994).

Os adultos apresentam hábito predominantemente diurno, com maior atividade hematofágica nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, o que aumenta o risco de transmissão viral em ambientes domésticos e coletivos (World Health Organization, 2025). As

fêmeas do *A. aegypti* necessitam do repasto sanguíneo para o desenvolvimento dos ovos e são as únicas responsáveis pela transmissão dos vírus aos hospedeiros vertebrados, realizando frequentemente múltiplas picadas em diferentes indivíduos durante um único ciclo gonotrófico (Consoli; Oliveira, 1994). Esse comportamento aumenta significativamente a competência vetorial da espécie e favorece a disseminação rápida das arboviroses em áreas densamente povoadas (Consoli; Oliveira, 1994)

No contexto epidemiológico brasileiro, as doenças transmitidas pelo *A. aegypti* configuram um grave problema de saúde pública, com elevados números de casos e óbitos registrados anualmente em diferentes regiões do país (Brasil, 2023). No estado do Paraná, os boletins epidemiológicos recentes evidenciaram impacto expressivo da dengue, com centenas de milhares de casos confirmados e elevado número de óbitos no ciclo epidemiológico de 2023–2024 (Brasil, 2023).

Apesar da redução significativa de casos e mortes observada no início do ciclo epidemiológico de 2024-2025, especialmente para a dengue, foi registrado aumento expressivo nos casos prováveis de Chikungunya, evidenciando a dinâmica variável da circulação viral e a persistência do risco sanitário associado à presença do vetor (World Health Organization, 2023). A baixa ou ausência de registros recentes de zika não elimina a possibilidade de reemergência da doença, considerando a ampla distribuição do *A. aegypti* no território nacional (Kraemer et al., 2015)

Dessa forma, o controle do *Aedes aegypti* permanece como elemento central das políticas públicas de prevenção das arboviroses, sendo a eliminação de criadouros considerada a estratégia mais eficaz para interromper o ciclo de vida do mosquito (Brasil, 2019). Conforme as diretrizes do Programa Nacional de Controle da Dengue, as ações de controle devem integrar medidas ambientais, químicas e educativas, associadas ao monitoramento entomológico e à participação ativa da comunidade (Brasil, 2019)

Além das estratégias tradicionais, novas tecnologias vêm sendo incorporadas ao manejo do vetor, como o uso da bactéria *Wolbachia*, a borrifação residual intradomiciliar e a utilização de armadilhas para monitoramento populacional, reforçando a necessidade de abordagens integradas e sustentáveis no controle do *A. aegypti* (Lowe et al., 2018).

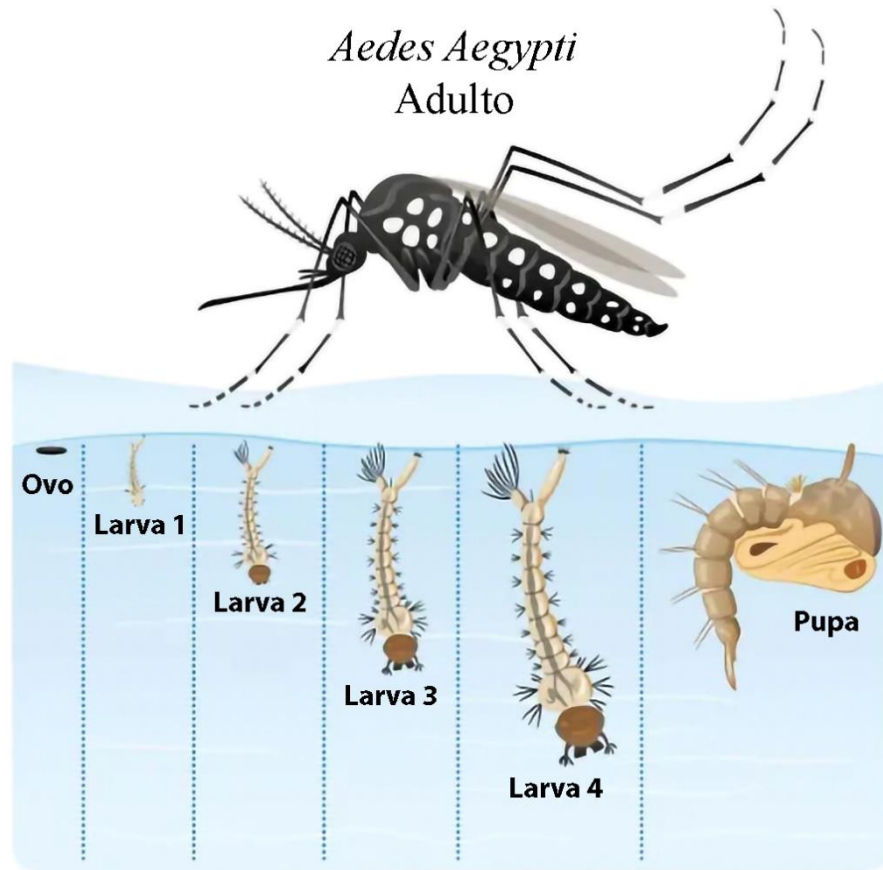


Figura 1: Ciclo Biológico do *Aedes aegypti*. Fonte: tuasaude.com

1.2. Controle Tradicional do Vetor

O controle do *Aedes aegypti* historicamente baseia-se na combinação de estratégias ambientais, químicas e biológicas, as quais podem ser aplicadas de forma isolada ou integrada, dependendo das condições locais e do estágio de infestação do vetor (Zara et al., 2016; Braga; Valle, 2007). A integração dessas abordagens é considerada fundamental, uma vez que o ciclo de vida do mosquito apresenta múltiplos estágios vulneráveis a diferentes métodos de intervenção (Zara et al., 2016).

O controle ambiental constitui a base das ações preventivas e está diretamente relacionado à modificação ou eliminação de criadouros artificiais utilizados para a oviposição e o desenvolvimento das formas imaturas do mosquito (WHO, 2012). Essa estratégia envolve práticas como a correta destinação de resíduos sólidos, vedação adequada de reservatórios de água, eliminação de recipientes descartáveis e mudanças comportamentais da população, visando reduzir o contato entre o vetor e o ser humano (Krystosik et al., 2017).

Problemas relacionados ao abastecimento irregular de água contribuem significativamente para o aumento do risco de infestação por *A. aegypti*, uma vez que favorecem o armazenamento inadequado de água em recipientes improvisados, os quais se tornam

potenciais criadouros larvais (Caprara et al., 2009). Estudos apontam que áreas urbanas com maior frequência de escassez hídrica apresentam maior incidência de dengue e outras arboviroses, evidenciando a relação direta entre infraestrutura urbana deficiente e proliferação do vetor (Lowe et al., 2012).

A gestão inadequada de resíduos sólidos também exerce papel relevante na dinâmica de transmissão das arboviroses, pois o acúmulo de lixo em ambientes urbanos cria condições favoráveis para o desenvolvimento de criadouros e abrigo para mosquitos adultos (Vezzani; Carbajo, 2008). Além de aumentar o risco de dengue, a má administração de resíduos está associada à proliferação de outros vetores e reservatórios de doenças, reforçando a importância do saneamento básico como medida de saúde pública (WHO, 2019).

O controle químico representa uma das estratégias mais utilizadas no Brasil para a redução rápida das populações de *A. aegypti*, especialmente em situações de surtos e epidemias (Brasil, 2019). Essa abordagem envolve o uso de larvicidas e inseticidas sintéticos, aplicados de acordo com o estágio de desenvolvimento do mosquito e as características do ambiente (Braga; Valle, 2007)

No tratamento focal, os larvicidas são aplicados diretamente em recipientes que contenham água parada e formas imaturas do mosquito, sendo essa estratégia indicada quando a eliminação mecânica dos criadouros não é possível (Brasil, 2019). Já o tratamento perifocal consiste na aplicação manual de inseticidas em superfícies próximas aos criadouros, com o objetivo de eliminar mosquitos adultos que utilizam esses locais para repouso ou oviposição (Funasa, 2001).

Em situações de transmissão intensa ou epidemias, pode ser adotado o tratamento químico por ultrabaixo volume (UBV), conhecido popularmente como “fumacê”, no qual inseticidas são dispersos no ambiente por meio de equipamentos acoplados a veículos automotivos ou portáteis (Brasil, 2019). Essa técnica tem como alvo principal os mosquitos adultos em voo, promovendo redução temporária da população vetorial (WHO, 2012).

Apesar de amplamente utilizada, a estratégia de UBV apresenta limitações importantes, uma vez que estudos indicam que essa técnica é capaz de eliminar apenas uma fração da população adulta, estimada em cerca de 20%, além de ser altamente dependente de condições climáticas favoráveis, como ausência de ventos fortes e chuvas (ESU et al., 2010; WHO, 2012). Adicionalmente, a aplicação requer mão de obra especializada e não atua diretamente sobre ovos e larvas, o que compromete sua eficácia a longo prazo (Braga; Valle, 2007).

Cada método químico apresenta restrições específicas, como a impossibilidade de uso de larvicidas em recipientes destinados ao consumo humano ou em ambientes com presença de

organismos aquáticos não-alvo, como peixes e anfíbios (WHO, 2011). Essas limitações operacionais reforçam a necessidade de uso criterioso e tecnicamente orientado dos produtos químicos no controle vetorial (Braga; Valle, 2007)

Além das limitações operacionais, o uso contínuo de inseticidas sintéticos tem sido associado ao desenvolvimento de resistência nas populações de *A. aegypti*, reduzindo progressivamente a eficácia das substâncias utilizadas (Valle; Belinato; Martins, 2015). A resistência ocorre em função da seleção de indivíduos com mecanismos bioquímicos e fisiológicos capazes de neutralizar ou tolerar os compostos químicos aplicados (Hemingway; Ranson, 2000).

Outro aspecto relevante refere-se aos impactos ambientais e à saúde humana decorrentes da exposição aos inseticidas, uma vez que estudos demonstram efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo, incluindo insetos benéficos, aves, mamíferos e o próprio ser humano (WHO, 2010). Esses efeitos incluem alterações neurológicas, distúrbios endócrinos e contaminação de solos e corpos d'água, comprometendo a sustentabilidade das ações de controle químico (Brasil, 2019).

Diante dessas limitações, torna-se evidente que o controle químico isolado não é suficiente para erradicar o *Aedes aegypti*, sendo necessária a adoção de estratégias integradas e complementares (Who, 2012). A experiência dos programas nacionais de combate à dengue demonstra que a combinação de ações ambientais, educativas, químicas e biológicas é mais eficaz para a redução sustentada das populações vetoriais (Zara et al., 2016)

Nesse contexto, cresce o interesse por métodos alternativos de controle, como o uso de agentes biológicos e substâncias naturais, que apresentam menor impacto ambiental e menor risco de seleção de resistência, reforçando a importância do desenvolvimento de pesquisas voltadas à busca por novas estratégias sustentáveis de controle do vetor (Benelli; Mehlhorn, 2016).

1.3. Inseticidas Naturais

O uso intensivo de inseticidas sintéticos no controle do *Aedes aegypti* tem sido a principal estratégia adotada em programas de saúde pública no Brasil, especialmente diante do aumento expressivo de casos de arboviroses em áreas urbanas (Brasil, 2019). No entanto, evidências científicas demonstram que a aplicação contínua desses compostos químicos tem provocado impactos negativos ao meio ambiente, à saúde humana e à eficácia das ações de controle vetorial (Braga; Valle, 2007).

Os principais grupos de inseticidas sintéticos utilizados no combate ao *A. aegypti*, como

organofosforados, carbamatos e piretroides, atuam sobre o sistema nervoso dos insetos, promovendo paralisia e morte (Valle; Belinato; Martins, 2015). Embora apresentem efeito rápido, esses compostos possuem elevada toxicidade e podem afetar organismos não- alvo, incluindo insetos benéficos, aves, peixes e mamíferos, além de favorecer a contaminação de solos e corpos d'água (WHO, 2010)

Outro problema associado ao uso recorrente de inseticidas sintéticos refere-se ao desenvolvimento de resistência nas populações de *A. aegypti*, fenômeno amplamente documentado em diferentes regiões do Brasil (Valle; Belinato; Martins, 2015). A resistência ocorre como resultado da pressão seletiva exercida pelos produtos químicos, favorecendo a sobrevivência e reprodução de indivíduos geneticamente mais tolerantes aos inseticidas utilizados (Hemingway; Ranson, 2000).

Diante desse cenário, a busca por alternativas sustentáveis e ambientalmente seguras tem se intensificado, com destaque para o uso de inseticidas naturais obtidos a partir de fontes vegetais (Isman, 2006). Substâncias de origem vegetal vêm sendo amplamente investigadas devido à sua diversidade química, biodegradabilidade e menor toxicidade quando comparadas aos inseticidas sintéticos convencionais (Pavela, 2016).

Os inseticidas naturais derivados de plantas são compostos principalmente por metabólitos secundários, moléculas produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa contra herbívoros, insetos e microrganismos (Isman, 2006). Entre os principais grupos de metabólitos com atividade inseticida destacam-se alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos, saponinas e compostos fenólicos, os quais podem atuar de diferentes formas sobre os insetos-alvo (Pavela, 2016).

Esses compostos podem exercer efeito tóxico direto, interferir no sistema nervoso, inibir enzimas digestivas, provocar alterações hormonais ou atuar como repelentes, anti-alimentares e inibidores do desenvolvimento larval (Isman, 2006; Pavela, 2016). A diversidade de mecanismos de ação reduz a probabilidade de desenvolvimento rápido de resistência, tornando os inseticidas naturais uma alternativa promissora no controle do *A. aegypti* (Pavela, 2016).

Diversos estudos demonstram que extratos vegetais brutos, frações e óleos essenciais apresentam atividade larvicida significativa contra larvas de *A. aegypti*, especialmente nos estágios larvais mais avançados, como L3 e L4, considerados ideais para ensaios de toxicidade (Pavela, 2015). A escolha do estágio larval é relevante, pois permite avaliar a eficácia dos compostos em fases mais resistentes do ciclo de vida do mosquito (WHO, 2005).

Além da atividade larvicida, os inseticidas naturais apresentam vantagens adicionais, como rápida degradação no ambiente, menor persistência residual e redução dos impactos

ecotoxicológicos, características fundamentais para estratégias de controle integradas e sustentáveis (Pavela, 2016). Essas propriedades tornam os produtos de origem vegetal compatíveis com programas de manejo integrado de vetores, especialmente em áreas urbanas densamente povoadas (WHO, 2012).

Nesse contexto, a prospecção de plantas medicinais com potencial inseticida assume papel estratégico no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle do *Aedes aegypti* (Isman, 2006; Pavela, 2016). Espécies vegetais tradicionalmente utilizadas na medicina popular vêm sendo investigadas quanto à sua composição fotoquímica e aos seus efeitos biológicos, contribuindo para a valorização do conhecimento tradicional aliado à ciência moderna (Pavela, 2016).

Assim, o estudo de extratos vegetais com atividade larvicida representa uma alternativa promissora frente às limitações do controle químico convencional, reforçando a importância de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de produtos naturais eficazes, seguros e ambientalmente sustentáveis para o controle de vetores de arboviroses (Pavela, 2015; Isman, 2006).

1.4. *Ruta graveolens* L.

Ruta graveolens L., popularmente conhecida como arruda, é uma espécie pertencente à família Rutaceae, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, sendo cultivada em diversas regiões do Brasil tanto para fins ornamentais quanto medicinais (Lorenzi; Matos, 2008). Trata-se de um subarbusto perene, aromático, que pode atingir até 1,5 m de altura, apresentando caule lenhoso na base e ramos superiores herbáceos, cilíndricos e glabros (Lorenzi; Matos, 2008).

As folhas de *R. graveolens* possuem coloração verde-azulada, são compostas, alternas e altamente aromáticas devido à presença de glândulas secretoras de óleos essenciais, característica marcante da espécie (Baser; Buchbauer, 2010). As flores são pequenas, de coloração amarela, dispostas em inflorescências do tipo corimbo, enquanto os frutos são cápsulas contendo sementes pequenas e escuras (Lorenzi; Matos, 2008).

Historicamente, a arruda é amplamente utilizada na medicina popular, sendo associada a práticas culturais e religiosas, além de aplicações terapêuticas para o tratamento de diversas afecções, como distúrbios menstruais, inflamações, dores musculares, cólicas e problemas digestivos (Lorenzi; Matos, 2008). O uso tradicional da espécie despertou interesse científico, motivando estudos farmacológicos e fotoquímicos voltados à identificação de seus compostos bioativos e atividades biológicas.

Estudos farmacológicos demonstraram que *R. graveolens* apresenta ampla gama de

atividades biológicas, incluindo ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, anti-helmíntica, espasmolítica e inseticida, atribuídas principalmente à diversidade de metabólitos secundários presentes na planta (Isman, 2006). Esses metabólitos atuam como mecanismos de defesa natural da planta contra herbívoros e insetos, o que reforça seu potencial no controle de vetores (Isman, 2006).

A composição química da arruda é caracterizada pela presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas, furanocumarinas, taninos e óleos essenciais, os quais variam conforme fatores como parte da planta utilizada, método de extração, condições climáticas e estágio de desenvolvimento vegetal (Baser; Buchbauer, 2010). Entre os compostos voláteis mais frequentemente identificados no óleo essencial destacam-se a undecanona, a metilnonilcetona e a metilheptilcetona, substâncias associadas a efeitos biológicos relevantes (Baser; Buchbauer, 2010).

Esses compostos apresentam propriedades neurotóxicas e repelentes para insetos, podendo interferir no sistema nervoso, no comportamento alimentar e no desenvolvimento das formas imaturas, o que justifica o interesse na avaliação do potencial larvicida de extratos e óleos essenciais de *R. graveolens* (Isman, 2006; Pavela, 2015). Estudos relatam que extratos brutos e frações obtidas da arruda apresentam efeito significativo sobre larvas de *Aedes aegypti*, especialmente em concentrações moderadas a elevadas (Pavela, 2015).

A atividade larvicida atribuída à *R. graveolens* está relacionada à ação sinérgica entre diferentes metabólitos secundários, os quais podem atuar provocando alterações fisiológicas, inibição enzimática, desorganização celular e comprometimento do desenvolvimento larval (Isman, 2006; Pavela, 2016). Essa diversidade de mecanismos de ação reduz a probabilidade de seleção rápida de resistência, tornando os extratos vegetais alternativas promissoras frente aos inseticidas sintéticos convencionais (Pavela, 2016).

Além do potencial inseticida, a arruda apresenta importância no contexto da sustentabilidade ambiental, uma vez que seus compostos são biodegradáveis e apresentam menor persistência residual no ambiente, reduzindo riscos de contaminação ambiental e efeitos adversos sobre organismos não-alvo (Pavela, 2016). Essas características tornam *R. graveolens* uma espécie relevante para estudos voltados ao desenvolvimento de produtos naturais aplicáveis ao manejo integrado de vetores (WHO, 2012).

Dessa forma, a investigação da atividade larvicida e da composição fotoquímica de extratos de *Ruta graveolens* L. contribui para o avanço do conhecimento científico acerca do uso de plantas medicinais no controle do *Aedes aegypti*, além de reforçar a busca por alternativas eficazes, seguras e ambientalmente sustentáveis no enfrentamento das arboviroses (Isman,

2006).

1.5. Características botânicas da *Ruta graveolens*

A espécie *Ruta graveolens* é conhecida popularmente por diferentes denominações, como arruda, arruda-fedorenta, arruda-doméstica, arruda-dos-jardins, ruta-de-cheiro-forte, arruda-fedida e ruda. A arruda pertence à classe Magnoliopsida, ordem Sapindales e família Rutaceae, a mesma família de espécies cítricas como a lima (*Citrus aurantifolia*), o limão (*Citrus limon*) e a toranja (*Citrus paradisi*) (Lorenzi; Matos, 2008; Baser; Buchbauer, 2010).

A arruda é uma planta perene capaz de se desenvolver em diferentes tipos de solo, apresentando boa adaptação a climas temperado, tropical e subtropical. É originária da região do Mediterrâneo, porém foi amplamente disseminada, sendo encontrada atualmente em diversas regiões do mundo, como África, Europa, América, Ásia (China, Japão e Índia) e Austrália (Lorenzi; Matos, 2008; Pavela, 2016).

Trata-se de um arbusto perenifólio, com numerosos caules de aproximadamente 60 cm, bastante ramificados e finos. Suas folhas possuem comprimento entre 12 mm e 15 mm, são alternadas, com pecíolos longos e bastante divididas; as folhas superiores são pinadas, de contorno triangular, coloração verde-azulada, obtuso-crenadas e subcoriáceas, com folíolos oblongos e terminais mais alargados. Suas flores são amarelas, organizadas em corimbos terminais, dispostas sobre pedúnculos ramificados (Farmacopeia Brasileira, 2011). O caule é delgado, liso e de coloração verde, podendo atingir até cerca de um metro de altura, e seus frutos são secos, rígidos e arredondados, apresentando de quatro a cinco lóbulos pouco proeminentes na região superior.

Em todas as partes da planta podem ser observados pontos translúcidos, sendo as folhas recobertas por pequenas glândulas que armazenam óleo essencial de odor balsâmico característico, com aroma intenso e desagradável, além de sabor amargo e consistência espessa (Farmacopeia Brasileira, 2011).

1.6. Formas usuais e terapêutica da *Ruta graveolens* pela população

A *Ruta graveolens* é utilizada há séculos em função de suas propriedades terapêuticas; entretanto, na Grécia Antiga também possuía forte associação simbólica, sendo empregada como proteção contra “forças do mal”. Em Roma, havia o costume de mulheres carregarem ramos da planta com a finalidade de afastar influências negativas. Durante a Idade Média, seus ramos eram utilizados como forma de proteção contra feitiçarias, sendo também empregados

em cerimônias religiosas para aspergir água benta sobre os fiéis (Lorenzi; Matos, 2008).

A arruda é considerada popularmente uma erva de caráter “místico”, pois além do uso medicinal, está presente em práticas culturais e crenças populares desde a antiguidade, sendo utilizada em rituais de proteção, principalmente em crianças, contra o chamado mau-olhado (Lorenzi; Matos, 2008; Almeida, 2011). Também é empregada em práticas religiosas como catimbó, pajelanças e umbanda, sendo utilizada em incensos, defumações, banhos ritualísticos e práticas de purificação espiritual (Almeida, 2011). A planta também é frequentemente utilizada em preparações populares conhecidas como “garrafadas”, nas quais é associada a outras espécies vegetais e macerada em bebidas alcoólicas como vinho ou cachaça.

Essas preparações são tradicionalmente utilizadas no pós-parto, em rituais de boas-vindas a recém-nascidos e, em alguns casos, para estimular a menstruação, podendo estar associadas a práticas abortivas (Almeida, 2011). Na gastronomia, a arruda é empregada devido ao seu aroma característico e sabor amargo, sendo utilizada principalmente para aromatizar carnes, ovos e bebidas alcoólicas tradicionais em países como Itália e Croácia (Mancuso et al., 2015). Em regiões do Mediterrâneo, suas folhas são utilizadas como tempero em diversos pratos, enquanto na Etiópia são adicionadas ao café para conferir sabor. Também pode ser utilizada como aperitivo em bebidas alcoólicas devido ao seu gosto marcante (Perera; Karunaratne; Chinthaka, 2020).

Os extratos e o óleo essencial de *Ruta graveolens* também apresentam aplicações agrícolas, sendo utilizados na proteção de culturas devido às suas propriedades fungicidas, fitotóxicas e repelentes. Compostos presentes no óleo essencial, como a 2-undecanona, apresentam atividade repelente contra diversos insetos, além de ação sobre outros organismos (Mancuso et al., 2015). Na medicina popular, a arruda é indicada para o tratamento de diversas condições, incluindo insônia, ansiedade, cefaleia, nervosismo, cólicas abdominais, distúrbios renais, inflamações cutâneas, dores em geral, doenças reumáticas, alterações menstruais, entre outras. Também é descrita como anticoncepcional, vermífuga e emenagoga (Almeida, 2011).

A planta pode ser administrada de diferentes formas, como fresca, em infusão, decocção, pó, óleo, maceração, sumo, uso tópico ou em banhos medicinais (Rodrigues; Andrade, 2014; Messias et al., 2015). Em diferentes regiões do mundo, há variações no uso tradicional: na África do Sul é utilizada para alívio de dores; na Índia para tratamento de asma, icterícia e distúrbios intestinais; e no Sri Lanka para tratamento de picadas de escorpião (Perera; Karunaratne; Chinthaka, 2020). Estudos etnobotânicos realizados no Brasil demonstram o uso da arruda em diferentes comunidades, sendo indicada para tratamento de dores, cólicas, inflamações, verminoses, problemas menstruais e afecções da pele, além de seu uso em práticas

culturais e rituais populares (Messias et al., 2015; Vásquez; Mendonça; Noda, 2014).

1.7. Principais constituintes químicos presentes na espécie *Ruta graveolens*

A constituição química da *Ruta graveolens* pode variar conforme as condições ambientais e a variabilidade genética. Seus compostos podem ser obtidos por diferentes métodos, sendo os mais comuns os extratos aquosos ou orgânicos, pó in natura e óleo essencial (Pavela, 2016; Baser; Buchbauer, 2010). A maior concentração de princípios ativos da arruda encontra-se nas folhas e caules antes do período de floração, embora todas as partes da planta possam ser utilizadas, incluindo raízes, caules, folhas, flores e frutos (Lorenzi; Matos, 2008).

Diversas técnicas são utilizadas para obtenção de derivados vegetais, como hidrodestilação em aparelho de Clevenger, maceração (convencional ou assistida), percolação, arraste a vapor, extração em Soxhlet, destilação simples e infusão (Baser; Buchbauer, 2010). Para a obtenção do óleo essencial, destaca-se a hidrodestilação, amplamente utilizada em pesquisas laboratoriais, empregando principalmente folhas e caules frescos como matéria-prima (Baser; Buchbauer, 2010). Os metabólitos secundários da arruda despertam interesse na área da química medicinal, uma vez que a interação entre esses compostos está associada a uma ampla gama de atividades biológicas. A planta apresenta mais de uma centena de compostos, com destaque para alcaloides, flavonoides, triterpenos, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas e óleos essenciais (Pavela, 2016).

Estudos fitoquímicos demonstram o isolamento, a partir de diferentes partes da planta, de metabólitos como rutina, rutamarina, furanocumarinas, alcaloides quinolínicos, dicumarinas e cetonas de cadeia longa, geralmente obtidos por extração com solventes e técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Mancuso et al., 2015). O óleo essencial pode ser obtido por destilação a vapor e utilizado em ensaios biológicos, frequentemente sem necessidade de purificação adicional (Mancuso et al., 2015).

Análises químicas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas evidenciam a presença de compostos da classe das metilcetonas e monoterpênicos, como 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona e 2-dodecanona, além de ésteres como acetato de octila e outros derivados (Baser; Buchbauer, 2010). Compostos como 2-nonanona e 2-undecanona apresentam atividades farmacológicas relevantes, incluindo ação bactericida, fungicida, antioxidante, inseticida e repelente, além de efeitos sobre o sistema nervoso central (Isman, 2006). As cumarinas constituem uma importante classe de metabólitos da arruda, incluindo substâncias como bergapteno, psoraleno, xantotoxina e isopimpinellina, sendo utilizadas em aplicações terapêuticas devido às suas propriedades fotoreativas, especialmente no tratamento

de doenças dermatológicas (Pavela, 2016).

Os alcaloides e flavonoides também estão amplamente presentes na composição da planta. Os alcaloides incluem compostos dos grupos furoquinolínicos e acridônicos, enquanto os flavonoides são representados principalmente pela rutina, além de substâncias como kaempferol e isoramnetina, que contribuem para a coloração das flores. Entre os flavonoides, destacam-se a rutina e a quercetina, compostos associados a diversas atividades farmacológicas, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e potencial antitumoral (Panche; Diwan; Chandra, 2016). A rutina apresenta ainda propriedades citoprotetoras, neuroprotetoras, cardioprotetoras e hepatoprotetoras, enquanto a quercetina está relacionada a efeitos analgésicos, antivirais, antialérgicos e larvicidas (Panche; Diwan; Chandra, 2016).

2. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. Z. *Plantas medicinais*. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br>. ISBN 978- 85-232-1216-2.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (org.). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420063165>

BENELLI, G.; MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitology Research*, v. 115, p. 1747–1754, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4971-z>

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007. DOI: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia>

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). *Manual de normas técnicas: instruções para pessoal de combate ao vetor – dengue*. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia de vigilância em saúde: volume único*. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_4ed.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. *Boletins epidemiológicos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos>

BRASIL. Ministério da Saúde. *Dengue: sintomas, transmissão e prevenção*. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue>

CAPRARA, A. et al. Irregular water supply, household usage and dengue: a bio-social study in the Brazilian Northeast. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, supl. 1, p. S125–S136, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300012>

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/th/pdf/consoli-8585676035.pdf>. ISBN 85-85676-03-5.

ESU, E. et al. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission. *Tropical Medicine & International Health*, v. 15, n. 5, p. 619–631, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02489.x>

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, v. 45, p. 371–391, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents. *Annual Review of Entomology*, v. 51, p. 45–66, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of arbovirus vectors. *eLife*, v. 4, e08347, 2015. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>

KRYSTOSIK, A. et al. Community context and sub-neighborhood scale detail to explain dengue, chikungunya and Zika patterns in Cali, Colombia. *PLoS One*, v. 12, n. 8, e0181208, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181208>

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LOWE, R. et al. Nonlinear and delayed impacts of climate on dengue risk in Brazil. *Nature Communications*, v. 9, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002613>

LOWE, R. et al. The development of an early warning system for climate-sensitive disease risk with a focus on dengue epidemics in Southeast Brazil. *Statistics in Medicine*, v. 32, n. 5, p. 864–883, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/sim.5549>

MACIEL-DE-FREITAS, R.; CODEÇO, C. T.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Daily survival and dispersal of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 76, n. 4, p. 659–665, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.659>

MANCUSO, S. et al. Phytochemicals from *Ruta graveolens* Activate TAS2R Bitter Taste Receptors and TRP Channels Involved in Gustation and Nociception. *Molecules*, v. 20, p. 18907–18922, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules201018907>

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 1, p. 76–104, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_139

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, v. 5, e47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

PAVELA, R. Essential oils for eco-friendly mosquito larvicides. *Industrial Crops and Products*, v. 76, p. 174–187, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>

PAVELA, R. Botanical insecticides: review. *Plant Protection Science*, v. 52, p. 229–241, 2016. DOI: <https://doi.org/10.17221/31/2016-PPS>

PERERA, P.; KARUNARATNE, S.; CHINTHAKA, S. Utilization of *Ruta graveolens* and *Azadirachta indica* leaf powders and their binary combinations for the management of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in stored maize in Sri Lanka. *Current Scientia*, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.31357/vjs.v20i1.3360>.

REZENDE, G. L. et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*. *BMC Developmental Biology*, v. 8, p. 82, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-82>

RODRIGUES, E.; ANDRADE, L. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de*

Plantas Mediciniais, v. 16, n. 3, p. 721–730, 2014. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084x/08_159

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 44, n. 4, p. 457–472, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201400423>

VALLE, D.; BELINATO, T. A.; MARTINS, A. J. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015. p. 93-126. DOI: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000400019>

VEZZANI, D. Artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: a perfect match. *Tropical Medicine & International Health*, v. 12, n. 12, p. 1507–1515, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01781.x>

VEZZANI, D.; CARBAJO, A. E. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 1, p. 66–74, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking-water quality*. 4. ed. Geneva: WHO, 2011. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Handbook for integrated vector management*. Geneva: WHO, 2012. Disponível em: <https://www.ivcc.com/wp-content/uploads/2019/07/Handbook-for-Integrated-Vector-Management.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue and severe dengue*. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>

Capítulo 1

ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Ruta Graveolens* L. CONTRA *Aedes aegypti*

Artigo a ser submetido à Revista International Journal of Tropical Insect Science

(<https://link.springer.com/journal/42690>)

Capítulo 1: ATIVIDADE LARVICIDA E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Ruta Graveolens* L. CONTRA *Aedes aegypti*

Poliana Caruline Rosa da Costa¹

Diego Resende Rodrigues²

Erika Cosendey de Mello Peixoto³

¹ Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Luiz Meneghel, Discente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPAGRO), Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes, PR, Brasil. E-mail: polianacarulinerosa@gmail.com

² Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Luiz Meneghel, Centro de Ciências Biológicas, Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes, PR, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-9495-8943>. E-mail: diegopardal@uenp.edu.br

³ Universidade Estadual do Norte do Paraná, *campus* Luiz Meneghel, Laboratório NEPASP, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia BR-369 Km 54, Vila Maria, CP 261 - CEP 86360-000, Bandeirantes, PR, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-9608-4282>. E-mail: emellopeixoto@uenp.edu.br

* Autor para correspondência

1. INTRODUÇÃO

Extratos naturais obtidos a partir de fontes vegetais têm sido amplamente investigados como alternativas promissoras no controle de vetores de doenças tropicais, em razão de seu potencial biológico e do menor impacto ambiental quando comparados aos produtos químicos sintéticos tradicionalmente utilizados, o que tem impulsionado o interesse por estratégias de controle mais sustentáveis e seguras para a saúde humana e o ambiente (Silva et al. 2022).

A persistência e a expansão de doenças transmitidas por vetores, como aquelas associadas ao mosquito *Aedes aegypti*, estão relacionadas a diversos fatores, incluindo a escassez de programas de controle eficientes, a aplicação inadequada ou pouco eficaz de medidas de combate, além de condições ambientais favoráveis, como o clima e a dinâmica de expansão urbana, que contribuem para a proliferação do vetor e aumentam o contato entre o mosquito e a população humana (Andrade et al. 2021; Pauliquevis et al. 2021).

No Brasil, o controle do *Aedes aegypti* baseia-se, predominantemente, no uso de inseticidas químicos sintéticos, aplicados no ambiente por meio da pulverização espacial conhecida como “fumacê”, com o objetivo de eliminar os mosquitos adultos, além da adição de agentes químicos em recipientes com água parada, visando interromper o desenvolvimento das larvas; entretanto, essas abordagens apresentam limitações importantes, como o favorecimento da resistência do vetor, impactos negativos sobre organismos não alvo, riscos à saúde humana e contaminação ambiental (Brasil, 2023).

Diante desse cenário, a busca por alternativas naturais de controle torna-se cada vez mais relevante, uma vez que extratos vegetais e óleos essenciais apresentam diferentes atividades biológicas, como ação antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, antiparasitária e inseticida, o que os torna candidatos promissores para o desenvolvimento de produtos voltados ao controle de vetores, com menor toxicidade ambiental (Pauliquevis et al. 2021; Takagi et al. 2020).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial larvicida e ovicida de extratos brutos obtidos a partir de plantas medicinais, reforçando o interesse no uso dessas substâncias como base para o desenvolvimento de inseticidas naturais, especialmente no contexto do controle do *Aedes aegypti*, cuja principal forma de prevenção está diretamente relacionada à redução da população do vetor (Takagi et al. 2020; Andrade et al. 2021).

Nesse contexto, a prospecção de substâncias bioativas provenientes de plantas

medicinais, em suas diferentes formas de preparo, consolida-se como uma estratégia relevante na busca por métodos alternativos e sustentáveis de controle de vetores, permitindo a redução dos impactos ambientais e contribuindo para ações mais seguras e eficazes no combate a doenças transmitidas por mosquitos (Andrade et al. 2021; Silva et al. 2022).

Partindo desse pressuposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade larvicida do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. sobre larvas de *Aedes aegypti*, bem como realizar a caracterização fitoquímica desse extrato, visando identificar os principais grupos de metabólitos secundários potencialmente responsáveis pela ação biológica observada. Busca-se, assim, contribuir para a prospecção de alternativas naturais e sustentáveis para o controle do vetor, ampliando o conhecimento científico sobre o potencial inseticida de espécies vegetais, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle mais seguras, eficazes e sustentáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização do experimento

O estudo foi conduzido no Laboratório de Bioterápicos e Plantas Medicinais do Núcleo de Ensino, Extensão e Pesquisa em Agroecologia, Sustentabilidade e Produção Orgânica (NEPASPLAB), localizado no *Campus* Luiz Meneghel da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), no município de Bandeirantes, Paraná, Brasil, situado às margens da Rodovia BR-369, Km 54, Vila Maria.

O experimento apresentou delineamento inteiramente casualizado e foi desenvolvido em duas etapas experimentais complementares. A primeira etapa consistiu na avaliação da atividade larvicida do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. sobre larvas de *Aedes aegypti*. A segunda etapa envolveu a caracterização fotoquímica do extrato, por meio de prospecção qualitativa e quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais.

2.2. Obtenção do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L.

O material vegetal de *Ruta graveolens* L. foi previamente seco à temperatura ambiente, protegido da luz solar direta, e posteriormente triturado até a obtenção de partículas homogêneas. Para a extração, foram pesados 100 g do material vegetal seco, os quais foram transferidos para frasco âmbar de vidro com capacidade de 1 L.

A extração foi realizada utilizando solução hidroetanólica a 70% (v/v), preparada a

partir de etanol P.A. e água destilada. Foram adicionados 500 mL da solução extratora ao material vegetal, mantendo-se a proporção de 1:5 (m/v). O sistema foi submetido à agitação mecânica constante, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), por um período de 24 horas.

Após esse período, o extrato foi filtrado a vácuo utilizando papel filtro qualitativo. O resíduo vegetal remanescente foi novamente submetido a duas novas extrações sucessivas, nas mesmas condições descritas, utilizando solvente novo em cada etapa, totalizando três ciclos de extração. Os filtrados obtidos foram reunidos.

O extrato bruto foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida, à temperatura de aproximadamente 60 °C, até a completa remoção do solvente. Em seguida, o extrato concentrado foi submetido à liofilização, em temperatura de -50 °C e pressão de 150 mmHg, até a obtenção do extrato seco. O extrato liofilizado foi armazenado em frascos de vidro âmbar, devidamente identificados, mantidos em dessecador e protegidos da luz até a realização das análises (Figura 2).

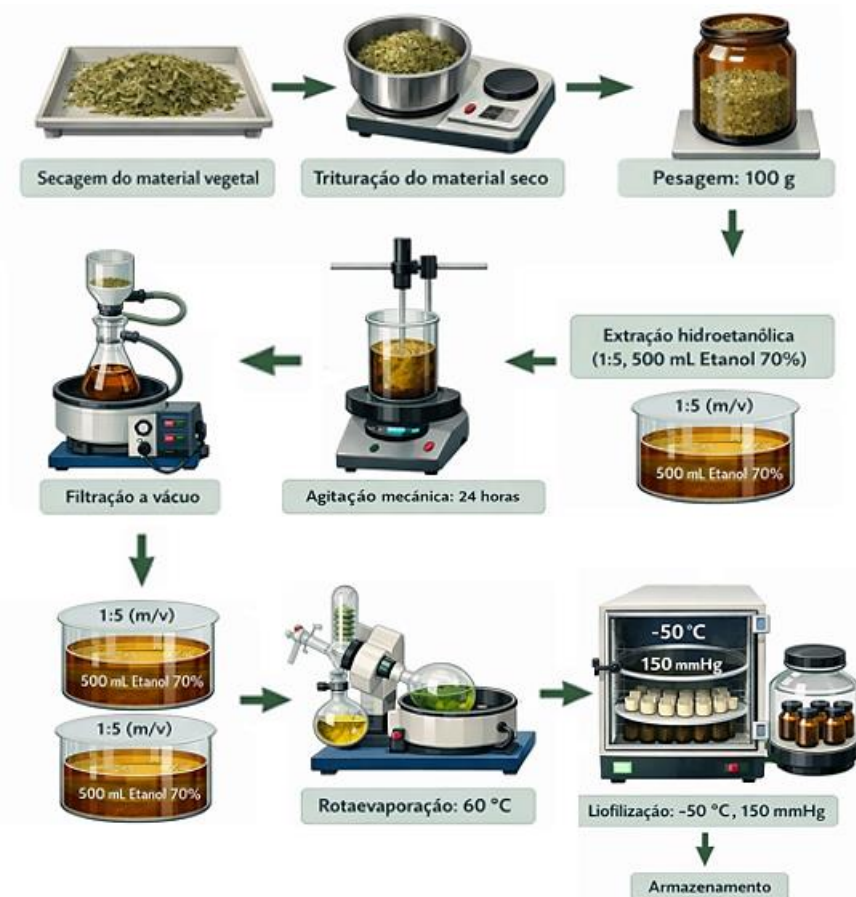


Figura 2. Obtenção do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. Fonte: BioRender

2.3. Coleta, eclosão e criação de *Aedes aegypti*

Os ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos por meio de armadilhas do tipo ovitrampa, confeccionadas e instaladas no Campus Luiz Meneghel da UENP, seguindo procedimentos descritos na literatura especializada. As ovitrapas consistiram em recipientes plásticos contendo água e palhetas de Eucatex, que serviram como substrato para oposição.

Após o período de exposição, as palhetas contendo os ovos foram recolhidas e transportadas ao laboratório. Para a eclosão, as palhetas foram imersas em bacias plásticas contendo água destilada, mantidas sob proteção com tela de malha fina, a fim de evitar a entrada de insetos externos (Wohl; McMeniman, 2023).

As larvas eclodidas foram mantidas em estufa do tipo B.O.D., sob temperatura controlada de 27 ± 2 °C, umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. O desenvolvimento larval foi acompanhado diariamente por observação direta, sem realização de contagem diária formal ou registro fotográfico, apenas para monitoramento do crescimento e troca de estágios (Imam et al. 2014; Wohl; McMeniman, 2023).

A identificação dos estágios larvais L3 e L4 foi realizada com base em características morfológicas, como aumento do tamanho corporal, espessura do sifão respiratório e maior mobilidade, conforme descrito em chaves entomológicas. O período médio para que as larvas atingissem os estágios L3 e L4 foi de aproximadamente cinco a sete dias após a eclosão (Figura 3).



Figura 3. Coleta, eclosão e criação de *Aedes aegypti*. Fonte: BioRender

2.4. Ensaio de atividade larvicida

O ensaio de atividade larvicida foi conduzido utilizando larvas de *Aedes aegypti* nos estágios L3 e L4. O extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. foi previamente solubilizado em água destilada e testado nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL.

Para cada concentração, foram utilizadas 40 larvas, distribuídas em quatro repetições, contendo 10 larvas por recipiente, totalizando 200 larvas no total, considerando os tratamentos, controle positivo e negativo. Cada repetição foi realizada em copos plásticos contendo 100 mL da solução teste.

Como controle negativo foi utilizada água destilada, enquanto o controle positivo consistiu no uso do larvicida comercial Espionasse A e D, preparado conforme recomendações do fabricante. As larvas foram expostas às soluções e mantidas nas mesmas condições ambientais descritas para a criação.

A avaliação da mortalidade larval foi realizada após 24 e 48 horas de exposição. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimentos espontâneos nem resposta a estímulo mecânico quando tocadas com pipeta Pasteur (Figura 4).



Figura 4. Ensaio de atividade larvicida. Fonte: BioRender

2.5. Prospecção fotoquímica preliminar

A prospecção fotoquímica preliminar do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. foi realizada com o objetivo de identificar qualitativamente os principais grupos de metabólitos secundários presentes. As análises foram conduzidas conforme metodologias clássicas descritas por Matos (1988) e Oliveira et al. (2010).

Foram investigadas a presença de fenóis, flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides, por meio de reações específicas que resultam em alterações de cor ou formação de precipitado. As reações foram analisadas visualmente, considerando-se a intensidade das respostas como indicativo da presença dos compostos avaliados.

2.6. Determinação de compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin–Ciocalteu. As amostras do extrato foram diluídas adequadamente e reagiram com o reagente de Folin–Ciocalteu, seguido da adição de solução de carbonato de sódio.

Após o tempo de reação, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. A quantificação foi realizada por meio de curva padrão construída com ácido gálico, em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (Figura 4).

2.7. Determinação de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada por método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio. As amostras do extrato reagiram com solução de AlCl_3 , formando complexo de coloração amarelada.

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. A quantificação foi efetuada a partir de curva padrão construída com quercetina, em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (Figura 4).

2.8. Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de atividade larvicida foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homogeneidade de variâncias de Levene. Em função da não normalidade dos resíduos, foi utilizada análise de variância não paramétrica por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguida do teste a posteriori de Dunn, adotando-se nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software RStudio (RStudio Team, 2023) (Figura 5).

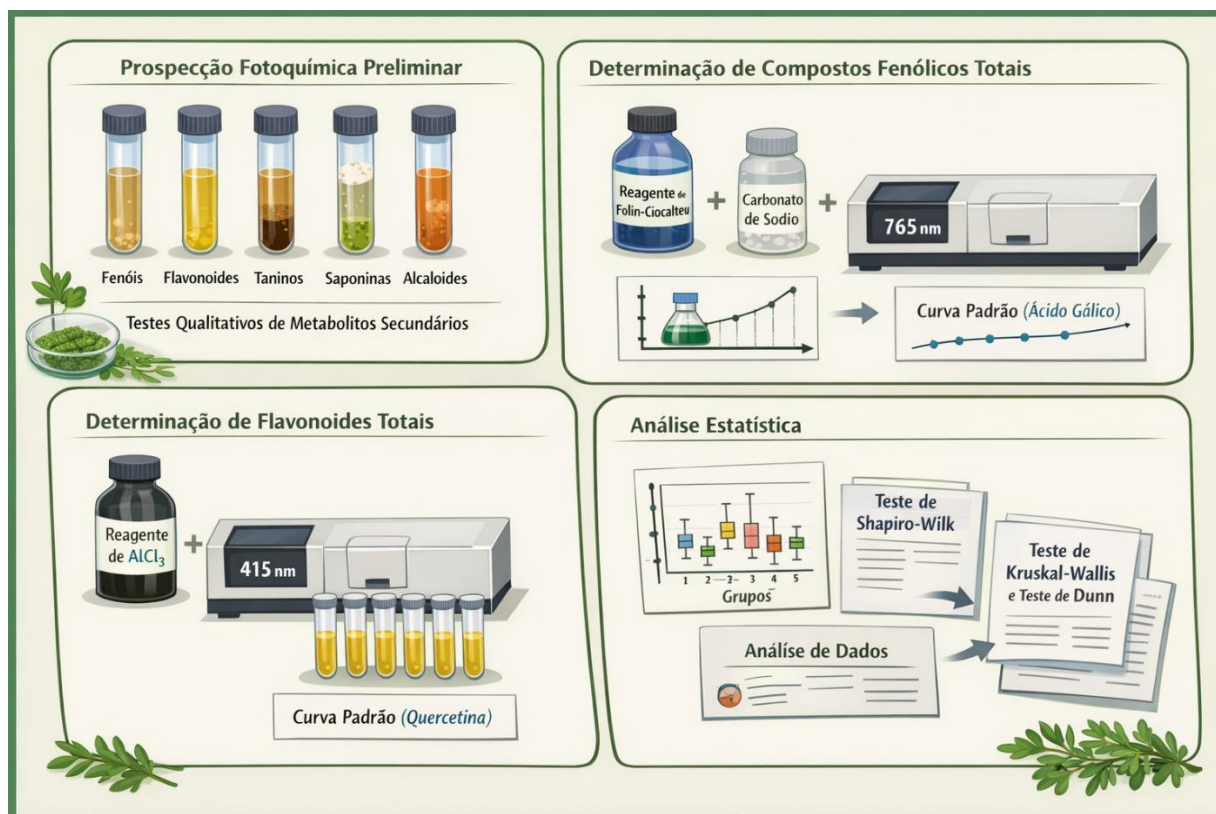


Figura 5. Perfil esquemático da Análise de Dados. Fonte: BioRender

3. RESULTADOS

3.1. Atividade larvicida do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. contra *Aedes aegypti*

Os bioensaios realizados demonstraram que o extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. apresenta atividade larvicida significativa contra larvas de *Aedes aegypti*, com efeito claramente dependente da concentração utilizada. A escolha das larvas nos estágios L3 e L4 permitiu uma avaliação mais rigorosa da eficácia do extrato, uma vez que esses estágios apresentam maior resistência quando comparados aos estágios iniciais do desenvolvimento larval.

A exposição das larvas ao extrato por um período de 48 horas possibilitou a observação consistente da mortalidade e a comparação entre os tratamentos. Nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL, a mortalidade observada foi de 65%, indicando que o extrato exerce ação larvicida já em baixas concentrações. No entanto, a ausência de aumento da mortalidade entre essas duas concentrações sugere que, dentro desse intervalo, o efeito larvicida atinge um patamar intermediário, sem resposta proporcional ao aumento da dose.

Em contraste, o tratamento com 1 mg/mL resultou em 100% de mortalidade larval, evidenciando a elevada eficácia do extrato nessa concentração. Esse resultado demonstra que o aumento da concentração promoveu uma resposta larvicida completa, eliminando todas as larvas expostas ao extrato. Além disso, a repetição consistente desse resultado em todas as unidades experimentais indica alta reprodutibilidade e confiabilidade do efeito observado.

O controle negativo, conduzido apenas com água desclorada, não apresentou mortalidade ao longo do período experimental, confirmando que a morte das larvas nos tratamentos ocorreu exclusivamente devido à ação do extrato. O controle positivo, utilizando o larvicida comercial Espionasse A e D, apresentou mortalidade total, validando o ensaio e permitindo a comparação direta da eficácia do extrato vegetal com um produto amplamente utilizado no controle de *A. aegypti*. A equivalência entre o desempenho do extrato na concentração de 1 mg/mL e o larvicida comercial reforça o potencial do extrato como alternativa no controle larvicida.

Tabela 1. Porcentagem média de larvas mortas de *Aedes aegypti* após 48 horas de exposição aos tratamentos: extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. (EHERg) nas concentrações de 0,25 mg/mL; 0,5 25 mg/mL e 1 mg/mL, controle negativo com água desclorada (CN) e controle positivo com Espionasse A e D (CP).

Tratamento	Larvas vivas	Larvas mortas	Mortalidade (%)
CN	40	0	0
0,25	14	26	65
0,5	14	26	65
1	0	40	100
CP	0	40	100

A análise da variabilidade dos dados mostrou maior dispersão dos resultados nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL (Figura 6), refletindo diferenças na resposta das larvas entre as repetições experimentais. Essa variação pode estar associada à sensibilidade individual das larvas ou à heterogeneidade da população avaliada. Por outro lado, a concentração de 1 mg/mL apresentou mortalidade uniforme em todas as repetições, indicando uma resposta larvicida consistente e estável nessa condição experimental.

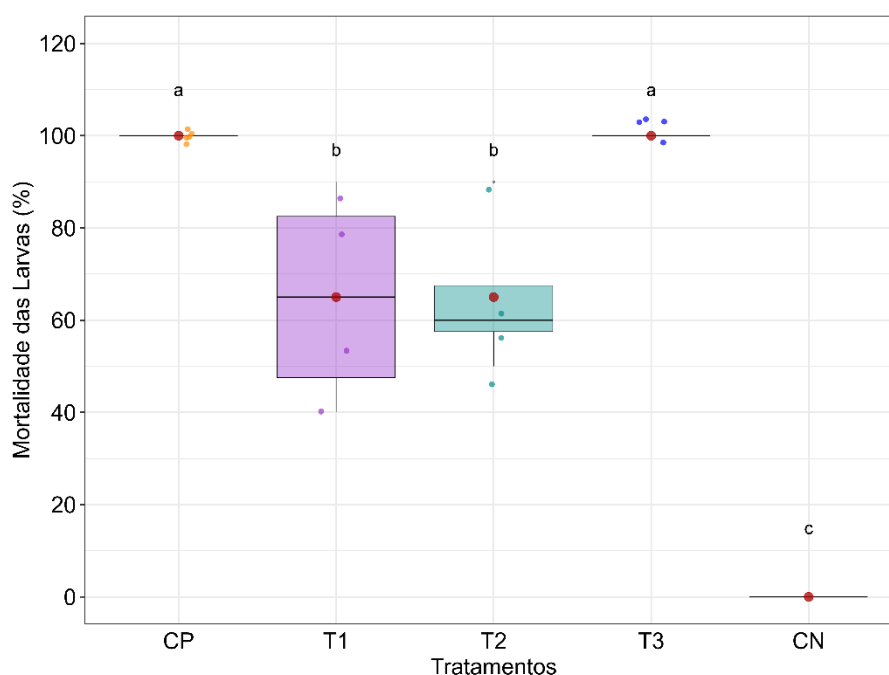


Figura 6. Índice percentual de mortalidade larval após 24 horas de tratamento com EHERg nas diluições de 0,25 mg/mL (T1), 0,5 mg/mL (T2) e 1 mg/mL (T3), comparados aos controles Positivo (CP) e Negativo (CN).

De modo geral, os resultados demonstram que o extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. possui atividade larvicida expressiva, especialmente na concentração de 1 mg/mL, na qual apresentou eficácia máxima. Esses achados indicam que o extrato vegetal apresenta potencial promissor para aplicação no controle de *Aedes aegypti*, justificando investigações adicionais, como a determinação de doses letais médias (DL_{50} e DL_{90}) e a

avaliação de sua segurança toxicológica.

3.2. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L.

A quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. demonstrou elevada concentração desses metabólitos secundários, conhecidos por sua ampla atividade biológica. A determinação do conteúdo total de fenólicos foi realizada pelo método de Folin–Ciocalteu, enquanto o teor de flavonoides totais foi determinado pelo método do cloreto de alumínio, ambos amplamente utilizados para a avaliação química de extratos vegetais.

O teor de fenólicos totais encontrado (Tabela 2) foi de $58,76 \pm 1,70$ mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g). Esses valores indicam que o extrato possui alta concentração de compostos fenólicos, sugerindo potencial antioxidante e biológico elevado. A baixa variação observada entre as repetições, expressa pelo desvio padrão reduzido, indica boa reprodutibilidade do método e homogeneidade do extrato analisado.

De forma semelhante, o conteúdo de flavonoides totais foi de $41,55 \pm 1,30$ mg equivalente de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ/g). A presença expressiva dessa classe de compostos reforça o potencial bioativo do extrato, uma vez que flavonoides estão frequentemente associados a atividades inseticidas, larvicidas e antioxidantes descritas para diferentes espécies vegetais.

Tabela 2. Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L., expressos como média \pm desvio padrão.

Fenólicos	Absorbância	Concentração diluída (mg/ml)	Equação da reta (mg/ml)	Resultado (mg de ácido gálico/ g extrato)
Amostra 1	0,331	0,438 mg/ml	0,025	56,997
Amostra 2	0,349	0,438 mg/ml	0,026	60,396
Amostra 3	0,341	0,438 mg/ml	0,026	58,885
Média \pm Desvio-padrão				58,759 \pm 1,702
Flavonoides	Absorbância	Concentração diluída (mg/ml)	Equação da reta (mg/ml)	Resultado (mg de ácido gálico/ g extrato)
Amostra 1	0,421	0,438 mg/ml	0,018	40,170
Amostra 2	0,44	0,438 mg/ml	0,018	41,747
Amostra 3	0,452	0,438 mg/ml	0,019	42,743
Média \pm Desvio-padrão				41,554 \pm 1,298

A relação entre o elevado teor de compostos fenólicos e flavonoides e a atividade larvicida observada sugere que esses metabólitos podem estar envolvidos no efeito biológico

do extrato. Embora os métodos empregados quantifiquem o conteúdo total dessas classes, e não compostos individuais, os valores obtidos indicam uma composição química favorável à atividade larvicida.

Além disso, a utilização de curvas padrão com elevado coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$) assegura a confiabilidade das quantificações realizadas, reforçando a robustez dos resultados químicos apresentados. A combinação de altos teores de fenólicos e flavonoides com a expressiva mortalidade larval observada nos bioensaios indica uma possível relação entre a composição fotoquímica do extrato e sua ação larvicida.

De maneira geral, os resultados da quantificação química corroboram o potencial do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. como fonte de metabólitos secundários bioativos, fornecendo suporte químico para a atividade larvicida demonstrada nos ensaios biológicos.

3.3. Identificação de compostos químicos por LC-MS/MS

A caracterização química do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) permitiu a identificação de compostos específicos presentes no extrato, complementando os dados obtidos nas análises espectrofotométricas de fenólicos e flavonoides totais. A análise foi realizada em laboratório especializado, utilizando modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), o que confere alta seletividade e sensibilidade na identificação dos analitos (Vide Anexo I).

Os resultados da análise por LC-MS/MS confirmaram a **presença de rutina** no extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. A identificação desse flavonoide foi baseada na correspondência do tempo de retenção e das transições de íons características do composto, utilizando padrão analítico e ácido salicílico como padrão interno, garantindo maior confiabilidade aos resultados obtidos (Vide Anexo I).

Em contraste, a quercetina não foi detectada no extrato analisado, apesar do elevado teor de flavonoides totais observado na análise espectrofotométrica. Esse resultado indica que a maior parte dos flavonoides presentes no extrato está associada a outros compostos, como a rutina, ou a flavonoides estruturalmente relacionados, que contribuem para o valor total quantificado, mas não correspondem especificamente à quercetina livre.

A ausência de quercetina e a presença de rutina sugerem que o perfil químico do extrato pode influenciar diretamente sua atividade biológica. A rutina é amplamente descrita na literatura como um flavonoide com potencial inseticida e larvicida, podendo atuar por

diferentes mecanismos, como interferência no metabolismo energético e na integridade celular das larvas.

Os resultados obtidos por LC-MS/MS reforçam a consistência das análises químicas realizadas e oferecem suporte adicional para a interpretação da atividade larvicida observada. A identificação de rutina, aliada aos elevados teores de fenólicos e flavonoides totais, sugere que a ação larvicida do extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. pode estar relacionada à atuação isolada ou sinérgica desses metabólitos secundários.

A análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) confirmou a presença de rutina no extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. A identificação foi realizada utilizando o modo MRM, com padrão interno de ácido salicílico, garantindo elevada seletividade e confiabilidade dos resultados analíticos.

Por outro lado, não foi detectada a presença de quercetina no extrato analisado, apesar do elevado teor de flavonoides totais observado nas análises espectrofotométricas. Esse resultado sugere que a atividade larvicida observada pode estar relacionada à presença de outros flavonoides, como a rutina, ou à ação sinérgica entre diferentes metabólitos secundários presentes no extrato.

4. DISCUSSÃO

A elevada mortalidade larval observada para o extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L., especialmente na concentração de 1 mg/mL, indica que o extrato apresenta compostos bioativos capazes de exercer efeito tóxico eficiente sobre larvas de *Aedes aegypti*. O comportamento dose-dependente verificado sugere que, à medida que a concentração aumenta, ocorre maior disponibilidade desses metabólitos, o que intensifica a interferência em processos fisiológicos essenciais das larvas, resultando em aumento da mortalidade. Esse padrão é amplamente descrito para larvicidas de origem vegetal e reforça a coerência biológica dos resultados obtidos (World Health Organization, 2005; Milugo et al. 2021).

A obtenção de 100% de mortalidade na concentração de 1 mg/mL, com desempenho equivalente ao larvicida comercial utilizado como controle positivo, evidencia o potencial do extrato de *R. graveolens* como alternativa ao controle químico convencional. Esse resultado é relevante, pois demonstra que produtos de origem vegetal podem alcançar eficácia comparável à de inseticidas sintéticos quando empregados em concentrações adequadas, reforçando o interesse por estratégias de controle vetorial mais sustentáveis (World Health Organization, 2005).

Estudos prévios corroboram o potencial inseticida da espécie *Ruta graveolens*. Orlanda e Mouchrek (2021) observaram elevada mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao óleo essencial da planta, confirmando que compostos presentes nessa espécie vegetal apresentam ação larvicida significativa. Embora o método de extração seja distinto do utilizado neste estudo, os resultados convergem ao indicar que *R. graveolens* possui metabólitos com atividade tóxica sobre larvas de mosquitos vetores, independentemente da matriz de extração empregada (Orlanda; Mouchrek, 2021).

As diferenças de resposta entre espécies de mosquitos também devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Al-Solami (2021) relataram menor mortalidade de larvas de *Culex pipiens* quando expostas a extratos de *R. graveolens*, mesmo em concentrações elevadas, sugerindo que a suscetibilidade aos compostos bioativos varia conforme a espécie-alvo. Dessa forma, a elevada mortalidade observada para *A. aegypti* neste estudo pode estar associada a uma maior sensibilidade dessa espécie aos metabólitos presentes no extrato hidroetanólico da arruda (Al-Solami, 2021).

A caracterização química do extrato revelou elevados teores de fenólicos totais e flavonoides totais, compostos frequentemente associados à atividade inseticida de extratos vegetais. Esses metabólitos secundários podem atuar por diferentes vias, incluindo alterações metabólicas e danos celulares, contribuindo para a mortalidade larval. Revisões recentes destacam que extratos ricos nesses compostos apresentam maior eficiência larvicida, especialmente quando utilizados em concentrações adequadas (Milugo et al. 2021).

A confirmação da presença de rutina no extrato por LC-MS/MS reforça a hipótese de contribuição desse flavonoide para a atividade larvicida observada. Embora existam limitações quanto a estudos que avaliem a ação larvicida da rutina de forma isolada, a literatura aponta que flavonoides presentes em extratos vegetais podem atuar de maneira conjunta ou sinérgica, potencializando os efeitos tóxicos sobre insetos. Assim, a presença de rutina associada ao elevado teor de fenólicos totais sugere que o efeito larvicida do extrato resulte da ação combinada de diferentes metabólitos secundários (Milugo et al. 2021).

Além da eficiência larvicida, o uso de extratos vegetais no controle de *Aedes aegypti* apresenta vantagens ambientais e sanitárias. Produtos de origem vegetal tendem a apresentar menor persistência no ambiente, menor risco de bioacumulação e potencial redução do desenvolvimento de resistência em populações de mosquitos, quando comparados aos inseticidas sintéticos amplamente utilizados. Esses aspectos reforçam a importância de estudos voltados à avaliação de larvicidas botânicos como ferramentas complementares no controle vetorial (Nawarathne; Dharmarathne, 2024).

Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. possui elevado potencial larvicida, especialmente na concentração de 1 mg/mL, justificando a continuidade da pesquisa. Estudos futuros devem incluir a determinação das doses letais (DL_{50} e DL_{90}), bem como avaliações toxicológicas e ambientais, conforme recomendado pelas diretrizes internacionais para o desenvolvimento de novos produtos larvicidas (World Health Organization, 2005).

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o extrato hidroetanólico de *Ruta graveolens* L. apresenta elevada atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, com mortalidade total observada na concentração de 1 mg/mL após 48 horas, demonstrando eficácia semelhante ao larvicida comercial utilizado como controle positivo e evidenciando seu potencial como alternativa ao controle químico convencional.

A análise fotoquímica revelou altos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, metabólitos associados à atividade inseticida, e a identificação da rutina por LC-MS/MS reforça a participação desses compostos na ação larvicida, possivelmente por efeitos isolados ou sinérgicos. De modo geral, o extrato mostra-se uma fonte promissora de substâncias bioativas para o controle de *Aedes aegypti*, embora sejam necessários estudos complementares para determinação das doses letais médias, avaliação toxicológica e análise de impacto ambiental, visando ao desenvolvimento seguro e eficaz de larvicidas de origem vegetal.

6. REFERÊNCIAS

AL Solami HM (2021) Larvicidal activity of plant extracts by inhibition of detoxification enzymes in *Culex pipiens*. J King Saud Univ Sci 33:101371. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101371>

Andrade JN, Neto EMC, Brandão HN, Lucchese AM, Neto EBN, Peixoto TM (2021) Avaliação de extratos de *Phyllanthus acuminatus* Vahl (Phyllanthaceae) na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Culicidae). Braz J Dev 7:5278–5295. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-357>

Brasil Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde e Meio Ambiente (2023a) Boletim epidemiológico. Brasília. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023>

Brasil Ministério da Saúde Secretaria de Ciência Tecnologia Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (2021b) Informações sistematizadas da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS: *Ruta graveolens* L. (Arruda). Brasília. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt->

[br/composicao/sectics/daf/cbaf/arquivos/arquivos-plantas-mediciniais-e-fitoterapicos/ruta_graveolens.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/cbaf/arquivos/arquivos-plantas-mediciniais-e-fitoterapicos/ruta_graveolens.pdf/view)

Brasil Ministério da Saúde Secretaria de Ciência Tecnologia Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (2021c) Informações sistematizadas da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS: *Ruta graveolens* L. (Arruda). Brasília. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/cbaf/arquivos/arquivos-plantas-mediciniais-e-fitoterapicos/ruta_graveolens.pdf/view

Imam H, Zarnigar, Sofi G, Sheikh A (2014) The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). Trop Parasitol 4:53–55. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.129167>

Matos FJA (1988) Introdução à fitoquímica experimental. Editora UFC, Fortaleza

Milugo TK, Omosa LK, Omwoyo WN, Ojwang JG, Otieno JN, Makonen P (2021) Naturally occurring compounds with larvicidal activity: a review on mosquito larvicidal agents from plants. Front Trop Dis 2:718804. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.718804>

Nawarathne MP, Dharmarathne C (2024) Control of dengue larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using larvicidal bioactive compounds in plant extracts and plant extract-mediated nanoparticles. Trop Med Health 52:1. <https://doi.org/10.1186/s41182-024-00654-9>

Oliveira F, Ritto JLA, Akisue G, Bacchi EM (2010) Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos. Ateneu, São Paulo

Orlanda JFF, Mouchrek AN (2021) Efeito larvicida do óleo essencial das folhas de *Ruta graveolens* no controle de *Aedes aegypti*. Res Soc Dev 10:e20028. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20028>

Pauliquevis CF, Oliveira AKM, Silva PG, Zanella DFP, Roel AR, Porto KR, Matias R (2021) Efeito larvicida do extrato etanólico de *Piper umbellatum* sobre o mosquito *Aedes aegypti*. South Am J Basic Educ Tech Technol 8:84–101

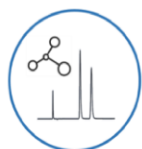
Silva RA, Silva LLC, Amorim VL, Silva AO, Lopes RS, Naujorks AAS (2022) Análise fitoquímica, toxicidade e potencial larvicida de extrato bruto vegetal na busca por substâncias bioativas. Braz J Dev 8:23536–23544. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-054>

Takagi BA, Souza TGB, Oliveira MD, Bernardes LG, Oda JY, Machado ARSR, Machado AM (2020) Efeito larvicida e ovocida de extratos de *Crotalaria pallida* sobre *Aedes aegypti*. Braz J Dev 6:23060–23074. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-019>

World Health Organization (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO, Geneva. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>

Wohl MP, McMeniman CJ (2023) Batch rearing of *Aedes aegypti*. Cold Spring Harb Protoc 2023:pdb.prot108017. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot108017>

ANEXO I - Identificação de rutina e quercetina em extrato hidroalcoólico de arruda a 10%



LMEM
Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas

Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas - LMEM
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13B

São Paulo, 04 de dezembro de 2024.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo

Resumo do Relatório

Objetivo das análises: Identificação de rutina e quercetina em extrato hidroalcoólico de arruda a 10%.

Requisitante: Debora Santos Medonça Golçalves

Amostras: extrato hidroalcoólico de arruda a 10%

Técnicas Analíticas: Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Análise realizada por: Farmacêutica Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos

1. Metodologia

1.1 Análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A amostra de extrato hidroalcolico foi diluída em solução de formiato de amônio 1mM e 0,1% de ácido fórmico, utilizando 35mL de solução, após dissolver foi realizado centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos). Em seguida foi realizada uma filtragem em papel filtro (Whatman®, grade 40) e filtro de seringa de PVDF (Analítica®, poros de 0,22µm). Dessa solução do extrato fez-se uma diluição 1:10 novamente na solução de formiato de amônio 1mM e 0,1% de ácido fórmico. Os liofilizados de rutina e quercetina liofilizados foram ambos preparados conforme o procedimento a seguir: pesou-se 0,005g dos pós em frascos individuais e foi adicionado 5mL de metanol, obtendo-se uma concentração estimada de 1mg/mL de cada substância. Em seguida foram realizadas diluições seriadas até obter a concentração de 1µg/mL. Como padrão interno (PI) foi adotado o ácido salicílico que foi preparado, a partir de sua forma em pó, com procedimento idêntico ao anteriormente descrito.

A análise foi conduzida em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência, modelo *Acquity System*, acoplado à espectrômetro de massas triplo quadrupolo no modo *tandem*, modelo *Quattro Premier*, com ionização por *electrospray* (UPLC-ESI-MS/MS), Waters Corporation®. Para o sistema cromatográfico foi definido a eluição gradiente com 1mM de tampão formiato de amônio com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) a constante de fluxo é 0,3ml/min e a temperatura da coluna à 40°C. O gradiente de eluição usado foi de 0–1.0min, 0% B; 1.0–5.0min, 95% B; 5.0–8.0min, 95%B; 8.00–10.0min, 100%B; 10.0–15.0min, 00%B. O tempo total da corrida foi de 15.0 min. A volume de injeção foi de 5 µL. O espectrômetro de massa foi operado no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), considerando três transições para cada analito. As configurações de MS foram estabelecidas da seguinte forma: taxa de fluxo do gás de dessolvatação, 900 l/h; taxa de fluxo de gás cone, 200 l/h; temperatura de dessolvatação 350°C; temperatura da fonte, 120°C; tensão capilar, 3,40kV. Os tempos de retenção, voltagem do cone, energia de colisão, os íons precursores e suas transições massa/carga (m/z) utilizadas para quantificação de cada analito é indicado na Tabela 1. Os cromatogramas foram projetados após a extração de dados brutos da MassLynx™ Software V4.1 (Waters Corporation, Milford, MA).

Para a caracterização do extrato foi realizada uma serie de análises, sendo elas: infusão do padrão de rutina 1µg/mL em metanol, do padrão de quercetina 1 µg/mL em metanol, padrão de

ácido salicílico 1 µg/mL em metanol. Para a análise do extrato foi preparado um pool contendo 50µL de cada uma das substâncias e por fim a solução diluída do extrato com padrão interno. A identificação dos compostos foi baseada na comparação do espectro de massas do extrato com espectros de referência das substâncias liofilizadas de rutina e quercetina fornecidas, utilizando o ácido salicílico como PI.

Tabela 1: Parâmetros do espectrômetro de massa para os analitos e padrão interno.

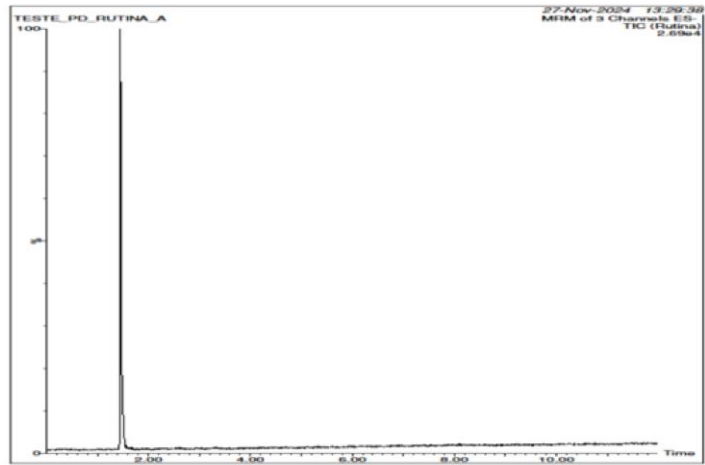
Analito	Tempo de retenção (min)	Ion precursor, Q1 (m/z)	Ion produto, Q3 (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
Rutina	1,45	609,29	255,0	60	62
			271,0		58
			300,0		32
Quercetina	1,64	300,97	187,4	35	14
			251,0		16
			282,9		26
Ácido Salicílico	1,78	337	64,9	25	24
			74,9		22
			92,8		14

2. Resultados

2.1 Análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A seguir são apresentados os cromatogramas representativos obtidos por meio das análises por LC-MS/MS das substâncias liofilizadas (padrão), do padrão interno utilizado na análise (ácido salicílico) e do extrato hidroalcolico de arruda 10%.

Rutina
Cromatograma



Espectro de massas

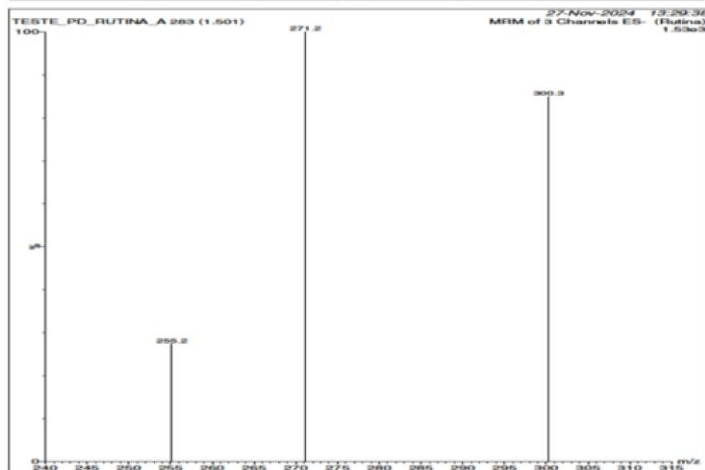
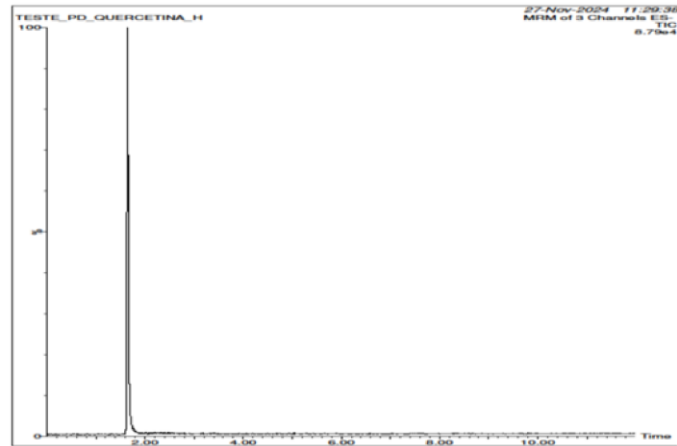


Figura 1. Cromatograma representativo, obtido por LC-MS/MS, do padrão de rutina (pó).

Quercetina

Cromatograma



Espectro de massas

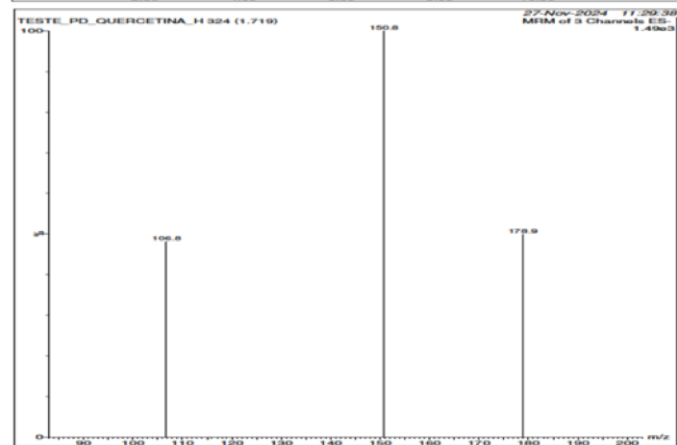


Figura 2. Cromatograma representativo, obtido por LC-MS/MS, do padrão de quercetina (pó).

Ácido Salicílico

Cromatograma



Espectro de massas

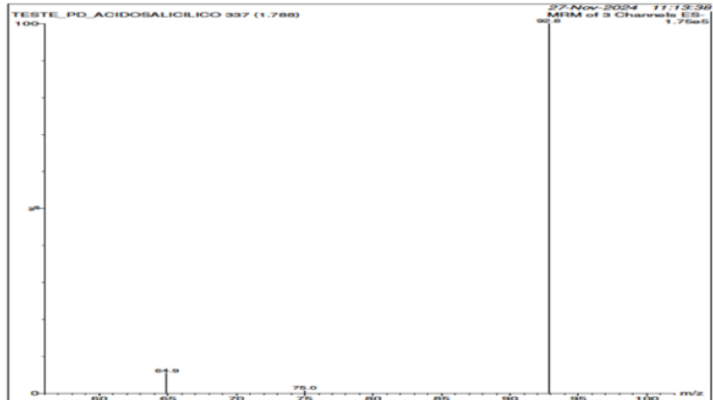


Figura 3. Cromatograma representativo, obtido por LC-MS/MS, do ácido acetilsalicílico (pó), adotado como padrão interno.

Extrato Hidroalcólico

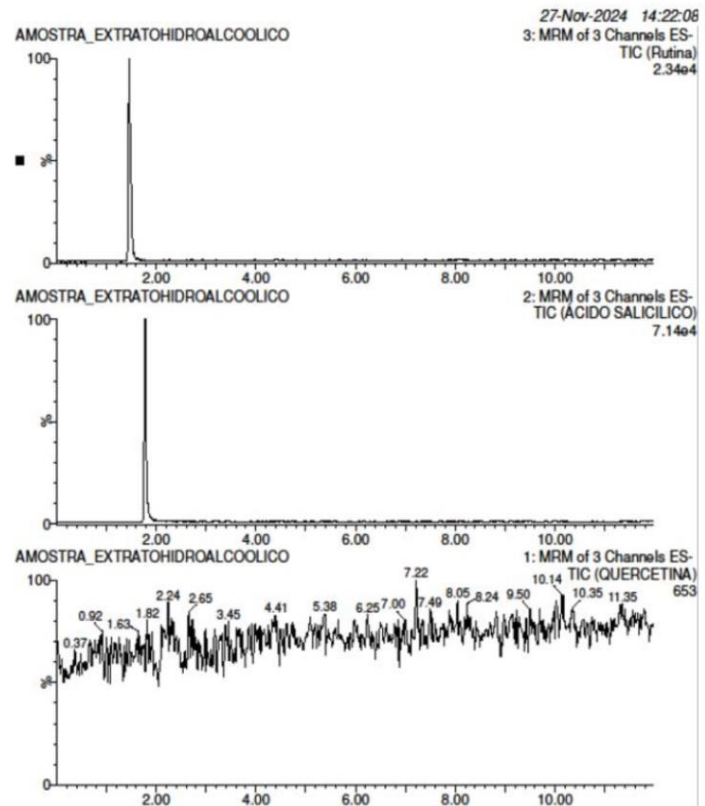


Figura 4. Cromatograma representativo, obtido por LC-MS/MS, do extrato hidroalcólico de arruda 10%, demonstrando a presença de rutina e do padrão interno, e ausência da quercetina

As imagens apresentam os perfis cromatográficos e espectro de massas de cada substância individualmente, os quais foram condizentes com literatura. O perfil cromatográfico do extrato hidroalcólico de arruda a 10% foi condizente apenas com a combinação dos espectros cromatográficos da rutina e ácido salicílico. Portanto, na amostra foi identificado correspondência apenas com a substância rutina.

ANEXO II – Normas da Revista International Journal of Tropical Insect Science

Submission guidelines

Contents

- [Instructions for Authors](#)
 - [Manuscript Submission](#)
 - [Title Page](#)
 - [Text](#)
 - [References](#)
 - [Tables](#)
 - [Artwork and Illustrations Guidelines](#)
 - [Supplementary Information \(SI\)](#)
 - [Ethical Responsibilities of Authors](#)
 - [Compliance with Ethical Standards](#)
 - [Competing Interests](#)
 - [Research involving human participants, their data or biological material](#)
 - [Research Data Policy and Data Availability Statements](#)
 - [After acceptance](#)
- [Open access publishing](#)
- [Mistakes to avoid during manuscript preparation](#)

Instructions for Authors

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Submitting Declarations

Please note that [Author Contribution information](#) and [Competing Interest information](#) must be provided at submission via the submission interface. Only the information submitted via the interface will be used in the final published version. Please make sure that if you are an editorial board member and also a listed author that you also declare this information in the Competing Interest section of the interface.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information on these statements as well as possible other mandatory statements.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as [ChatGPT](#), do not currently satisfy our [authorship criteria](#). Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which

cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript. The use of an LLM (or other AI-tool) for "AI assisted copy editing" purposes does not need to be declared. In this context, we define the term "AI assisted copy editing" as AI-assisted improvements to human-generated texts for readability and style, and to ensure that the texts are free of errors in grammar, spelling, punctuation and tone. These AI-assisted improvements may include wording and formatting changes to the texts, but do not include generative editorial work and autonomous content creation. In all cases, there must be human accountability for the final version of the text and agreement from the authors that the edits reflect their original work.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

[Back to top](#)

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.

- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

[Back to top](#)

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

Tables

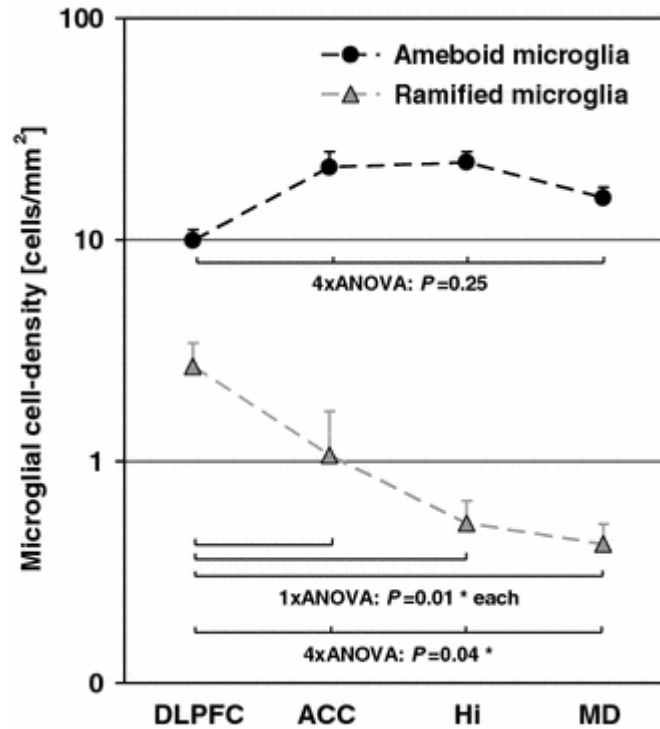
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

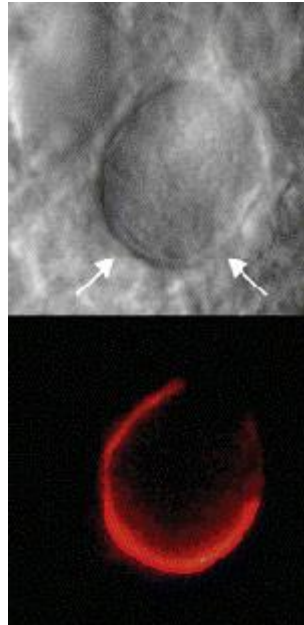
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



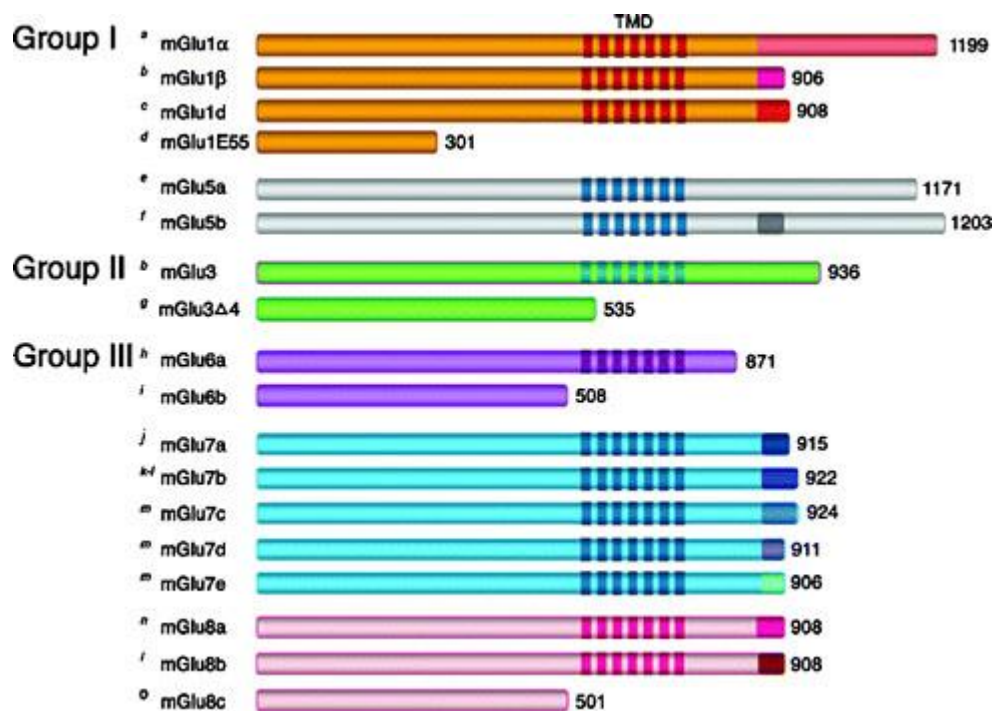
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s). Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 2 GB
- Minimum video duration: 1 sec

- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)) the journal will follow the [COPE](#) guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism')).
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following [COPE](#) guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed
- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Editorial Board Members and Editors are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should

exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list we recommend they declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is not added to the manuscript itself. Under ‘summary of requirements’ (see below) funding information should be included in the ‘Declarations’ section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- Financial interests: Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company W and owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

- Financial interests: The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

- Financial interests: Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

- Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the [1964 Declaration of Helsinki](#) and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on Informed Consent.

Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the [NCBI database](#) for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1^{tm1a(KOMP)Wtsi}* RRID:MMRRC_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line RRID:CVCL_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, RRID:AB_2722109

Plasmid: mRuby3 plasmid RRID:Addgene_104005

Software: ImageJ Version 1.2.4 RRID:SCR_003070

RRIDs are provided by the [Resource Identification Portal](#). Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly [register a new resource](#) and obtain an RRID.

Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health

interventions as “A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions” and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#).

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the [EQUATOR Network](#) when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials ([CONSORT](#)) and Study protocols ([SPIRIT](#))

Observational studies ([STROBE](#))

Systematic reviews and meta-analyses ([PRISMA](#)) and protocols ([Prisma-P](#))

Diagnostic/prognostic studies ([STARD](#)) and ([TRIPOD](#))

Case reports ([CARE](#))

Clinical practice guidelines ([AGREE](#)) and ([RIGHT](#))

Qualitative research ([SRQR](#)) and ([COREQ](#))

Animal pre-clinical studies ([ARRIVE](#))

Quality improvement studies ([SQUIRE](#))

Economic evaluations ([CHEERS](#))

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before

the reference list under a heading of ‘Ethics approval’.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Research Data Policy and Data Availability Statements

This journal follows Springer Nature [research data policy](#). Sharing of all relevant research data is strongly encouraged and authors must add a Data Availability Statement to original research articles.

Research data includes a wide range of types, including spreadsheets, images, textual extracts, archival documents, video or audio, interview notes or any specialist formats generated during research.

Data availability statements

All original research must include a data availability statement. This statement should explain how to access data supporting the results and analysis in the article, including links/citations to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Please see our full policy [here](#).

If it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, this statement should describe how data can be accessed and any conditions for reuse. Participant consent should be obtained and documented prior to data collection. See our [guidance on sensitive data](#) for more information.

When creating a data availability statement, authors are encouraged to consider the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article.

Further guidance on writing a data availability statement, including examples, is [available here](#):

[Data availability statements](#)

Data repositories

Authors are strongly encouraged to deposit their supporting data in a publicly available repository. Sharing your data in a repository promotes the integrity, discovery and reuse of your research, making it easier for the research community to build on and credit your work.

See our [data repository guidance](#) for information on finding a suitable repository.

We recommend the use of discipline-specific repositories where available. For a number of data types, submission to specific public repositories is mandatory.

See our [list of mandated data types](#).

The journal encourages making research data available under open licences that permit reuse. The journal does not enforce use of particular licences in third party repositories. You should ensure you have necessary rights to share any data that you deposit in a repository.

Data citation

The journal recommends that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely. This includes data the authors are sharing alongside their publication and any secondary data the authors have reused. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI), should be included in the reference list using the minimum information

recommended by [DataCite](#) (Dataset Creator, Dataset Title, Publisher [repository], Publication Year, Identifier [e.g. DOI, Handle, Accession or ARK]) and follow journal style.

See our [further guidance](#) on citing datasets.

Research data and peer review

If the journal that you are submitting to uses double-anonymous peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also anonymised. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Support with research data policy

Authors who need help understanding our data sharing policy, finding a suitable data repository, or organising and sharing research data can consult our [Research Data Helpdesk](#) for guidance.

See our [FAQ page](#) for more information on Springer Nature's research data policy.

[Back to top](#)

After acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Shortly after this you will receive two e-mails. One contains a request to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article, as well as to arrange rights and payment of any associated publication cost. A second e-mail containing a link to your article's proofs will be sent once typesetting is completed.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After the issue-publication, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open access publishing

To find out more about publishing your work Open Access in *International Journal of Tropical Insect Science*, including information on fees, funding and licences, visit our [Open access publishing page](#).