

## Extrato Oleoso de *Streptomyces hygroscopicus* com atividades contra as larvas de *Aedes aegypti*

*Streptomyces hygroscopicus* oil extract with activities against *Aedes aegypti*

Extracto oleoso de *Streptomyces hygroscopicus* con actividad contra larvas de *Aedes aegypti*

Recebido: 08/02/2023 | Revisado: 27/02/2023 | Aceitado: 01/03/2023 | Publicado: 06/03/2023

### Jackelly Felipe de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9991-4181>  
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil  
E-mail: [jackelly.felipe@ufpe.br](mailto:jackelly.felipe@ufpe.br)

### Hyago Luiz Rique

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5874-8626>  
Universidade Federal da Paraíba, Brasil  
E-mail: [hyagolrique@gmail.com](mailto:hyagolrique@gmail.com)

### Fabiola da Cruz Nunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0837-810X>  
Universidade Federal da Paraíba, Brasil  
Email: [fabiola@cbiotec.ufpb.br](mailto:fabiola@cbiotec.ufpb.br)

### Leonor Alves de Oliveira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3916-1453>  
Universidade Federal da Paraíba, Brasil  
Email: [laodls@yahoo.com.br](mailto:laodls@yahoo.com.br)

### Resumo

Arbovírus transmitidas pela fêmea do *Aedes aegypti* são consideradas um problema de saúde pública. Dessa forma, o controle vetorial é essencial para a diminuição da disseminação dos patógenos causadores de doenças. O objetivo desta pesquisa foi investigar a composição química do extrato da biomassa de *Streptomyces hygroscopicus* e suas capacidades larvicidas para *Aedes aegypti*. Em relação ao resultado da prospecção da composição química do extrato, com base na metodologia qualitativa colorimétrica da presença de metabólitos secundários, houve indicativo positivo para o teste de alcalóides e negativo para flavonoides. Ademais, por intermédio da Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível inferir a presença, em maior quantidade, do ácido 9-12-octadecadienóico, seguindo pela presença do ácido 9-12-octadecadienóico e do ácido linoleico. Em relação a atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, a CL50 do extrato diluído com DMSO a 1% foi de 155,4 ppm e a mortalidade máxima foi de 100% em 250 ppm. Por fim, foi visto que o extrato oleoso da biomassa de *S. hygroscopicus* foi capaz de atuar nas larvas de *Ae. aegypti*, mostrando-se como potencial larvicida para essa espécie.

**Palavras-chave:** Bioinseticida; Cromatografia gasosa; Metabólitos secundários.

### Abstract

The arboviruses transmitted by the female *Aedes aegypti* are considered a public health problem and the vector control is essential to reduce the spread of disease-causing pathogens. The main objective of this research was to investigate the chemical composition of the *Streptomyces hygroscopicus* biomass extract and its larvicidal capabilities against the *Aedes aegypti* mosquito. Regarding the result of the prospection of the chemical composition of the extract, based on the qualitative colorimetric methodology of the presence of secondary metabolites, there was a positive indication for the alkaloid test and a negative one for flavonoids. Through Gas Chromatography coupled to mass spectrometry it was possible to infer the presence of 9-12-octadecadienoic acid followed by the presence of 9-12-octadecadienoic acid and linoleic acid. The larvicidal activity against *Ae. aegypti* (LC50) of the extract diluted with 1% DMSO was 155.4 ppm, the highest mortality was with 250ppm reaching 100 percent. Finally, it was seen that the oily extract of *S. hygroscopicus* biomass was able to act on *Ae. aegypti*, showing as a potential larvicidal for this species.

**Keywords:** Bioinsecticide; Gas chromatography; Secondary metabolites.

### Resumen

Los arbovirus transmitidos por la hembra *Aedes aegypti* son considerados un problema de salud pública. El control de vectores es esencial para reducir la propagación de patógenos causantes de enfermedades. El objetivo de esta investigación fue investigar la composición química del extracto de biomasa de *Streptomyces hygroscopicus* y sus capacidades larvicidas contra el mosquito *Aedes aegypti*. En cuanto al resultado de la prospección de la composición química del extracto, con base en la metodología colorimétrica cualitativa de presencia de metabolitos secundarios, se obtuvo un indicador positivo para la prueba de alcaloides y negativo para flavonoides. Además, mediante

cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massas, se pudo inferir la presencia, en mayor cantidad, de ácido 9-12-octadecadienoico, seguido de la presencia de ácido 9-12-octadecadienoico y ácido linoleico. En cuanto a la actividad larvicida frente a *Ae. aegypti*, la CL50 del extracto diluido con DMSO al 1% fue de 155,4 ppm, la mayor mortalidad fue con 250 ppm llegando al 100%. Finalmente, se vio que el extracto oleoso de biomasa de *S. hygroscopicus* fue capaz de actuar sobre *Ae. aegypti*, mostrándose como una potencial larvicida para esta especie.

**Palabras clave:** Bioinsecticida; Cromatografía de gases; Metabolitos secundarios.

## 1. Introdução

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é um vetor de transmissão de arboviroses alarmantes para a saúde pública brasileira, como a dengue, Zika e chikungunya (Brasil, 2016). O *Ae. aegypti* possui um comportamento endofílico e antropofílico, sendo considerado como inseto holometábolo que apresenta uma metamorfose completa no seu ciclo evolutivo com as fases de ovo, larva (L1, L2, L3 E L4), pupa e adulto (Consoli & Oliveira, 1994). O seu ciclo de vida é considerado curto, em média 10 dias, no qual as fêmeas depositam seus ovos em locais que podem acumular água, denominados de criadouros (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Atualmente, para o controle do mosquito, têm-se adotado Manejo Integrado de Vetores (MIV) recomendando pela OMS (2012), que consiste no uso integrado de diferentes ferramentas e abordagens para o controle vetorial adaptadas à realidade das áreas afetadas. Neste sentido, diferentes métodos são empregados para diminuir a densidade populacional dos mosquitos, seja na gestão ambiental, uso de larvicidas seletivos, controle mecânico ou genéticos, entre outros (Achee et al., 2019). No entanto, como o inseto possui um ciclo curto de vida, com uma alta reprodutividade e adaptação no ambiente urbanizado, o controle desse animal é desafiador (Lopez et al., 2019).

Sendo assim, a busca por moléculas que possuam bioatividades contra o mosquito *Ae. aegypti* é uma tarefa que demanda permanente esforço sob o ponto de vista científico. Grande parte das pesquisas que prospectam metabólitos que possuam ação larvicida baseia-se na investigação de microrganismos capazes de produzir metabólitos que possuam essas características (Amelia-Yap et al., 2022). As espécies do gênero *Streptomyces*, que pertencem ao filo Actinobacteria, são amplamente estudadas em relação as suas capacidades de produção de vasto espectro de metabólitos secundários, sendo esses metabólitos sintetizados por meio da base que originam os metabólitos simples do metabolismo anfibólico (Bilyk & Luzhetskyy, 2016; Sayed et al., 2019; Sivakala et al., 2021). Dentro do gênero *Streptomyces*, a espécie *Streptomyces hygroscopicus* ganha destaque neste projeto devido ser uma espécie pouco estudada em relação à produção de biomoléculas. Portanto, esse trabalho objetiva produzir um extrato da biomassa de *S. hygroscopicus*; prospectar a composição química do extrato dessa biomassa e estudar as capacidades larvicidas do referido extrato contra o mosquito *Ae. aegypti*.

## 2. Metodologia

### 2.1 Obtenção do extrato de *S. hygroscopicus*

O fungo *S. hygroscopicus* foi obtido da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de identificação UFPEDA3370. Para o processo, *S. hygroscopicus* foi semeado em meio líquido ISP2 para obtenção do pré-inóculo da fermentação. A fermentação foi realizada em biorreator New Brunswick Scientific BIOFLO 110 utilizando 3 L de meio líquido MPE, no qual 300 mL de pré-inóculo foram adicionados. Em sequência, na biomassa foi adicionada, inicialmente, o solvente hexano 1:1 e posteriormente o solvente acetato de etila nas proporções de 1:1. Por fim, a mistura foi filtrada a vácuo, o solvente orgânico presente no sobrenadante foi evaporado no rotaevaporador e o extrato foi submetido às avaliações seguintes.

## 2.2 Análise qualitativa da detecção de metabólitos secundários

Análises preliminares objetivando identificar a presença de flavonoides e alcaloides presentes no extrato da biomassa de *S. hygrosopicus* foram realizadas por meio de reações químicas. Para a presença de flavonoides, foram adicionados em um béquer 10,36 mg do extrato com 5 mL de metanol, 1 mL de HCl e 1 cm de fita de magnésio totalizando 43 mg e, desse modo, o frasco foi encubado por 15 minutos até o surgimento de coloração rosada como indicativo da presença de flavonoides (Silva et al., 2013). Para avaliar a presença de alcaloides, foi utilizado o teste de revelador *Dragendoff* na qual a presença de um precipitado no meio é um indicativo positivo de alcaloides (Wagner, 1996).

## 2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O extrato de *S. hygrosopicus* foi submetido a uma Cromatografia Gasosa acoplado ao Espectrômetro de massas (CG-MS) (Shimadzu). Para análise por CG-SM, foi utilizada uma coluna capilar HP-5 de 30m x 0,25 mm (5%-fenil)-metilpolisiloxano com espessura de filme de 0,25 mm. A interpretação do espectro de massas foi feita com base na biblioteca de compostos químicos do *National Institute Standard and Technology* (NIST).

## 2.4 Atividade inseticida do extrato de *S. hygrosopicus* sobre as larvas de *Ae. Aegypti*

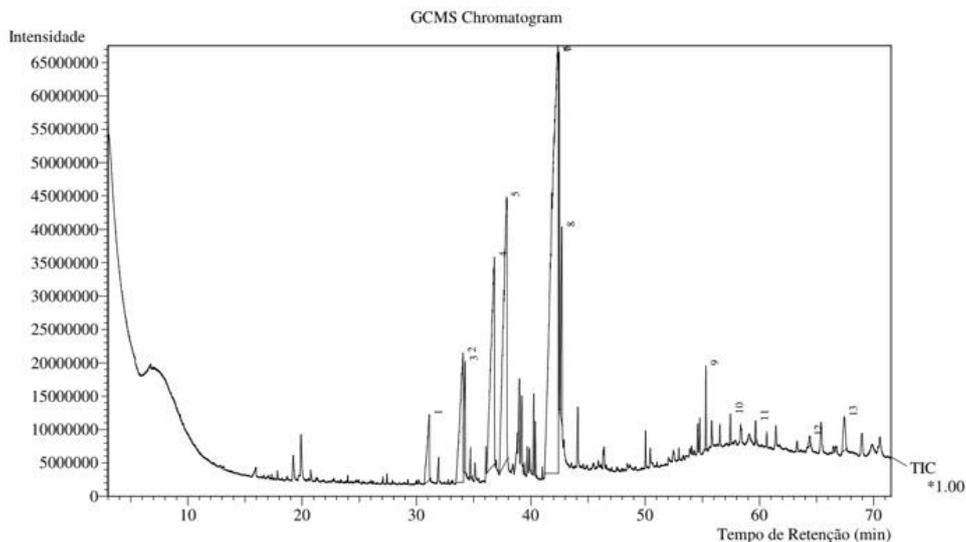
Os testes da atividade inseticida do extrato de *S. hygrosopicus* foram realizados seguindo as recomendações da WHO (2005). Inicialmente, vinte larvas no estágio L4 foram adicionadas em tubos de ensaios contendo 30 mL de diferentes concentrações do extrato dissolvidos em DMSO a 1%. Para controle positivo, foi utilizado o inseticida comercial *Straik* Mata-larvas e no controle negativo apenas água destilada. As larvas foram incubadas em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a  $26\pm 2$  °C e com fotoperíodo simulando o ciclo circadiano. Os testes foram realizados em triplicada e, após 24 h, foram contabilizados os números totais de larvas mortas e, como consequência, foi possível obter a determinação da concentração letal média (CL50) do extrato com auxílio da análise de variância (ANOVA).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Compostos presentes no extrato de *S. hygrosopicus*

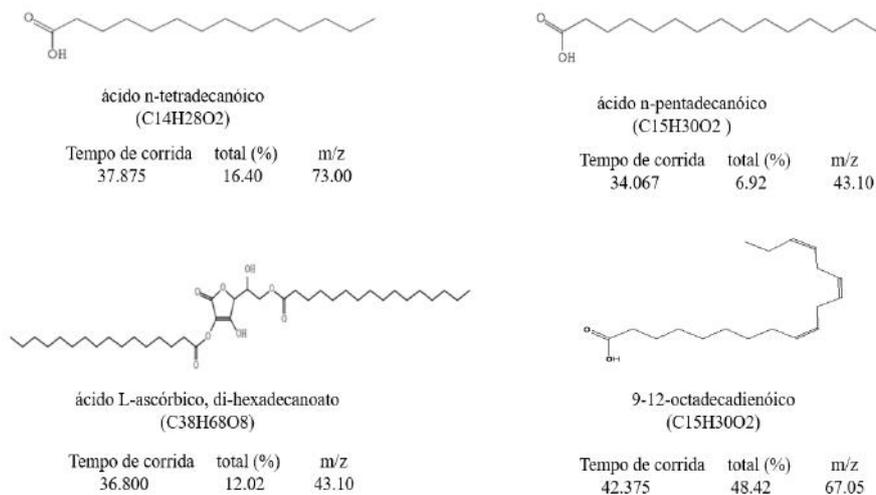
Por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível comparar os padrões de fragmentação com espectro de massas da biblioteca de *National Institute Standard and Technology*. Os resultados dos picos do extrato estão exibidos na Figura 1 e as moléculas do extrato na Figura 2.

**Figura 1** - Espectrometria de massas do extrato de *S. hygroscopicus*.



Fonte: Autores (2022).

**Figura 2** - Estruturas das moléculas do extrato de *S. hygroscopicus* obtidas por meio de espectrometria de massas e comparadas com a biblioteca do NIST.



Fonte: Autores (2022).

A molécula mais predominante no extrato com representatividade de 42% foi o ácido 9-12-octadecadienoico que é o ácido linoleico (AL). Esse ácido graxo é conhecido por possuir diversas atividades bioativas principalmente relacionada à saúde humana, incluindo redução da carcinogênese, inflamação, diabetes, entre outros (Bergamo et al., 2014). O acúmulo de ácidos graxos intracelular em *Streptomyces* já é reportado na literatura, tendo em vista que muitas espécies desse gênero são consideradas bactérias oleaginosas (Rottig et al., 2017). Para a produção desses lipídeos, os *Streptomyces* possuem vias bastante complexas, na qual há a participação de diversos tipos enzimático que podem participar tanto da produção de ácidos graxos como a síntese de policetídeos (Rottig et al., 2017). Outros compostos que se apresentaram em menor quantidade no

extrato foram o ácido pentadecanóico e o ácido tetradecanóico, esses já foram encontrados em estudos anteriores utilizando linhagens de *Streptomyces*, no qual o ácido pentadecanóico apresenta-se em maior recorrência em aparecimento no extrato de em outras linhagens do gênero *Streptomyces* (Rottig et al., 2017; Desbois & Smith, 2010).

### 3.2 Metabólitos secundários presentes no extrato

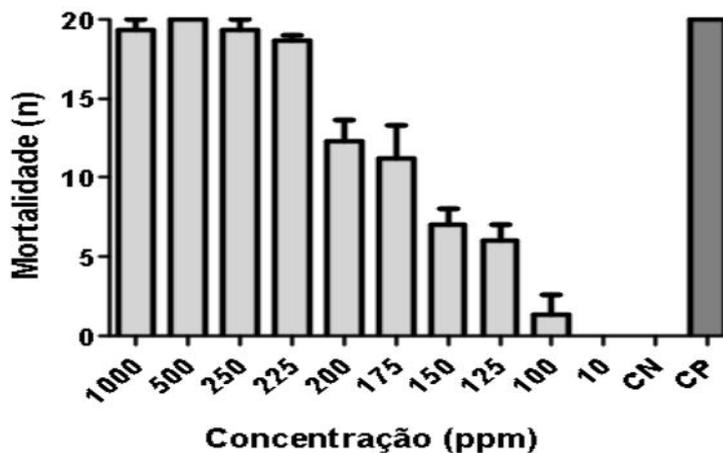
Diferentes classes de compostos químicos do metabolismo secundário são encontradas em extratos provindos de culturas de *Streptomyces* sp. Ao realizar o teste qualitativo para flavonóides e alcalóides no extrato acetato de etila de *S. hygroscopicus*, os resultados foram positivos para o teste de alcalóides e negativo para flavonoides (Jaivel et al., 2014). Sabe-se que as variedades de alcalóides são produzidas por vários organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas, como metabólitos secundários que exibem bioatividades úteis. Os alcalóides foram originalmente definidas como compostos orgânicos de origem vegetal que possuem bioatividades fortes e exibem basicidade que é atribuído a presença de nitrogênio (Kishimoto et al., 2016).

### 3.3 Atividade inseticida do extrato de *S. hygroscopicus* sobre as larvas de *Ae. Aegypti*

Por intermédio das análises das mortalidades das larvas de *Ae. aegypti*, foi possível obter a Figura 3 que mostra a relação de toxicidade e ppm da amostra do extrato utilizado no teste. Com base na interpretação dos resultados, a concentração letal para matar 50% das larvas (CL50) foi na concentração de 155,4 ppm do extrato em 24 horas de experimento. As concentrações de 1000, 500 e 250 ppm promoveram, estatisticamente, a mesma capacidade de mortalidade, enquanto que na concentração de 100 ppm houve significativa redução da atividade inseticida e a concentração de 10 ppm do extrato não mostrou nenhuma atividade inseticida. Nos estudos de Amelia-Yap et al., (2023), o extrato do gênero *Streptomyces* sp. KSF103 em acetato de etila apresentou atividade larvicida para *Aedes albopictus*, *Anopheles cracens* e *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, no qual o LC50, nesse mosquito, foi alcançado com 0,045 mg/mL do extrato. Outrossim, no trabalho de Ganesan et al., (2018), o extrato *Streptomyces enissocaesilis* S12-17 promoveu uma mortalidade 100% em *Ae. aegypti* na concentração de 500 ppm, corroborando com os dados deste presente trabalho com a capacidade do gênero *Streptomyces* de atuar com potencial larvicida.

Quantos as moléculas do extrato com possível atividades larvicidas, o ácido linoleico que foi o componente majoritário no extrato já foi reportado na literatura com atividades contra larvas de insetos em trabalhos anteriores, como contra os insetos *C. pipiens pallens*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Culex quinquefasciatus* (Samy & Chow, 2011; Melo et al., 2018). Apesar de não mostrar em concentrações significativas na espectrofotometria, nos testes colorimétricos preliminares mostraram a presença de alcalóides, podendo ser essa molécula estar contribuindo para capacidade larvicida do extrato, como mostrado no trabalho anteriores sobre do potencial de alcalóides contra a *Ae. aegypti* (Mesi et al., 2016; Farouil et al., 2023).

**Figura 3** - Mortalidades das larvas de *Ae. aegypti* promovidas pelo extrato de *S. hygroscopicus*.



Fonte: Autores (2022).

#### 4. Considerações Finais

O extrato oleoso da biomassa de *S. hygroscopicus* foi capaz de atuar nas larvas de *Ae. aegypti*, mostrando-se como potencial capacidade larvicida para essa espécie. Como perspectiva futura, o extrato pode ser utilizado para testes adicionais, como os testes de toxicidade em pulpas e adultos de *Ae. aegypti*, assim como testes em organismos não alvos, como testes em microcrustáceos (*Artemia salina*) ou ensaios de fitotoxicidade e, dessa forma, promover a usabilidade de biomoléculas ativas de *S. hygroscopicus* como novas formas de controle desse inseto atendendo, assim, às demandas sociais e ambientais.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas e apoio financeiro. Autores também são gratos ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Parasitas e Vetores (LAPAVET – UFPB) e ao Laboratório de Biologia de microrganismos (BIOMICRO – UFPB) pelo apoio técnico nas realizações das pesquisas deste projeto.

#### Referências

- Achee, N. Grieco, J. P., Vatandoost, H. Seixas, G., Pinto, J. Ching-NG, L., Martins, & Vontas, J. (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(1), 1-22. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- Amelia-Yap, Z. H., Azman, A. S., AbuBakar, S., & Low, V. L. *Streptomyces* derivatives as an insecticide: Current perspectives, challenges and future research needs for mosquito control, *Acta Tropica*, *229*, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106381>.
- Bergamo, P., Luongo, D., Miyamoto, J., Cocca, E., Kishino, S., Ogawa, J., Tanabe, S., & Rossi, M. (2014). Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, associated with improved antioxidant/detoxify. *Journal of Functional Foods*, *11*, 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.007>
- Bilyk, O., & Luzhetskyy, A. (2016) Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Curr Opin Biotechnol*, *42*(1), 98-107. [10.1016/j.copbio.2016.03.008](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.008).
- Brasil - Ministério da Saúde. (2016). Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.
- Consoli, R. A. G. B., & Oliveira, R. L. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil (Vol. 1). Fiocruz.

- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642. 10.1007/s00253-009-2355-3
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia Médica (Vol 1)*. Universidade de São Paulo.
- Farouil, L., Duchaudé, Y., Zozo, L., Sylvestre, M., Lafay, F., Marote, P., & Cebrian-Torrejon, G. Cyclic voltammetry of immobilized particles as an alternative pesticide screening method for *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Solid State Electrochem*, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s10008-023-05398-w>
- Ganesan, P., Andand, S., Sivanandhan, S., David, R. H. A., Paulraj, M. G., Al-Dhabi, N. A., & Ignacimuthu, S. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Streptomyces enissocaesilis* (S12–17) isolated from Western Ghats of Tamil Nadu India. *J. Entomol. Zool. Stud*, 6(2), 1828–1835, 2018.
- Hwang, K. S., Kim, H. U., Charusanti, P., Palsson, B., & Lee, S. Y. (2014). Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 32(2), 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.008>
- Jaivel, N., Uvarani, C., Rajesh, R., Velmurugan, D., & Marimuthu, P. (2014). Natural occurrence of organofluorine and other constituents from *Streptomyces* sp. TC1. *J Nat Prod*, 77(1), 2-8. <https://doi.org/10.1021/np400360h>
- Janaki, T. (2016). Larvicidal activity of *Streptomyces cacaoui* subsp. *cacaoui*-M20 against *Aedes aegypti*. *International Journal of Botany Studies*, 1(2), 47-49.
- Kishimoto, S., Sato, M., Tsunematsu, Y., & Watanabe, K. (2016). Evaluation of Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. *Molecules*, 21(8), 1078. <https://doi.org/10.3390/molecules21081078>
- Lopez, S. B. G., Ribeiro, V. G., Rodriguez, J. V., Dorand, F. A. P. S., Salles, T. A.; Guimarães, T. S., Alvarenga, E. S. L., Melo, A. C. A., Almeida, R. V., & Moreira, M. F. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Sci. Rep*, 9, 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39666-5>
- Masi, M., Cala, A. Tabanca, N., Cimmino, A., Grenn, I. R., Bloomquist, J. R., Macias, F. A., & Evidente, A. (2016). Alkaloids with Activity against the Zika Virus Vector *Aedes aegypti* (L.)- Crinsamine and Sarniensinol. Two New Crinine and Mesembrine Type Alkaloids Isolated from the South African Plant *Nerine sarniensis*. *Nature proceeding*, 21(11). 10.3390/molecules21111432
- Melo, A. R., Garcia, I. J., Serrão, J. E., Santos, H. L., Lima, L. A. R. S., & Alves, S. (2018). N.Toxicity of different fatty acids and methyl esters on *Culex quinquefasciatus* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154(1), 1-5. 10.1016/j.ecoenv.2018.02.009.
- Naine, J., & Devi, S. C. (2014). Larvicidal and Repellent Properties of *Streptomyces* sp. VITJS4 Crude Extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Polish journal of microbiology*, 63(3), 341-348. 10.22073/pjm-2014-045
- Rottig, A., Atasayar, E. J. P., Sproer, C. Schumann, P., Schauer, J., & Steinbuchel, A. (2017). *Streptomyces jeddahensis* sp. nov., an oleaginous bacterium isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1676-1682. 10.1099/ijsem.0.001839
- Samy, R. P., & Chow, V. T. K. (2011) Antimicrobial and Phytochemical Analysis of *Centella asiatica* (L.) R. *Nature proceeding*, 1. hdl:10101/npre.2011.6033
- Sayed, A. M., Hassan, M. H. A., Alhadrami, H. A., Hassan, H. M., Goodfellow, M., & Rateb, M. E. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. *J. Appl. Microbiol*, 128(3), 630-657, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14386>
- Silva, R. M. F., Ribeiro, J. F. A., Freitas, M. C. C., Arruda, M. S. P., Nascimento, M. N., Barbosa, W. L. R., & Rolim Neto, P. J. (2013). Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). *Rev. Bras. Pl. Med*, 15(4), 717-726. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500012>
- Sivakala, K. K., Gutiérrez-García, K., Jose, P. A., Thinesh, T., Anandham, R., Barona-Gómez, F., & Sivakumar, N. Desert environments facilitate unique evolution of biosynthetic potential in *Streptomyces*. *Molecules*, 26(3), 588, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26030588>.
- Tan, L. T., Ser, H. L. Yin, W. F., Chan, K. G. Lee, L. H., & Goh, B. H. (2015). Investigation of Antioxidative and Anticancer Potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 Isolated from Malaysia Mangrove Soil. *Front. Microbiol*, 6, 1316. <https://doi.org/10.3389>
- Wagner, H. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography (2a ed.)*. Springer.
- World Health Organization – WHO. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides (pp. 1-41).
- WHO. (2012). Handbook for integrated vector management. Geneva: World Health Organization.