



UFAL

**Universidade Federal de Alagoas**  
Instituto de Química e Biotecnologia

*Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*  
*PPGQB*



IQB

**Estudo de Novos Atraentes de Oviposição de Fêmeas do  
Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:  
Culicidae)**

SIVALDO SOARES PAULINO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MARIA CRISTINA  
CAÑO DE ANDRADE

Maceió - Alagoas  
Setembro de 2008



**Universidade Federal de Alagoas**  
Instituto de Química e Biotecnologia

*Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*  
*PPGQB*



**Estudo de Novos Atraentes de Oviposição de Fêmeas do Mosquito *Aedes aegypti*  
(Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**

**SIVALDO SOARES PAULINO**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química e Biotecnologia da  
Universidade Federal de Alagoas, para a  
obtenção do Título de mestre em  
Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> MARIA CRISTINA  
CAÑO DE ANDRADE

Maceió - Alagoas  
Setembro de 2008

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

- P328e Paulino, Sivaldo Soares.  
Estudo de novos atraentes de oviposição de fêmeas do mosquito *aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) / Sivaldo Soares Paulino. – Maceió, 2008.  
88 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Maria Cristina Caño de Andrade.  
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2008.
- Bibliografia: f. 77-84.  
Anexos: f. 85-88.
1. *Aedes aegypti*. 2. Oviposição. 3. Suportes de oviposição. 4. Ecologia agrícola. I. Título.

CDU: 595.771



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas  
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389  
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970  
Maceió-AL  
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Sivaldo Soares Paulino intitulada: “**Estudo de Novos Atravesantes de Oviposição de Fêmeas do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 25 de setembro de 2008, às 14hs na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Caño de Andrade  
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Fernando Antônio Cavalcante de Mendonça  
UNEB

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano  
PPGQB/IQB/UFAL

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Caño de Andrade pela orientação, amizade e pelo incentivo permanente na realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, Dr. João Xavier de Araújo Júnior, Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Conserva, Dr<sup>a</sup>. Lúcia Maria Cunha Rebouças, Dr<sup>a</sup>. Margarida Maria dos Santos Humberto e Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart pelos preciosos ensinamentos.

Aos Professores Dr. Luiz Carlos Caetano (exame de qualificação e defesa), Dr<sup>a</sup>. Cristiane Xavier Galhardo (exame de qualificação) e Dr. Fernando Antônio Cavalcante de Mendonça (exame de defesa) pelas correções e sugestões tão importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do laboratório Valéria Batista, Gicélia Santos Nascimento, Valéria Rodrigues de Albuquerque, Jademilson Celestino dos Santos; Kátia Helena Monteiro, Regilene de Lima, Alexis Curtright, Daniel Silva Fortes, Sivonaldo Silva, Antônio Franklin, Midian Guedes de Azevedo, Chloe Stenkamp-Strahm, Olivia Schinski e Rafael Ferreira da Silva.

Ao Aldy dos Santos, pela ajuda indispensável na preparação de vidrarias utilizados em nossos experimentos, assim como sua gentileza.

À equipe técnica do NEAL (Núcleo de Entomologia de Alagoas/FUNASA): Edson D. Pacheco, João P. dos Santos, Nelson N. F. Cavalcanti, Genival M. Lins e José O. A. Ferreira pelo fornecimento de ovos do mosquito *Ae. aegypti* e da infusão de feno, assim como pelo desenvolvimento do trabalho de campo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de Mestrado.

À equipe do Instituto Rothamsted Research: Aos Professores Dr. John Pickett, Dr. Mike Birkett pelos espectros de GC-MS e Dr. James Logan pelos estudos eletrofisiológicos.

Ao meu pai Luíz de Magalhães Paulino, minha mãe Josefa Soares Paulino, aos meus irmãos e aos meus amigos.

A todos que de uma maneira ou de outra ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que se sacrificam pelos seus sonhos, mostrando que é possível sonhar e atingir seus objetivos, mantendo-se com os pés no chão e com humildade.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2 – OBJETIVOS</b>	03
<b>2.1 – Geral</b>	03
<b>2.2 – Específicos</b>	03
<b>3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	04
<b>3.1 – A Dengue</b>	04
<b>3.1.1 – Impacto da Dengue no Mundo</b>	04
<b>3.1.2 – A Dengue no Brasil</b>	05
<b>3.2 – O mosquito <i>Aedes aegypti</i> e o Ciclo Biológico</b>	06
<b>3.3 – Controle do Vetor</b>	09
<b>3.3.1 – Controle Químico</b>	09
<b>3.3.2 – Controle Biológico</b>	11
<b>3.3.3 – Controle Físico</b>	12
<b>3.3.4 – Armadilhas de Oviposição</b>	12
<b>3.4 – Vacina Tetravalente Contra os Vírus do Dengue</b>	13
<b>3.5 – Técnicas de Preparação de Amostras Orgânicas</b>	15
<b>3.5.1 – Extração em Fase Sólida</b>	15
<b>3.5.1.1 – Mecanismos de Separação da SPE</b>	16
<b>3.5.1.1a – Adsorção</b>	17
<b>3.5.1.1b – Partição</b>	17
<b>3.5.1.1c – Troca iônica</b>	18
<b>3.5.1.1d – Exclusão por tamanho</b>	18
<b>3.5.1.2 – Como utilizar a extração em fase sólida</b>	18

3.5.1.2a – O condicionamento da fase estacionária -----	19
3.5.1.2b – A concentração dos analitos -----	19
3.5.1.2c – A remoção dos interferentes -----	20
3.5.1.2d – A eluição dos analitos -----	20
3.5.2 – Extração Líquido-Líquido (LLE) -----	21
3.5.2.1 – Coeficiente de partição e razão de distribuição -----	22
3.5.2.2 – Extração líquido-líquido sem reações secundárias -----	23
3.5.3 – Extração por Sorção em Barras de Agitação (SBSE) -----	24
3.5.3.1 – Considerações Práticas da Barra de Agitação -----	27
3.5.3.2 – Realização da SBSE -----	28
3.6 – Infusões e compostos atraentes e/ou estimulantes do comportamento de oviposição -----	29
3.7 – A planta <i>Aloe vera</i> -----	30
4 – EXPERIMENTAL -----	31
4.1 – Materiais e Métodos -----	31
4.1.1 - Colônia de Mosquitos <i>A. aegypti</i> -----	31
4.1.2 – Gaiolas -----	31
4.1.3 – Suportes de Oviposição -----	31
4.1.4 – Águas Testes -----	32
4.1.5 – Solventes -----	32
4.1.6 – Nitrogênio -----	33
4.1.7 – Extração em Fase Sólida (SPE) -----	33
4.1.8 – Extração por Sorção com Magneto de Agitação (SBSE) -----	33
4.1.9 – Cromatografia Gasosa (GC) -----	34
4.1.10 – Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massa (GC-MS) -----	34
4.1.11 – Estudos eletrofisiológicos -----	34



4.1.12 – Análise estatística .....	35
4.1.13 – Testes de Campo .....	36
4.2 – Procedimento Experimental .....	37
4.2.1 – Formação da colônia de mosquitos da espécie <i>Aedes aegypti</i> .....	37
4.2.1.1 – Larvas .....	37
4.2.1.2 – Pupas .....	37
4.2.1.3 – Adultos .....	37
4.2.2 – Bioensaios Comportamentais de Oviposição .....	38
4.2.3 – Preparação das Águas Testes .....	38
4.2.3.1 – Infusão de <i>Aloe vera</i> (Babosa) (IB) .....	38
4.2.3.2 – Infusão de <i>Aloe vera</i> Concentrada (IBC) .....	39
4.2.3.3 – Infusão de Folhas de Bambu (IFB) .....	40
4.2.4 – Preparação de Amostras .....	41
4.2.4.1 – Extração Líquido-Líquido (LLE) .....	41
4.2.4.2 – Extração por Sorção em Barras de Agitação (SBSE) .....	41
4.2.4.3 - Extração em Fase Sólida (SPE) .....	42
4.2.5 – Destilação do Éter Dietílico .....	43
4.2.6 - Testes de Campo .....	43
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	45
5.1 – Bioensaios de Oviposição com Águas Provenientes de Criadouros de Campo ----	45
5.1.1 – Água coletada de pneu de trator (APT) .....	45
5.1.2 - Água proveniente de córrego do bairro do Trapiche (AT) .....	46
5.1.3 – Água coletada de criadouro artificial do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> (ACq) .....	47
5.1.4 – Água coletada de vaso com <i>Aloe vera</i> (Babosa) (AVB) .....	49
5.2 – Bioensaios de Oviposição com Infusões de Plantas Preparadas em Laboratório -	50

5.2.1 – Infusão de <i>Aloe vera</i> (Babosa) (IB) -----	50
5.2.2 – Infusão de babosa concentrada (IBC) -----	51
5.2.3 – Infusão de feno (IF) -----	52
5.2.4 – Infusão de folhas de bambu (IFB) -----	53
5.3 – Bioensaios de Oviposição com Extratos Etéreos de IBC -----	54
5.3.1 – Extração líquido-líquido I (LLE-I) -----	54
5.3.2 – Extração líquido-líquido II (LLE-II) -----	55
5.3.3 – Extração em fase sólida (SPE) -----	56
5.3.4 – Extração por sorção em barras de agitação (SBSE) -----	57
5.4 – Teste de um Novo Suporte de Oviposição -----	58
5.4.1 – Suporte Flutuante versus Suporte Cone em IBC a 10% -----	59
5.4.2 – Suporte Flutuante (T) versus Suporte Cone (C) em água destilada -----	60
5.4.3 – Suporte Flutuante (T) versus Suporte Cone (C) em água de feno (IF) -----	61
5.4.4 – Suporte Flutuante (T) versus Copo sem Suporte (C) em IBC a 10% -----	62
5.4.5 – Suporte Flutuante (T) versus Copo sem Suporte (C) em H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> -----	63
5.4.6 – Suporte Flutuante (T) versus Copo sem Suporte (C) em infusão de Feno (IF) -----	63
5.4.7 – Suporte Flutuante (T) versus suporte trapézio (C) em IBC -----	64
5.5 – Bioensaios de Oviposição com Extratos Etéreos de IBC Utilizando o Suporte Flutuante -----	66
5.5.1 – Extração líquido-líquido III (LLE-III) -----	66
5.5.2 – Extração líquido-líquido IV (LLE-IV) -----	67
5.6 – Testes de Oviposição Realizados em Campo -----	68
5.7 – Identificação dos Compostos Orgânicos Presentes na Infusão de <i>Aloe vera</i> -----	69
6 – CONCLUSÕES -----	75
7 – PERSPECTIVAS -----	76
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	77

<b>ANEXO 1</b> .....	85
<b>ANEXO 2</b> .....	86
<b>ANEXO 3</b> .....	87
<b>ANEXO 4</b> .....	88

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** A distribuição da dengue no mundo
- Figura 2:** Fêmea do mosquito *A. aegypti* realizando a hematofagia
- Figura 3:** Ciclo biológico do *A. aegypti*
- Figura 4:** Estrutura química do DDT
- Figura 5:** Estruturas químicas do paration e malation
- Figura 6:** Estruturas químicas da cipermetrina e do temefós
- Figura 7:** Síntese da fase reversa monofuncional C-8
- Figura 8:** Efeito do condicionamento do sorbente C-18 ligado à sílica
- Figura 9:** Diferentes etapas da SPE
- Figura 10:** Esquema da extração líquido-líquido sem reações secundárias
- Figura 11:** Polímero de polidimetilsiloxano (PDMS)
- Figura 12:** Recuperação teórica no equilíbrio (%) em função do soluto  $\log K_{o/w}$  para SPME (fibra de 100  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  PDMS) e SBSE (1 cm x 0,5 mm df, 25  $\mu\text{L}$  PDMS) e 10 mL de amostra
- Figura 13:** Esquema do revestimento da barra de agitação usada na técnica SBSE
- Figura 14:** Sistema de SBSE
- Figura 15:** Estrutura química do Isolute ENV<sup>+</sup>
- Figura 16:** Infusão de *Aloe vera* concentrada
- Figura 17:** Extração em fase sólida
- Figura 18:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente APT x  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- Figura 19:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente AT x  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- Figura 20:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente ACq x  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- Figura 21:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente AVB x  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- Figura 22:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IB x  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- Figura 23:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IBC x  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

**Figura 24:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IBC x IF

**Figura 25:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IFC x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Figura 26:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente LLE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Figura 27:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente LLE-II x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Figura 28:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente SPE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Figura 29:** Suporte de oviposição na forma cone

**Figura 30:** Suporte de oviposição flutuante

**Figura 31:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* suporte cone (SC) em IBC à 10%

**Figura 32:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* suporte cone (SC) em água destilada

**Figura 33:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* suporte cone (SC) em IF à 10%

**Figura 34:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* copo sem suporte (SS) em IBC a 10%

**Figura 35:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* copo sem suporte (SS) em água destilada

**Figura 36:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* copo sem suporte (SS) em IF a 10%

**Figura 37:** Suporte de oviposição trapézio

**Figura 38:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* suporte trapézio (ST) em IBC a 10%

**Figura 39:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente à LLE-III x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Figura 40:** Gráfico das análises estatísticas do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente à LLE-IV x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Figura 41:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti*: IBC x IF no campo

**Figura 42:** Cromatogramas da série homóloga dos alcanos e extrato LLE-III

**Figura 43:** Espectro de massa e fragmentação do 1-hexanol

**Figura 44:** Espectro de massa e fragmentação do ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico

**Figura 45:** Espectro de massa e fragmentação do 2-epoxibutanol

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Bioensaio de Oviposição: APT x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 2:** Bioensaio de Oviposição: AT x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 3:** Bioensaio de Oviposição: ACq x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 4:** Bioensaio de Oviposição: AVB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 5:** Bioensaio de Oviposição: IB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 6:** Bioensaio de Oviposição: IBC x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 7:** Bioensaio de Oviposição: IBC x IF

**Tabela 8:** Bioensaio de Oviposição: IFB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 9:** Bioensaio de Oviposição: LLE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 10:** Bioensaio de Oviposição: LLE-II x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 11:** Bioensaio de Oviposição: SPE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 12:** Bioensaio de Oviposição: SBSE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 13:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Cone (C)

**Tabela 14:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Cone (C)

**Tabela 15:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) X Suporte Cone (C)

**Tabela 16:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Copo sem Suporte (C)

**Tabela 17:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Copo sem Suporte (C)

**Tabela 18:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Copo sem Suporte (C)

**Tabela 19:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Trapézio (C)

**Tabela 20:** Bioensaio de Oviposição: LLE-III x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

**Tabela 21:** Bioensaio de Oviposição: LLE-IV x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – Angstrom

A<sub>aq</sub> – Concentração do analito na fase aquosa

AAS – Ácido acetilsalicílico

ACq – Água coletada de criadouro artificial do mosquito *Culex quinquefasciatus*

A<sub>org</sub> – Concentração do analito na fase orgânica

APT – Água coletada em pneu de trator

aq – Aquoso

AT – Água proveniente de córrego do bairro do Trapiche

AVB – Água coletada de vaso com *Aloe vera*

BHT – 2,6-bis(1,1-dimetil)-4-metilfenol

Bti – *Bacillus thurigiensis* HT-14

C – Controle

cm – Centímetros

C<sub>PDMS</sub> – Concentração de polidimetilsiloxano

C<sub>w</sub> – Concentração de água

D – Razão de distribuição

DDT – 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

DEN-1 – Vírus do dengue sorotipo 1

DEN-2 – Vírus do dengue sorotipo 2

DEN-3 – Vírus do dengue sorotipo 3

DEN-4 – Vírus do dengue sorotipo 4

Dest. – Destilada

EAG – Eletroantenografia

ENV<sup>+</sup> – Copolímero de divinilbenzeno poliestireno-hidroxilado

FHD – Febre hemorrágica do dengue

FID – Detector de ionização de chama

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

g – Gramas

GC – Cromatografia gasosa

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa



HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão  
IB – Infusão de *Aloe vera*  
IBC – Infusão de *Aloe vera* concentrada  
IF – Infusão de feno  
IFB – Infusão de folhas de bambu  
IST – International Sorbent Technology  
KD – Coeficiente de partição  
Ko/w – Coeficiente de partição octanol/água  
L1 – Larva de 1º estágio  
L2 – Larva de 2º estágio  
L3 – Larva de 3º estágio  
L4 – Larva de 4º estágio  
LaSIF - Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios  
LLE – Extração líquido-líquido  
LLE I a IV – Extração da extração líquido-líquido I a IV  
m/z – Massa sobre a carga  
mg – Miligramas  
min – Minutos  
mL – Mililitros  
mm – Milímetro  
m<sub>PDMS</sub> – Massa de polidimetilsiloxano  
MSPD - Dispersão da matriz em fase sólida  
m<sub>w</sub> – Massa de água  
n – Número de mol  
NEAL – Núcleo de Entomologia de Alagoas  
°C – Graus Celsius  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
org – orgânico  
P.A. – Grau analítico  
PDMS – Polidimetilsiloxano  
pH – Concentração hidrogeniônica  
pKa – Logaritmo negativo da constante de acidez  
ppm – Porcentagem por milhão

R – Alquílico  
RJ – Rio de Janeiro  
rpm – Rotação por minuto  
RR – Roraima  
SBPC – Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência  
SBSE – Extração por sorção com barras de agitação  
SPE – Extração em fase sólida  
SPE-GC – Extração em fase sólida acoplada à cromatografia gasosa  
SPE-I – Extrato da extração em fase sólida I  
SPME – Micro-extração em fase sólida  
*spp* – Todas as espécies  
T – Teste  
UV – Ultravioleta  
v/v – Volume por volume  
 $V_{\text{PDMS}}$  – Volume de polidimetilsiloxano  
 $V_{\text{W}}$  – Volume de água  
W. – *Wuchereria*  
XAD – Resinas poliméricas de estireno-divinilbenzeno e poliacrilato  
 $\beta$  – Razão de fase ( $V_{\text{W}}/V_{\text{PDMS}}$ )  
 $\mu\text{L}$  – Microlitros  
 $\mu\text{m}$  – Micrômetro

## RESUMO

Mosquitos hematófagos vetores de doenças tropicais representam uma grande ameaça à saúde pública global. Doenças transmitidas por mosquitos são normalmente endêmicas, e milhões de pessoas no mundo todo são infectados por mosquitos da Família Culicidae. O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é o principal vetor do vírus da dengue e da febre amarela urbana. A grande proliferação de diferentes espécies de mosquitos é não somente devido ao alto número de criadouros aquáticos nas grandes áreas urbanas, mas também devido ao desenvolvimento da resistência dos mosquitos aos inseticidas tais como os organoclorados, organofosfatos, carbamatos e também aos inseticidas biológicos. Assim, em respeito ao meio ambiente, o Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios (LaSIF) tem estudado nos últimos anos formas alternativas ecologicamente corretas, de controle e de vigilância de mosquitos hematófagos vetores de doenças tropicais. Portanto, estudos relacionados com os criadouros potenciais do mosquito *Ae. aegypti* foram realizados como uma forma de obter dados de como controlar as populações deste vetor. Primeiramente, foi realizado um estudo comportamental da seleção de sítios específicos de oviposição da fêmea do mosquito *Ae. aegypti* com diferentes amostras aquosas provenientes de criadouros artificiais e naturais. Dentre todas as diferentes amostras aquosas estudadas em laboratório, a infusão de *Aloe vera* (Liliaceae) foi considerada a mais estimulante do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *Ae. aegypti*. A amostra aquosa foi também testada em campo e comparada com a tradicional infusão atraente utilizada em programas de controle e vigilância do mosquito *Ae. aegypti*. Métodos de preparação de amostras tais como extração em fase sólida (SPE), extração por sorção com magneto de agitação (SBSE), assim como extração líquido-líquido (LLE) foram realizados para isolar os constituintes orgânicos presentes na infusão de *Aloe vera*. Os extratos obtidos pelas técnicas de extração também foram analisados em relação ao potencial estimulante de oviposição da fêmea do mosquito *Ae. aegypti*. A separação das substâncias orgânicas contidas nos extratos foi realizada através da cromatografia gasosa (GC). A identificação das substâncias isoladas foi realizada através do uso da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa de alta resolução (CG-MS), e a localização das substâncias eletrofisiologicamente ativas foi possível através da cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia (GC-EAG).

## ABSTRACT

Mosquito-borne viral tropical diseases represent a great threat to the global public health. Diseases transmitted by mosquitoes are usually endemic, and millions of people throughout the world are infected by mosquitoes of the Family Culicidae. The mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) is the main vector of the dengue viruses and the urban yellow fever. The great proliferation of the different mosquitoes species is not only due to the high number of the breeding sites in the urban areas, but also due to the development of the resistance of the mosquitoes to the insecticide, such as the chlorinated organic compounds, organophosphates, carbamates, as well as the biological insecticide. With respect to the environment, the Laboratory of Synthesis and Isolation of the Pheromones (LaSIF) has been studying in the last years more ecological alternatives of control and surveillance of mosquito-borne vector of tropical diseases. Therefore, studies related to the breeding sites of the mosquito *Ae. aegypti* were accomplished as a form of obtaining data on how to control the populations of this vector. A study of the selection of specific oviposition breeding sites of the *Ae. aegypti* female mosquito was accomplished with different aqueous samples collected from artificial and natural breeding sites. Among all the different aqueous samples studied at the laboratory, the *Aloe vera* (Liliaceae) infusion was considered greater stimulant of the oviposition behavior of the *Ae. Aegypti* female. The *Aloe vera* infusion was also bioassayed the field and compared with the traditional attractive infusion used in programs of control and surveillance of the mosquito *Ae. aegypti*. Sample preparation methods solid phase extraction (SPE), stir-bar sorptive extraction (SBSE), and liquid-liquid extraction (LLE), were accomplished to isolate the organic compounds present in the *Aloe vera* infusion. The extracts obtained by the extraction techniques were analyzed in relation to the stimulating potential of oviposition behavior of the female of the mosquito *Ae. Aegypti*. The separation of the organic substances contained in the extracts was accomplished through gas chromatography (GC). The identification of isolated substances was accomplished through to the use of high resolution gas chromatography coupled the mass spectrometry (CG-MS), and the active components in the extracts were located by coupled high resolution gas chromatography-electrophysiology (GC-EAG).

## 1 - INTRODUÇÃO

O mosquito antropofílico *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é o principal vetor do vírus da dengue e da febre amarela urbana, as quais são causadas por um arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) do gênero Flavivírus e da Família Flaviviridae. A febre amarela silvestre é transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* que adquirem o vírus de um macaco e transmitem ao homem através do ciclo macaco-mosquito-homem. O mosquito *A. (Stegomyia) albopictus* (Skuse) é o vetor secundário do vírus da dengue e tem mantido a prevalência da doença nas regiões asiáticas (RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998).

A grande proliferação destas diferentes espécies de mosquitos é não somente devido ao alto número de criadouros aquáticos nas grandes áreas urbanas, mas também devido ao desenvolvimento da resistência genética dos mosquitos aos inseticidas. A necessidade de uma alternativa perfeita nas estratégias de controle e monitoramento de insetos hematófagos é urgente.

Em respeito ao meio ambiente, uma nova mentalidade ecologicamente correta existe, com um grande número de pesquisadores no mundo todo com grande interesse em explorar o uso de atraentes e de feromônios, como uma alternativa para a tecnologia normalmente utilizada nos programas de controle e de vigilância de mosquitos. Muito deste otimismo em utilizar atraentes de insetos, é baseado no sucesso ocorrido no Zimbábue com a mosca tsé-tsé. Até meados dos anos 80 o controle da mosca era efetuado através da pulverização de endosulfan ou deltametrina no ar ou aplicação de DDT no solo. Finalmente, em 1991 o controle foi totalmente realizado através do uso de atraentes em conjunto com inseticidas (KLINE, 1994).

Grande ênfase também tem sido dada em relação ao papel e a identidade de semioquímicos mediadores do comportamento de oviposição em mosquitos, uma vez que a seleção do sítio de oviposição tem sido reconhecida como ponto crucial para a sobrevivência e a dinâmica da população de mosquitos (McCALL & CAMERON, 1995).

É de conhecimento que as substâncias voláteis emitidas de criadouros larvais têm sido envolvidas como mediadores potenciais do comportamento da oviposição. Estas substâncias podem ser feromônios de oviposição, ou mesmo atraentes de oviposição dissolvidos em águas de criadouros naturais ou de criadouros artificiais (BENTLEY & DAY, 1989).

Desde que a aquisição de patógenos pelas fêmeas de mosquitos vetores normalmente requer a realização de pelo menos um repasto sanguíneo, e, para que a transmissão da doença

ocorra, um ciclo de oviposição deve ser realizado antes que a transferência do patógeno possa ocorrer no repasto sanguíneo subsequente, a utilização de armadilhas contendo caromônios ou atraentes, particularmente, aqueles envolvidos na mediação do comportamento de oviposição de fêmeas em fase de postura, é uma excelente alternativa para o controle e o monitoramento de mosquitos hematófagos e de vetores de doenças tropicais.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Geral

Isolar atraentes e/ou estimulantes de oviposição do mosquito vetor da dengue *A. aegypti*, assim como na elaboração de novas metodologias que possam contribuir com o controle populacional e vigilância deste mosquito em áreas urbanas do Brasil.

### 2.2 - Específicos

- Encontrar sítios específicos de oviposição naturais e/ou artificiais;
- Realizar bioensaios de oviposição em laboratório com a utilização de águas contaminadas provenientes dos sítios de oviposição naturais e artificiais;
- Realizar bioensaios de oviposição em laboratório com infusões de plantas preparadas em laboratório;
- Estudar o comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* em diferentes suportes de oviposição;
- Isolar os atraentes e/ou estimulantes de oviposição de águas consideradas atraente/estimulantes do comportamento de oviposição com o uso de SPE (extração em fase sólida), LLE (extração líquido-líquido), assim como pelo uso da SBSE (extração por sorção com magneto de agitação);
- Realizar novos testes comportamentais de oviposição em laboratório com os extratos obtidos por SPE, LLE e SBSE;
- Identificar os atraentes e/ou estimulantes de oviposição através da utilização de equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de alta resolução, assim como pela utilização de equipamento de cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia;
- Confeccionar armadilhas de oviposição utilizando infusão atraente/estimulante de oviposição preparada em laboratório;
- Realizar testes de campo em áreas com alto índice de infestação do mosquito *A. aegypti* utilizando infusão atraente/estimulante de oviposição.

### **3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 – A Dengue**

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, do qual já são conhecidos quatro sorotipos distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, sendo transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* (FIOCRUZ, 2002).

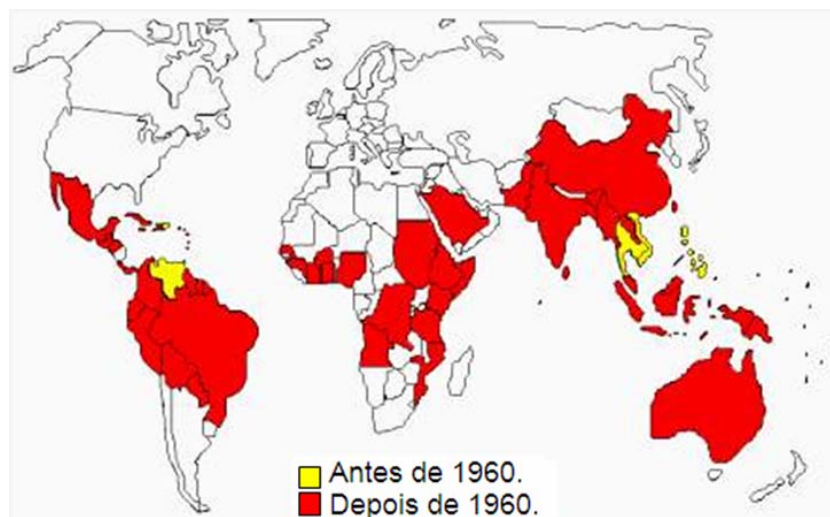
Os sintomas da dengue aparecem 3 a 14 dias após a picada do mosquito infectado. A febre de dengue é uma doença que afeta crianças, jovens e adultos. Os sintomas variam desde uma febre moderada à febre alta, com dor de cabeça severa, dor atrás dos olhos, nos músculos e dores nas articulações. Não há nenhuma medicina antivirótica específica para dengue, sendo importante manter a hidratação (OMS, 2008). Devem ser evitados o ácido acetilsalisílico (AAS) e seus derivados porque podem interferir no processo de coagulação, uma vez que o AAS reduz a adesão das plaquetas, e na dengue há uma diminuição do número de plaquetas. A dipirona também deve ser evitada, porque em algumas pessoas reduz a pressão arterial, o que pode ser confundida com a hipotensão (diminuição da pressão sanguínea abaixo do normal), sintoma que pode estar também presente na dengue (FRANÇA, 2008).

Na febre hemorrágica da dengue (FHD), que têm como sintomas, febre, dor abdominal, vômito e hemorragia, as complicações são potencialmente letais, afetando principalmente as crianças. O diagnóstico precoce e a administração clínica cuidadosa pelos médicos e enfermeiras experientes aumentam a chance de sobrevivência dos pacientes. A recuperação de pessoas infectadas causa imunidade vitalícia contra aquele sorotipo, mas confere apenas proteção parcial e passageira devido aos outros três sorotipos do vírus. Há evidências de que as infecções consecutivas aumentam o risco da doença mais séria que resulta em FHD (OMS, 2008).

##### **3.1.1 – Impacto da Dengue no Mundo**

Durante o século 19, a dengue foi considerada uma doença esporádica que causou longos intervalos de epidemias, devido à forma lenta de transporte. Hoje, a classificação da dengue é como doença virótica transmitida por um dos mosquitos mais importantes do mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência de dengue aumentou significativamente conforme mostra a Figura 1.





**Figura 1:** A distribuição da dengue no mundo (OMS, 2008)

Em 1998, ocorreu uma pandemia sem precedentes, na qual 1,2 milhões de casos de febre de dengue e FHD foram reportados em 56 países. Para o período entre 2001-2002 ocorreu uma situação de magnitude comparável. Em 2001, as Américas informaram mais de 652.212 casos de dengue das quais 15.500 eram de FHD, quase o dobro dos casos informados para a mesma região em 1995. O desafio para agências nacionais e internacionais de saúde é de inverter a tendência de aumento de dengue e de FHD (OMS, 2008).

Globalmente, aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde podem ser transmitidos os vírus da dengue. Nos últimos 25 anos, com o desenvolvimento das cidades, e de vários centros urbanos em regiões emergentes, houve também a expansão geográfica do vetor da dengue e do vírus, levando ao ressurgimento global de febre da dengue e o aparecimento de febre hemorrágica da dengue. Os seres humanos são os principais anfitriões na ampliação do vírus, embora algumas pesquisas mostrem que em algumas partes do mundo, os macacos infectados possam ser fontes do vírus para mosquitos não infectados (OMS, 2008).

### **3.1.2 – A Dengue no Brasil**

Em 1923, em Niterói/RJ foram relatados os primeiros casos de dengue no Brasil, confirmados apenas clinicamente, sem confirmação laboratorial. De novembro de 1981 até o mês de março de 1982, ocorreu uma epidemia na cidade de Boa Vista/RR, sendo isolados os sorotipos DEN-1 e DEN-4 (FUNASA, 2001).

Em abril de 1986, ocorreu nova epidemia de dengue no Brasil, desta vez na região sudeste, diminuindo os níveis de incidência a partir de julho-agosto de 1987. Ocorreu então a disseminação do sorotipo viral para outros estados, tais como Alagoas (julho de 1986) e Ceará (setembro de 1986), no ano de 1987, mais quatro estados foram atingidos: Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (PONTES & RUFFINO-NETTO, 1994).

Dificuldades na implementação de um eficiente programa de controle do vetor resultaram na rápida disseminação do vírus e epidemias em vários estados. A situação se agravou no ano de 1990 pela introdução do sorotipo DEN-2 no Rio de Janeiro e os primeiros casos de dengue hemorrágica no Brasil. Ausente nas Américas por mais de 15 anos, o vírus DEN-3 foi novamente introduzido em 1994, alcançou o Brasil em 2000, se espalhou, e causou uma severa epidemia de dengue no verão de 2001-2002. Os três tipos de vírus da dengue se espalharam através do país, e no final de 2006, 25 de 27 estados brasileiros reportaram epidemias de dengue (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Somente no ano de 2007 foram registrados 536.519 casos de dengue, com 1.273 casos confirmados de dengue hemorrágica e 136 mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em função da circulação de três sorotipos do vírus da dengue, o número de casos da FHD vem aumentando no país. Em 2008, de janeiro a abril, foram registrados 230.829 casos suspeitos de dengue, 1.069 casos confirmados de FHD e a ocorrência de 77 óbitos por FHD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

### **3.2 – O Mosquito *Aedes aegypti* e o Ciclo Biológico**

O mosquito *A. aegypti*, assim como o *A. albopictus* pertencem ao Filo Arthropoda (patas articulados), Classe Insecta (três pares de patas), Ordem Diptera (duas asas), Família *Culicidae* e Gênero *Aedes* (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O mosquito *A. aegypti* (Figura 2) teve sua origem no velho Mundo (parte do mundo constituída pelo continente eurasiático e pela África), provavelmente na região da Etiópia (nordeste da África), sendo descrito originalmente no Egito (OMS, 2008). A espécie foi introduzida no Brasil durante o período colonial, provavelmente durante tráfego de navios negreiros (para trabalhos escravos), por via marítima (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos geralmente adquirem o vírus enquanto se alimentam do sangue (hematofagia) de uma pessoa infectada. A incubação do vírus ocorre entre 8 a 10 dias, ficando assim hábil para infectar, e no momento da hematofagia ocorre transmissão viral. A fêmea do mosquito infectado também pode transmitir o vírus para outras gerações através da

transmissão transovariana (pelos ovos), mas a forma desta suspeita de transmissão de vírus a humanos ainda não foi esclarecida (OMS, 2008).

O repasto sangüíneo quase sempre ocorre durante o dia, nas primeiras horas do período matutino (7 às 10 horas) e vespertino (16 às 19 horas). Constituem fonte de repasto para fêmeas de *A. aegypti* a maioria dos vertebrados, inclusive o homem. Entretanto, as fêmeas do mosquito têm preferência pelos seres humanos (antropofilia), picando os homens preferencialmente nos pés e nas partes inferiores das pernas (EIRAS, 2005).



**Figura 2:** Fêmea do mosquito *A. aegypti* realizando a hematofagia (Rothamsted Research)

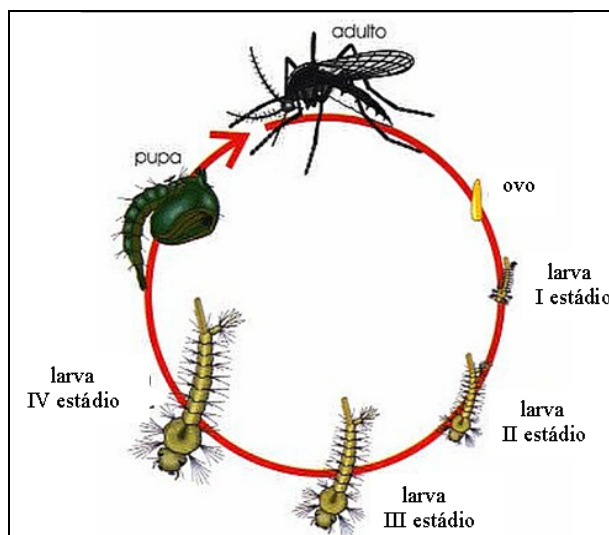
O intervalo médio entre a alimentação e a postura é de três dias em condições adequadas de temperatura (25°C) e umidade relativa (75%) (EIRAS, 2005). A fêmea grávida é atraída por recipientes escuros e sombreados com superfícies ásperas. Geralmente, a fêmea faz uma postura de ovos a cada repasto sangüíneo. Em cada postura são liberados cerca de 50 a 70 ovos, distribuídos aos poucos em diferentes criadouros. Este tipo de comportamento faz aumentar as chances de sobrevivência dos seus descendentes, garantindo o sucesso reprodutivo e a dispersão do *Aedes ssp* (BENTLEY & DAY, 1989).

Os criadouros preferenciais do *A. aegypti* podem ser artificiais ou naturais. Os criadouros artificiais são os pneus usados, cisternas de concreto, recipientes descartáveis (plástico, metal, vidro e etc.), onde após uma chuva ou mesmo com o desperdício retêm água parada, se transformando no local ideal para a fêmea colocar seus ovos. Os criadouros naturais são os troncos de árvore, os internódios de bambus, assim como as plantas que retêm água (como as bromélias).

Durante o repasto sangüíneo quando a fêmea é perturbada, mesmo que suavemente, ela foge voltando a atacar o mesmo hospedeiro ou outro (uma fêmea de *A. Aegypti* quando infectada pode transferir o vírus a mais de uma pessoa em um mesmo dia devido a esse

comportamento) até que o seu abdômen fique completamente cheio. Dentro de poucos minutos, a fêmea pode ingerir até quatro vezes o seu próprio peso em sangue, adquirindo a quantidade necessária de proteínas para a produção de ovos (CLEMENTS, 2000).

O mosquito *A. aegypti* é um inseto holometábolo, ou seja, seu ciclo biológico passa pelas fases de ovo, larva (quatro estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 3).



**Figura 3:** Ciclo biológico do *A. aegypti* (Rivista sull'ambiente e sulla natura, 2008)

A postura dos ovos pelas fêmeas do *A. aegypti* é realizada fora da água, na parede do recipiente, ficando os ovos isolados uns dos outros, sendo um diferencial em relação à oviposição pelas fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), principal vetor de *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), o agente responsável pela filariose bancroftiana, cujos ovos ficam unidos formando “jangadas” sobre a água. No momento da postura os ovos são brancos, porém, adquirem rapidamente a cor negra brilhante. São capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano (FUNASA, 2001).

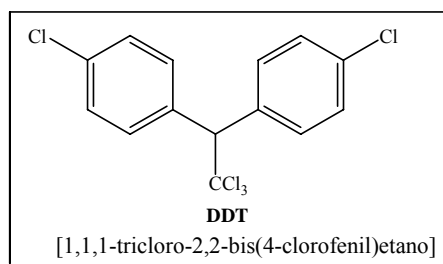
O ovo mede aproximadamente 1 mm de comprimento, e é depositado pela fêmea do *A. aegypti* nas paredes internas dos criadouros, próximos à superfície da água. Os ovos podem resistir a longos períodos de dessecação, até 450 dias em média. Este período varia segundo diversos critérios, como por exemplo, o clima: a resistência é menor em locais mais quentes e secos. Essa capacidade de resistência à dessecação é um aspecto importante do ciclo de vida do mosquito, que demonstra a necessidade do combate continuado aos criadouros, em todas as estações de ano. Esta resistência permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos. Esse meio de transporte dos ovos é chamado de dispersão passiva (FRANÇA, 2008).

### 3.3 – Controle do Vetor

Há vários anos a dengue é um dos mais sérios problemas de saúde pública do Brasil, causando preocupação no governo e na população de várias partes do País. A principal estratégia adotada para o combate do mosquito é o uso maciço de inseticidas químicos para o controle de adultos (mosquitos alados) e larvas. Além dos controles biológicos, integrados com programas que visam controlar o *A. aegypti*, utiliza-se principalmente inseticidas químicos, dentre os quais se destacam os organofosforados e os piretróides (LUNA *et al.*, 2004). Entretanto, o uso intensivo de agentes químicos aumenta o custo de controle e ainda pode afetar a saúde pública (POLANCZYK *et al.*, 2003).

#### 3.3.1 – Controle Químico

O organoclorado DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano) (Figura 4) foi adotado no Brasil em 1947 para o combate do *A. aegypti*, e se tornou o principal método para erradicação do *A. aegypti* nas Américas (Manual da vigilância epidemiológica de febre amarela, 1999). Embora o DDT tenha sido sintetizado no século XIX, as suas propriedades inseticidas foram descobertas pelo químico sueco Paul Herman Müller em 1939, que em 1948 foi ganhador do Prêmio Nobel de Medicina (SOLOMONS & FRYHLE, 2008; SANTOS, 1999). Este foi o primeiro inseticida de efeito prolongado, ou de propriedade residual que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (BRAGA & VALLE, 2007).

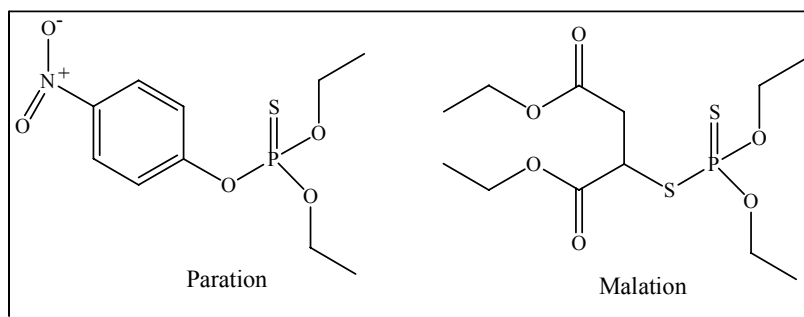


**Figura 4:** Estrutura química do DDT

Os organoclorados foram largamente adotados pelos programas de controle da malária, depois tiveram seu uso descontinuado e chegaram, inclusive, a ser proibidos em vários países. Por permanecer no ambiente durante anos, são chamados de “inseticidas persistentes” ou “inseticidas duros”, sendo moderadamente tóxico e de baixa absorção

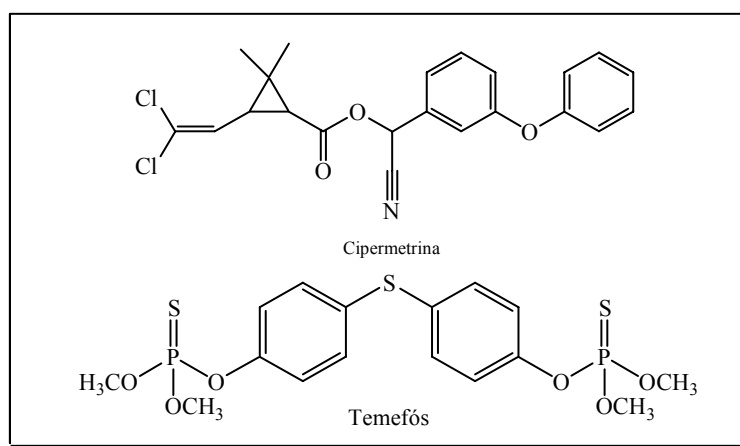
cutânea. Além disso, não é biodegradável, é acumulativo em gorduras de animais de sangue quente, podendo interferir no metabolismo do sódio e potássio. Em bioensaios, ele mostrou-se carcinogênico em camundongos (ALDRIDGE, 1979). O uso agrícola do DDT foi proibido, no entanto, ainda é indicado pela OMS para uso no controle de vetores (BRAGA & VALLE, 2007).

Em meados dos anos 60 surgiu a resistência de diversos vetores ao DDT. Então, os inseticidas pertencentes ao grupo dos organofosforados, tais como o paration e malation (Figura 5) começaram a ser utilizados no controle populacional do *A. aegypti* (OMS, 2008)



**Figura 5:** Estruturas químicas do paration e malation

Atualmente, no Brasil, para a eliminação do adulto do *A. aegypti* é utilizado o inseticida cipermetrina (Figura 6), composto pertencente ao grupo dos piretróides, na concentração final de 0,3% de princípio ativo. O principal larvicida empregado há décadas no país é o organofosforado temefós, (Abate®) (Figura 6), utilizado à 1 ppm de princípio ativo, adsorvido em grãos de areia em uma formulação contendo 1% dessa substância, o qual pode ser aplicado em água para o consumo humano. No entanto, resistência do mosquito *A. aegypti* ao temefós já foi documentada por pesquisadores em alguns municípios brasileiros (LIMA *et al.*, 2006).



**Figura 6:** Estruturas químicas da cipermetrina e do temefós

A racionalização do emprego de inseticidas, sua utilização com revezamento e o uso integrado com medidas de controle físico e biológico têm sido recomendados para diminuir os riscos de aparecimento, ou agravamento de resistência em populações de vetores (BROWN, 1986).

### 3.3.2 – Controle Biológico

O controle químico do *A. aegypti* vem sofrendo restrições devido à resistência dos mosquitos aos inseticidas (LIMA *et al.*, 2003), assim como os problemas que o uso em larga escala de larvicidas e inseticidas de aplicação espacial podem causar ao meio ambiente (LYANIWURA, 1991). No Brasil, apesar dos esforços do Ministério da Saúde, o Programa de Controle da Dengue não tem conseguido prevenir a ocorrência cíclica de epidemias (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Este fato justifica a busca de métodos alternativos de controle do vetor, como o controle biológico das formas imaturas (CAVALCANTI *et al.*, 2007).

O controle biológico, que consiste em produzir organismos capazes de parasitar ou de ser predador de mosquitos em suas várias fases evolutivas, vêm sendo estudado há muito tempo. As intervenções baseadas na introdução desses organismos ainda são em grande parte experimental, e as informações referentes à eficácia do controle biológico são baseadas em resultados de campo em pequena escala. Os dois organismos mais frequentemente empregados são os peixes larvófagos e o larvicida biológico *Bacillus thuringiensis* HT-14 (Bti) (FUNASA, 2001).

O uso de peixes larvófagos é um dos métodos mais antigos no controle dos mosquitos, e tem sido difundido em várias partes do mundo no controle de doenças, como a malária e a dengue. O uso de espécies apropriadas de peixes deve apresentar as seguintes características segundo a FUNASA:

- ✓ Preferência por larvas de mosquitos maiores do que outros tipos de alimentos localizados na superfície da água;
- ✓ Tamanho reduzido para permitir o acesso superficial na água e penetração entre a vegetação;
- ✓ Tolerância à poluição, salinidade, temperatura variáveis de transporte;
- ✓ Devem ser utilizados peixes originários da região onde o controle é realizado.

O controle biológico consiste em produzir organismos capazes de parasitar ou de ser predador das várias fases evolutivas deste mosquito, vêm sendo estudado há muito tempo. As

intervenções baseadas na introdução desses organismos ainda são em grande parte experimental, e as informações referentes à eficácia do controle biológico são baseadas em resultados de campo em pequena escala. Os dois organismos mais frequentemente empregados são os peixes larvófagos e o larvicida biológico *Bacillus thuringiensis* HT-14 (Bti) (FUNASA, 2001).

Para o combate as formas imaturas existem no mercado os biolarvicidas, a base de *Bacillus thuringiensis* *svar. israelensis* (BTi), com boa atividade contra larvas de *Aedes*, e o *Bacillus sphaericus* contra as larvas de *Anopheles* e *Culex* (FUNASA, 2001). A bactéria *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90-95% do mercado de bioinseticidas. Esta bactéria produz proteínas tóxicas altamente específicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, e não afetam os homens, os animais e as plantas (PRAÇA *et al.*, 2004).

### **3.3.3 – Controle Físico**

O controle físico consiste na utilização do controle comportamental (feromônio e caimônio) e de mosquiteiros como indicados pelos programas de controle de vetores. Outros métodos pouco utilizados, como a aplicação de um produto em forma de película monomolecular sobre a superfície da água e a utilização de água quente pode ajudar no controle do mosquito. Para *A. aegypti*, temperaturas de 49 °C são suficientes para matar os ovos em menos de 2 minutos, e as larvas e pupas em 5 minutos. (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

### **3.3.4 – Armadilhas de Oviposição**

A armadilha de oviposição (ovitampa) foi desenvolvida inicialmente com uma ferramenta de vigilância de *Aedes aegypti* nos Estados Unidos e vem sendo praticada em diversos programas de monitoramento, funcionando como método indireto para avaliar a presença desse vetor. Elas são úteis no monitoramento do mosquito *A. aegypti*, um método mais sensível e econômico em situações onde a densidade populacional é baixa e geralmente não é detectada pelo método de pesquisa larvária (SANT'ANA *et al.*, 2006).

As armadilhas de oviposição são depósitos de plástico preto com capacidade entre 200 a 500 mL, preenchidas com a infusão atraente e uma palheta de madeira prensada colocada em posição vertical (8 x 3 cm). Na palheta de madeira prensada (Eucatex) são depositados os



ovos do mosquito bem acima da superfície da água. A preparação da infusão padrão está baseada em Reiter *et al.* (1991), contudo, diferentes plantas, principalmente folhas de gramíneas também podem ser utilizadas para a preparação da infusão (POLSON *et al.*, 2002; SANT'ANA *et al.*, 2006).

A utilização de atraentes e de feromônios de oviposição em armadilhas de oviposição são bastante úteis em programas de vigilância de vírus ou de parasitas. As armadilhas atraem em grande parte, fêmeas de mosquitos acasaladas que já realizaram o repasto sanguíneo, e que já foram infectadas pelo agente patogênico da espécie hospedeira. A utilização de atraentes e de feromônios de oviposição também oferece um excelente potencial para o desenvolvimento de diferentes métodos de controle que podem ser utilizados para o controle populacional de insetos hematófagos (MILLAR *et al.*, 1994).

### **3.4 – Vacina Tetravalente Contra os Vírus do Dengue**

O departamento de vacinas Sanofi Pasteur do grupo Sanofi-Aventis anunciou no dia 06 de novembro de 2007, resultados positivos no desenvolvimento de uma vacina mundial contra a dengue. A vacina está sendo testada na Ásia e na América Latina, e poderá ser patenteada em 2012. Em um teste realizado nos Estados Unidos utilizando humanos adultos, a vacina tetravalente contra a dengue induziu uma resposta positiva de anticorpos capaz de neutralizar os quatro serotipos de vírus responsáveis pela dengue em 100% dos humanos testados (SANOFI PASTEUR, 2007).

A vacina tetravalente contra a dengue se baseia em uma nova tecnologia que utiliza os envelopes protéicos que induzem imunidade contra os quatro sorotipos de vírus responsáveis da dengue e de suas manifestações mais severas: a dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue (SANOFI PASTEUR, 2007).

No Brasil, o Instituto Butantan, de São Paulo em parceria com o Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmaguinhos), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro, e com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos já estão trabalhando na fase das pesquisas clínicas com humanos. A previsão da equipe é que em dezembro de 2008 uma planta piloto esteja produzindo a vacina, e que em 2010, uma planta definitiva seja instalada no Instituto Butantan (REYNOL, 2008).

A vacina que está sendo desenvolvida nasceu com a técnica de clones infecciosos, e tem como base o vírus da febre amarela. A técnica consiste em retirar um trecho do genoma

do vírus da febre amarela, e colocar no lugar o pedaço equivalente do vírus da dengue. O resultado é o chamado “genoma quimérico” (REYNOL, 2008).

O combate a dengue no organismo humano não é fácil. Devido aos quatro diferentes sorotipos, a vacina, para ser eficaz terá de ser tetravalente, ou seja, combater os quatro sorotipos simultaneamente. Para cada um desses sorotipos é preciso encontrar um equilíbrio entre atenuação do sorotipo (para que a pessoa não adoça com o medicamento) e imonogenicidade (a “força” que a dose deve ter para imunizar) (REYNOL, 2008).

### 3.5 – Técnicas de Preparação de Amostras Orgânicas

A análise cromatográfica de compostos orgânicos presentes em alimentos, medicamentos, fragrâncias, matrizes aquosas ambientais e matrizes biológicas são usualmente feitas depois da realização da extração e do enriquecimento dos solutos dissolvidos na matriz analisada, uma vez que estes podem estar presentes em baixas concentrações e com uma grande quantidade de interferentes. Atualmente, os métodos de preparação de amostras a partir de matrizes complexas mais comumente utilizados são: extração em fase sólida (SPE)<sup>1</sup>, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)<sup>2</sup>, micro-extração em fase sólida (SPME)<sup>3</sup>, extração por sorção com barras de agitação (SBSE)<sup>4</sup> e extração líquido-líquido (LLE)<sup>5</sup> (BARKER, 2007). No entanto, dentre estas principais técnicas de extração citadas, serão abordadas mais profundamente apenas SPE, LLE e SBSE, uma vez que estas foram as técnicas utilizadas nos processos de concentração e isolamento das amostras aquosas estudadas durante a realização deste trabalho.

#### 3.5.1 – Extração em fase sólida (SPE)

A técnica de extração em fase sólida é um método de preparação de amostras que concentra (enriquece) e purifica (isola) os analitos da solução por sorção (adsorção ou absorção) em cartucho ou em disco contendo a fase sólida (também denominada fase estacionária), seguido pela eluição do analito com um solvente apropriado para posterior análise instrumental (IST, 2001). A técnica de extração em fase sólida foi primeiramente introduzida nos meados dos anos 1970, e tornou-se disponível comercialmente em 1978 (PICÓ *et al.*, 2007).

A técnica da SPE tem sido amplamente utilizada com diversas matrizes, tais como: solo (HERNANDEZ-BORGES *et al.*, 2005), frutas e vegetais (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003), antibióticos (POZO *et al.*, 2006), fluidos biológicos (PANUWET *et al.*, 2008), mel (CAMPILLO *et al.*, 2006), esteróides (NOPPE *et al.*, 2008) dentre outros usos.

---

<sup>1</sup> Do inglês: solid-phase extraction

<sup>2</sup> Do inglês: matrix solid phase dispersion

<sup>3</sup> Do inglês: solid-phase microextraction

<sup>4</sup> Do inglês: stir bar sorptive extraction

<sup>5</sup> Do inglês: liquid-liquid extraction

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido, a qual é baseada nos mecanismos da cromatografia líquida e em seus mecanismos de separação. A principal vantagem da SPE é o uso de um pequeno volume de solvente orgânico, vidraria de menor porte e menor custo, quando comparada com a extração líquido-líquido. Além disso, na LLE geralmente se formam emulsões com amostras aquosas o que dificulta a extração, e a LLE não é de fácil automatização. Assim a extração em fase sólida foi inventada como uma alternativa aproximada para a LLE (LANÇAS, 2004).

Inicialmente, a SPE foi baseada no uso de fases estacionárias poliméricas, tais como as resinas XAD (resinas poliméricas de estireno-divinilbenzeno e poliacrilato), as quais eram empacotadas em pequenas colunas para o uso de análise de drogas. As primeiras aplicações ambientais consistiam no uso das resinas XAD e da fase quimicamente ligada C-18 para o enriquecimento de traços. Estas pré-colunas foram usadas para o enriquecimento de traços antes da cromatografia líquida, frequentemente realizadas on-line. No entanto, estas primeiras pré-colunas em aço, usadas para o sistema on-line, rapidamente foram trocadas por colunas mais baratas em plástico e descartável para um sistema off-line (THURMAN & MILLS, 1998).

Atualmente, as colunas de SPE são normalmente fabricadas de polipropileno, polietileno e, até mesmo em vidro, preenchidas com 40 µm de material de empacotamento com diferentes grupos funcionais. Um disco de polipropileno de 20 µm de espessura é utilizado para segurar de 50 mg à 10 g de fase estacionária. A amostra líquida é passada através da coluna e os analitos são concentrados e purificados. Depois da sorção quantitativa dos analitos, eles são removidos com um solvente de eluição apropriado (LANÇAS, 2004).

Os benefícios da SPE incluem alta recuperação dos analitos, extratos purificados, facilidade de automação, compatibilidade com análises cromatográficas e redução no consumo de solvente orgânico. Atualmente, existe uma grande aprovação do uso da SPE principalmente nas áreas de isolamento de metabólitos de drogas e analitos de matrizes aquosas (LANÇAS, 2004).

### **3.5.1.1 – Mecanismos de Separação da SPE**

Os mecanismos de separação cromatográfica da SPE são os mesmos da cromatografia líquida em coluna, e os materiais utilizados também são similares. Materiais tais como: sílica gel, alumina, silicatos de magnésio (Florisil), carvão ativo, polímeros (estireno-divinil

benzeno como XAD-2 e PRP-1) e fases baseadas em sílica quimicamente ligada (THURMAN & MILLS, 1998).

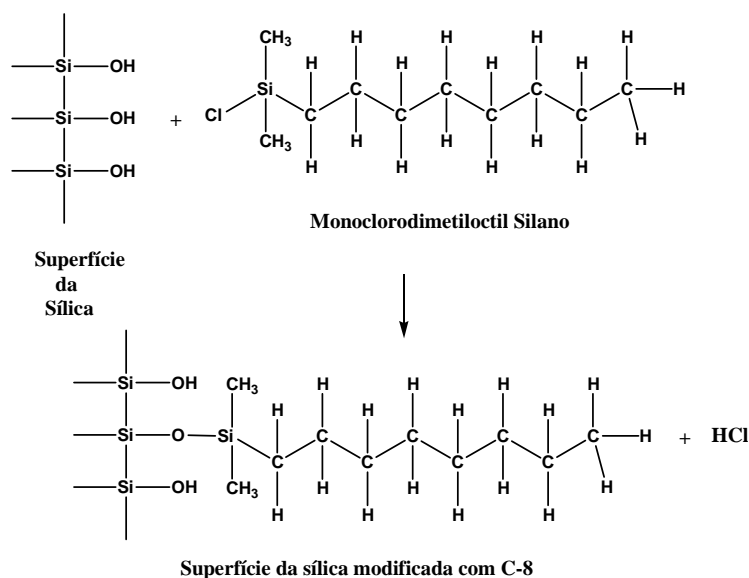
Suportes em fase normal são utilizados em SPE quando a amostra é um solvente orgânico contendo o analito de interesse. Interações polares tais como ligações-de-hidrogênio e interações dipolo-dipolo são os mecanismos primários para a retenção do soluto. Suportes em fase reversa são os materiais de empacotamento que são mais hidrofóbicos do que a amostra. Suportes em fase reversa são normalmente utilizados em SPE quando amostras aquosas estão sendo envolvidas. O mecanismo de interação ocorre com forças de van der Waals, e ocasionalmente interações secundárias tais como ligações-de-hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Algumas fases contendo grupos cianopropil ou aminopropil quimicamente ligados à sílica podem ser utilizadas tanto na fase normal, quanto na fase reversa. Na fase reversa, a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, e na fase normal, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel. Isto significa que a água não é usualmente um solvente para a fase normal em SPE, porque é muito polar, e ela seria adsorvida nos sítios ativos da fase estacionária e reduziria as interações entre analito e fase estacionária (THURMAN & MILLS, 1998).

É necessária assim, a escolha da fase estacionária apropriada, que depende da natureza do analito e da matriz. Os principais mecanismos da SPE são: adsorção, partição (fase normal ou fase reversa), troca iônica e exclusão por tamanho (LANÇAS, 2004).

**3.5.1.1a – Adsorção:** Teve seu início no século XX em 1906, com os trabalhos pioneiros de M. Twsett que separava pigmentos coloridos de extratos vegetais por meio de cromatografia de adsorção. Twsett usou carbonato de cálcio para adsorver vários pigmentos de plantas, utilizando éter de petróleo como eluente (fase móvel) (ETTRE, 2000).

**3.5.1.1b – Partição:** As primeiras fases estacionárias que utilizavam o mecanismo de partição surgiram na década de 60 e visavam evitar problemas de adsorção irreversível que ocorriam na utilização de sílica, alumina e outros adsorventes polares na análise de compostos altamente polares. A maior parte das fases utilizadas em SPE que empregam o mecanismo de partição é preparada a partir de sílica utilizada em processos de adsorção. As fases são preparadas pela reação em meio anidro do grupo silanol da sílica gel com um derivado clorado do silano, ligando o grupo alquílico (R) do reagente a estrutura básica da sílica (Figura 7). A modificação na superfície da sílica pela reação com organosilanos revolucionou a cromatografia e levou a produção de diferentes fases de sílica modificada variando a química do organosilano. Fases como estas são chamadas de fases quimicamente ligadas ou

“bonded phases”. Estas fases estacionárias rapidamente se tornaram os materiais básicos de empacotamento para HPLC (LANÇAS, 2004).



**Figura 7:** Síntese da fase reversa monofuncional C-8

**3.5.1.1c – Troca iônica:** fases estacionárias trocadores de íons isolam os analitos baseados no estado iônico da molécula, catiônico ou aniônico. O mecanismo envolve a troca do íon do soluto orgânico carregado ionicamente, em um solvente polar ou não polar com a fase estacionária de troca iônica opostamente carregado (THURMAN & MILLS, 1998).

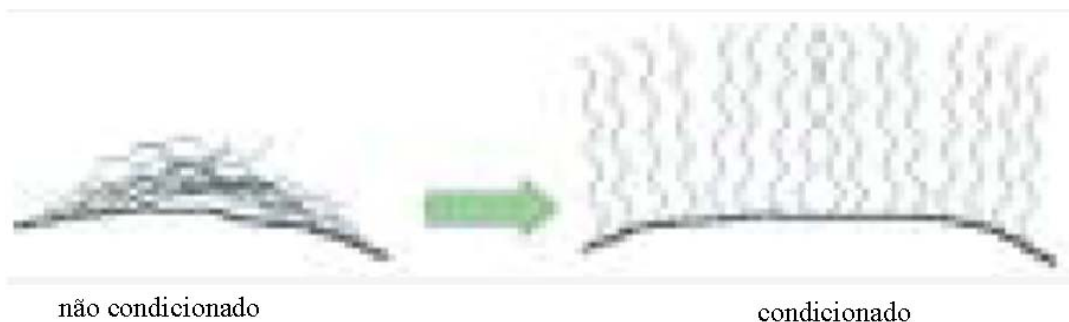
**3.5.1.1d – Exclusão por tamanho:** Fases estacionária de exclusão por tamanho utilizam um mecanismo físico de separação baseado no tamanho molecular do analito, sendo similar a uma filtração. É um método recente em SPE, usualmente em conjunção com fase reversa e troca de íons. A fase sólida é usualmente formada por um polímero, tal como o Sephadex® (polímero formado por unidades de glicose e epiclorigirina), cujo tamanho dos poros é controlado, permitindo a entrada de analitos de tamanhos menores e excluindo os de maiores tamanhos (THURMAN & MILLS, 1998).

### 3.5.1.2 – Como utilizar a extração em fase sólida

A SPE é uma técnica muito prática de ser utilizada, no entanto é indispensável à realização das etapas de condicionamento da fase estacionária, de concentração dos analitos, de remoção dos interferentes (Clean-up), e de eluição dos analitos de interesse (IST, 2001).

### 3.5.1.2a – O condicionamento da fase estacionária

A etapa de condicionamento da coluna é necessária para prepará-la para o processo de extração. Nesta etapa ocorre a ativação da fase estacionária, e o solvente que deverá ser utilizado para isto dependerá do material a ser ativado. O condicionamento remove o ar, eliminando com isso os possíveis caminhos preferenciais. A fase estacionária não pode secar, pois assim como na cromatografia líquida, dependendo do material utilizado como fase sólida, a secagem da fase estacionária pode levar a vários problemas, dentre os quais a formação de caminhos preferenciais comprometendo assim, a separação. Quando isto acontece durante a etapa de condicionamento, o procedimento deve ser repetido. Na Figura 8, temos ilustrado o efeito do condicionamento da fase estacionária C-18 ligado à sílica (IST, 2001).



**Figura 8:** Efeito do condicionamento da fase estacionária C-18 ligado à sílica (IST, 2001)

### 3.5.1.2b – A concentração dos analitos

Esta etapa consiste em passar a amostra (que pode variar desde alguns microlitros até litros) através do cartucho com o interesse de reter o analito. A adição da amostra é realizada através de aspiração por vácuo, pressão externa ou centrifugação, no entanto para pequenos volumes de amostra esta etapa pode ser realizada somente com o auxílio da força da gravidade (IST, 2001).

Durante o passo de retenção, o analito é concentrado na fase estacionária, alguns componentes da matriz podem ser retidos e outros não, purificando assim o analito. Entre as principais forças de interação que atuam entre o analito e a fase estacionária destacam-se as forças de van der Waals (também chamada de não-polar, hidrofóbico, partição), ligações-de-hidrogênio, forças dipolo-dipolo, interações dipolo induzido-dipolo induzido, interações  $\pi$ - $\pi$  e forças iônicas (IST, 2001).

### **3.5.1.2c – A remoção dos interferentes**

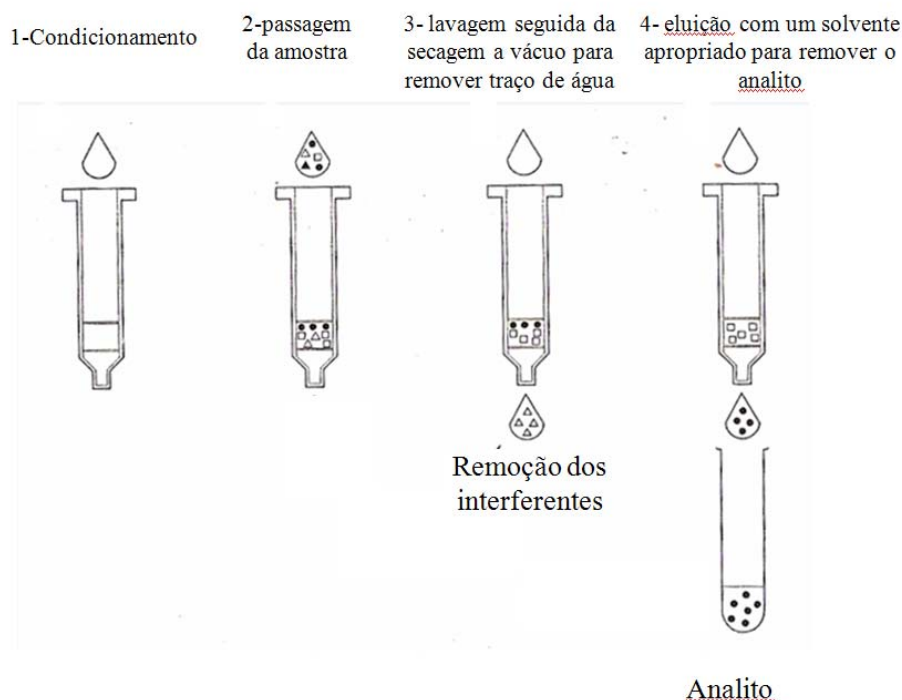
Esta etapa consiste na lavagem do cartucho para a remoção seletiva dos interferentes. O solvente ideal não deve possuir força suficiente para liberar o analito de interesse do material de empacotamento. O ideal é utilizar o mesmo solvente da amostra. Para amostras aquosas deve ser utilizada água destilada (IST, 2001).

### **3.5.1.2d – A eluição dos analitos**

Para a eluição dos analitos de interesse deve-se utilizar um pequeno volume do eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise instrumental. A escolha do eluente a ser utilizado é de importância fundamental, já que ele deve eluir somente o(s) analito(s) de interesse, uma vez que os demais, os interferentes podem não ter sido eliminados na etapa anterior por estarem muito retidos no material de empacotamento. Normalmente, o solvente de eluição deverá ter maior capacidade de eluição que o solvente utilizado na etapa anterior, e deve romper as interações soluto-fase estacionária, resultando na eluição quantitativa do analito. Ele deve ter baixo ponto de ebulição, e em muitos casos utiliza-se o éter etílico (THURMAN & MILLS, 1998; LANÇAS, 2004).

Um procedimento típico de SPE utiliza uma única coluna de SPE da seguinte maneira: **1)** a coluna deve ser condicionada com metanol (10 mL, grau HPLC), seguido de lavagem com água destilada (10 mL) para remover o metanol; **2)** Passagem da amostra aquosa; **3)** Lavagem com água destilada para a remoção dos interferentes; **4)** Secagem à vácuo da coluna para remover traços de água. Neste caso, deve ser utilizado um pequeno tubo no topo da coluna contendo carvão ativo para evitar contaminação devido à presença de compostos orgânicos na atmosfera dos laboratórios e dessorção dos analitos da coluna com o uso de éter etílico destilado, solvente ideal para remoção de compostos polares e também para cromatografia gasosa. Estes 4 passos estão representados na Figura 9.





**Figura 9:** Diferentes etapas da SPE (THURMAN & MILLS, 1998)

### 3.5.2 – Extração Líquido-Líquido (LLE)

O processo de extração com solventes é geralmente empregado para isolar ou concentrar substâncias dissolvidas de soluções ou misturas sólidas ou ainda para a remoção de impurezas solúveis indesejáveis de misturas. Este último processo é denominado de lavagem (VOGEL, 1988).

A mais simples forma de uma extração líquido-líquido consiste de uma amostra aquosa matriz, a qual é extraída por um solvente orgânico. O éter etílico, o tolueno, o hexano, o clorofórmio, o diclorometano e o tetracloreto de carbono são os solventes mais comumente utilizados. Na LLE, devido aos líquidos serem imiscíveis, formam-se duas fases, a fase aquosa é a fase estacionária e a fase orgânica é a fase móvel. É na fase móvel que os analitos são isolados e concentrados (ATKINS & JONES, 2006).

A LLE é usualmente realizada com um funil de separação. Os dois líquidos são colocados no funil de separação, e este é agitado para aumentar a área superficial entre as duas fases. Quando a extração é completa, os líquidos se separam devido à imiscibilidade, formando assim duas fases. A fase mais densa fica na parte inferior do funil de separação (ATKINS & JONES, 2006).

Na LLE ocorre a partição do soluto entre as duas fases imiscíveis. O soluto, ou analito que estava inicialmente presente em uma única fase, depois da extração estará presente em ambas as fases. A eficiência da extração líquido-líquido é determinada pela constante de equilíbrio para a partição do soluto entre as duas fases. A eficiência da extração é também influenciada por qualquer reação secundária envolvendo o soluto, por exemplo, as reações ácido-base e as reações de complexações (HARVEY, 2000).

### 3.5.2.1 – Coeficiente de partição e razão de distribuição

A partição do soluto entre duas fases é descrito pelo coeficiente de partição. Se um analito [A] está inicialmente na fase aquosa e é extraído para a fase orgânica,



O coeficiente de partição é

$$K_D = \frac{[A_{\text{org}}]}{[A_{\text{aq}}]} \quad \text{Eq. 2}$$

Um grande valor  $K_D$  indica que a extração do analito pela fase orgânica é favorável. Ao avaliar a eficiência de uma extração, no entanto, é preciso considerar a concentração total do analito em cada fase. Assim, a razão de distribuição,  $D$ , é definida como sendo a razão da concentração total do analito em cada fase, orgânica e aquosa (HARVEY, 2000).

$$D = \frac{[A_{\text{org}}]_{\text{total}}}{[A_{\text{aq}}]_{\text{total}}} \quad \text{Eq. 3}$$

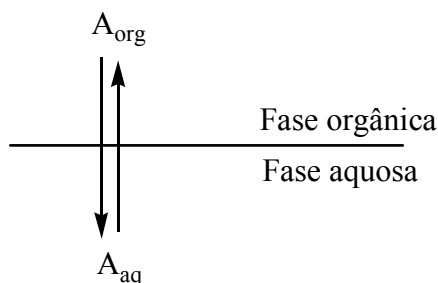
Quando o analito existe em somente uma forma em cada fase, então o coeficiente de partição e a razão de distribuição são idênticos. Se, no entanto, o analito existe em mais de uma forma em uma ou outra fase, então  $K_D$  e  $D$  tem normalmente valores diferentes. Por exemplo, se o analito existe em duas formas na fase aquosa, X e Y, somente uma das quais X, a partição de X entre as duas fases é, portanto igual a:

$$D = \frac{[A_{\text{org}}]_X}{[A_{\text{aq}}]_X + [A_{\text{aq}}]_Y} \leq K_D = \frac{[A_{\text{org}}]_X}{[A_{\text{aq}}]_X} \quad \text{Eq. 4}$$

Esta distinção entre  $K_D$  e  $D$  é importante. O coeficiente de partição é uma constante de equilíbrio e tem um valor fixo para a partição do analito entre as duas fases. O valor da razão de distribuição, no entanto muda com as condições da solução se a quantidade relativa das formas X e Y mudam. Se as reações de equilíbrio que acontecem em cada fase e entre as fases são conhecidas, pode-se deduzir uma relação algébrica entre  $K_D$  e  $D$  (HARVEY, 2000).

### 3.5.2.2 – Extração líquido-líquido sem reações secundárias

Na mais simples forma da extração líquido-líquido, a única reação que afeta a eficiência da extração, é a partição do analito entre as duas fases (Figura 10).



**Figura 10:** Esquema da extração líquido-líquido sem reações secundárias (HARVEY, 2000)

Neste caso a razão de distribuição e o coeficiente de partição são iguais:

$$D = \frac{[A_{org}]_{total}}{[A_{aq}]_{total}} = \frac{[A_{org}]}{[A_{aq}]} \quad \text{Eq. 5}$$

Segundo o princípio da conservação da massa, o número de mols ( $n$ ) do analito inicialmente presente em uma fase é igual à soma do número de mols do analito presente na fase aquosa e orgânica depois da extração. Assim,

$$(n_{aq})_0 = (n_{aq})_1 + (n_{org})_1 \quad \text{Eq. 6}$$

Admitindo que o analito A em  $V_1$  (mL) da fase 1 (aquosa) seja extraído com  $V_2$  (mL) da fase 2 (tolueno), e supondo que a  $n$  seja o número de mols de A no sistema e  $q$  seja a fração A que permanecem no equilíbrio na fase aquosa, a molaridade na fase aquosa é  $qn/V$ . A fração total de analito transferido para a fase orgânica é  $(1-q)$ , e a molaridade na fase orgânica é  $(1-q)n/V_2$  (HARVEY, 2000). Logo:

$$K = \frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}} = \frac{(1-q)n/V_2}{qn/V_1} \quad \text{Eq. 7}$$

A fração restante na fase aquosa após uma extração é igual:

$$q = \frac{V_1}{V_1 + KV_2} \quad \text{Eq. 8}$$

Quanto maior o coeficiente de partição, menor quantidade do analito permanece na fase aquosa. A equação acima mostra que a fração de analito que permanece na água (fase aquosa) depende do valor do coeficiente de partição e dos volumes das respectivas fases. Se as fases são separadas e uma nova porção de tolueno (solvente orgânico) é adicionada a fração aquosa uma nova fração de analito é retirado da fase aquosa, em equilíbrio, será igual à fração restante na fase aquosa após duas extrações (HARRIS, 2005).

$$q \cdot q = \left( \frac{V_1}{V_1 + KV_2} \right) \quad \text{Eq. 9}$$

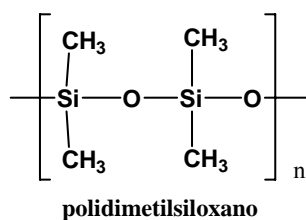
Exemplo de uma extração. Se  $q = 1/4$ , então  $1/4$  do analito permanecerá na fase aquosa após uma extração. Uma segunda extração reduz a concentração a  $1/4$  do valor após a primeira extração, ou seja, a  $(1/4)(1/4) = 1/16$  da concentração inicial. É muito mais eficiente efetuarmos diversas extrações com volumes pequenos de solvente, do que efetuarmos uma única extração com o volume total de solvente (HARRIS, 2005).

### 3.5.3 – Extração por Sorção em Barras de Agitação (SBSE)

A extração por sorção em barras de agitação foi introduzida em 1999 como um método de preparação de amostras a partir da extração e enriquecimento de compostos orgânicos presentes em matrizes aquosas utilizando uma menor quantidade de solvente. O método da SBSE é baseado nos mesmos princípios da microextração em fase sólida (SPME) (DAVID & SANDRA, 2007).

A SPME foi desenvolvida em 1990 por ARTHUR & PAWLISZYN (1990). Na sua forma original, baseia-se na sorção dos analitos por uma fibra de sílica modificada

quimicamente (polidimetilsiloxano, PDMS) (Figura 11), com posterior dessorção dos analitos em um cromatógrafo a gás (LANÇAS, 2004).



**Figura 11:** Polímero de polidimetilsiloxano (PDMS)

Na SPME, contudo, a porção do meio de extração é muito limitada. Para uma típica fibra de 100  $\mu\text{m}$ , a qual é a fibra mais comumente utilizada, o volume da fase de extração é aproximadamente 0,5  $\mu\text{L}$ , conseqüentemente, a eficiência da extração para solutos que são parcialmente solúveis em água pode ser baixa (ARTHUR *et al.*, 1992). Para compostos altamente apolares, a competição pode ocorrer entre a fase aquosa, a fibra de SPME, a parede de vidro do recipiente de extração e a superfície de politetrafluoroetileno da barra de agitação utilizada para agitar as amostras (BALTUSSEN *et al.*, 1999).

Baseado nestas observações, um novo método de extração foi desenvolvido. Barras de agitação foram cobertas por uma camada (0,5-1,0 mm) de polidimetilsiloxano e então foram utilizadas para agitar amostras aquosas, enquanto extraem e enriquecem de analitos a camada de PDMS. A técnica foi chamada de extração por sorção em barras de agitação. (DAVID & SANDRA, 2007).

O princípio básico da SBSE é idêntico a SPME, que utiliza fibras cobertas com PDMS, no entanto, o volume da fase de extração é de 50-250 vezes maior. A fase mais amplamente utilizada para a extração por sorção é a polidimetilsiloxano (PMDS). Esta fase é bem conhecida como uma fase estacionária para a cromatografia gasosa (CG), é termoestável, pode ser utilizada em uma grande faixa de temperatura (-20 a 320°C), e tem propriedades de difusão interessantes. Depois da extração, os analitos podem ser introduzidos quantitativamente no sistema analítico, através da dessorção térmica ou eluição com um solvente orgânico (dessorção líquida). As vantagens da extração por sorção incluem enriquecimento previsível, e ausência de efeitos de deslocamento e rápida dessorção térmica em temperaturas moderadas (KAWAGUCHI *et al.*, 2006).

Na extração por sorção, os analitos são extraídos da matriz (normalmente aquosa) em uma fase líquida não miscível. Em contraste com a extração com adsorventes, na qual os analitos são ligados aos sítios ativos apenas na superfície; na extração por sorção ocorrem as

interações tanto na área superficial, assim como na porção total da fase de extração. A extração por sorção pode assim ser comparada com a micro-extração líquido-líquido (KAWAGUCHI *et al.*, 2006).

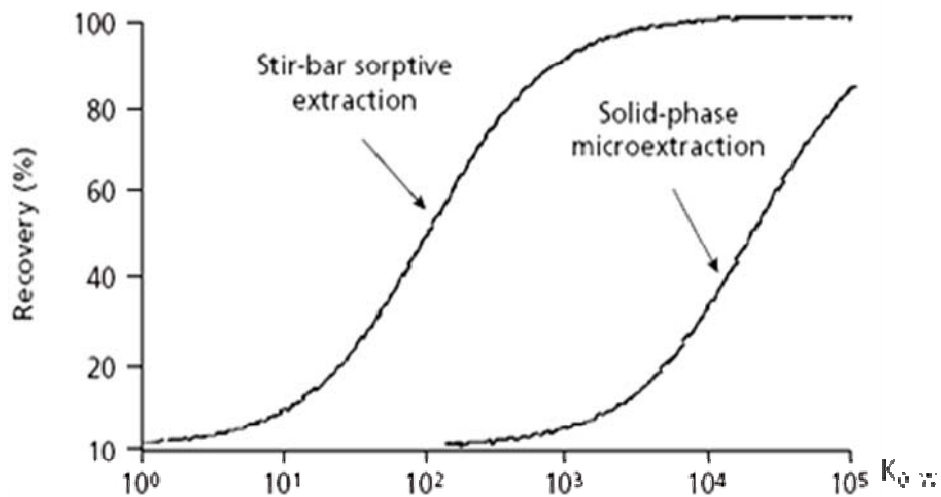
Tem sido demonstrado que uma variedade de analitos, desde marcadores biológicos (fenóis, hormônios, ácidos graxos) aos contaminantes artificiais (abuso de drogas, plastificantes) pode ser enriquecida com alta sensibilidade utilizando o método da SBSE. Para solutos polares, a derivatização *in-situ* pode aumentar a extração junto à camada de PDMS, assim como melhorar a análise cromatográfica (TIENPONT *et al.*, 2002).

A SBSE tem sido amplamente utilizada com diferentes matrizes, tais como: vegetais (JUAN-GARCIA *et al.*, 2005), vinho (CHIA & HUANG, 2006), água de rio (NAKAMURA & DAISHIMA, 2005), plasma (LAMBERT *et al.*, 2005), urina (TIENPONT *et al.*, 2002), saliva (KAWAGUCHI *et al.*, 2004).

Para solutos polares, a derivatização *in-situ* pode aumentar a extração junto à camada de PDMS, assim como melhorar a análise cromatográfica (TIENPONT *et al.*, 2002)

Extração por sorção é por natureza uma técnica de equilíbrio, a extração dos solutos presentes na matriz aquosa é controlada pelo coeficiente de partição do soluto entre a fase estacionária e a fase aquosa. Estudos têm correlacionado este coeficiente de partição com o coeficiente de distribuição octanol-água ( $K_{o/w}$ ). Embora não exatamente correto,  $K_{o/w}$  fornece uma boa indicação de como e se um determinado soluto pode ser extraído por SPME ou SBSE (DAVID & SANDRA, 2007).

A Figura 12 mostra a influência do  $K_{o/w}$  e a razão da fase na eficiência da extração. Para SPME, o volume de polidimetilsiloxano é aproximadamente 0,5  $\mu\text{L}$ . Isto resulta em uma pequena recuperação dos analitos com baixos valores de  $K_{o/w}$ ; por exemplo, valores abaixo de 10,000. Na SBSE, 25-125  $\mu\text{L}$  da camada de polidimetilsiloxano são utilizados. Conseqüentemente, a sensibilidade é aumentada por um fator de 50-250. A recuperação teórica alcança 100% para solutos com valores de  $K_{o/w}$  maiores do que 500 ( $\log P$  maior que 2.7). A recuperação teórica no equilíbrio pode ser calculada para um determinado volume de amostra, selecionando as dimensão da barra de agitação, e o soluto utilizando o programa KowWIN (Syracuse Research Corp., Syracuse, New York), o qual é baseado no cálculo do  $\log K_{O/W}$  (DAVID *et al.*, 2003).



**Figura 12:** Recuperação teórica no equilíbrio (%) em função do soluto  $\log K_{o/w}$  para SPME (fibra de 100  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  PDMS) e SBSE (1 cm x 0,5 mm  $d_f$ , 25  $\mu\text{L}$  PDMS) e 10 mL de amostra (DAVID *et al.*, 2003).

Também é importante citar que o equilíbrio da sorção é também dependente da razão da fase, e assim da quantidade de PDMS utilizada. Esta relação é mostrada pela equação abaixo:

$$K_{O/W} \approx k_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \frac{V_W}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \beta \quad \text{Eq. 9}$$

O coeficiente de distribuição entre PDMS e água ( $K_{PDMS/w}$ ) é definido como a razão entre a concentração do soluto na fase de PDMS ( $C_{PDMS}$ ) sobre a concentração na água ( $C_W$ ) no equilíbrio. Esta razão é igual à razão da massa do soluto na fase de PDMS ( $m_{PDMS}$ ) sobre a massa do soluto na fase aquosa ( $m_W$ ) vezes a razão da fase  $\beta$  ( com  $\beta = V_W/V_{PDMS}$ ) (BALTUSSEN *et al.*, 2002).

### 3.5.3.1 – Considerações Práticas da Barra de Agitação

A barra de agitação (Figura 13) contendo PDMS está disponível pela marca Gerstel GmbH & Co. KG (Müllheim a/d Ruhr, Alemanha). Esta barra de agitação tem três partes essenciais. A primeira parte interior é uma barra magnética ativa que é necessária para transferir o movimento giratório de um prato ativo para a amostra líquida. A segunda parte da barra de agitação é a cobertura de proteção de vidro que cobre a barra magnética ativa. A

terceira parte é a parte externa da camada, a fase estacionária, neste caso polidimetilsiloxano, onde os analitos são extraídos. A camada de vidro é essencial na construção da barra de agitação de alta qualidade, pois o contato direto entre o metal e PDMS catalisa a degradação do polímero durante a dessorção térmica (SANDRA *et al.*, 2000).



**Figura 13:** Esquema do revestimento da barra de agitação (SANDRA *et al.*, 2000)

### 3.5.3.2 – Realização da SBSE

A extração por sorção em barras de agitação de uma amostra líquida é realizada adicionando-se um volume satisfatório da amostra líquida em um frasco de headspace ou outro recipiente (Figura 14). A barra de agitação coberta de polidimetilsiloxano é colocada no frasco com a amostra e é agitada durante 30-240 min. O tempo de extração é controlado cineticamente: determinado pelo volume da amostra a ser extraída, as dimensões da barra de agitação, e a velocidade da agitação deve ser otimizada para uma determinada aplicação. A otimização normalmente é realizada medindo a recuperação de analito em função do tempo de extração. São obtidas as melhores recuperações em condições de equilíbrio, quando nenhuma recuperação adicional é observada quando o tempo de extração é aumentado (KAWAGUCHI *et al.*, 2006).

Depois da extração a barra de agitação é removida, imergida em um tecido de papel limpo para remover as gotinhas de água e introduzidas dentro de um tubo para a dessorção térmica. Em alguns casos, recomenda-se enxaguar a barra de agitação ligeiramente com água destilada para remover açúcares adsorvidos, proteínas e outros componentes da amostra. Este passo evitará a formação de materiais não voláteis durante a etapa de dessorção térmica (KAWAGUCHI *et al.*, 2006).



Fig. 2. Schematic of SBSE set-up.

**Figura 14:** Sistema de SBSE (KAWAGUCHI *et al.*, 2006)



### 3.6 – Infusões e compostos atraentes e/ou estimulantes do comportamento de oviposição

Os insetos estão entre os seres vivos que mais empregam os odores para realizar suas atividades durante sua existência (VILELA & LÚCIA, 2001). Desse modo, o olfato, assim como os diversos odores são fundamentais para a localização das presas, defesa, seleção de plantas hospedeiras, escolha de locais para oviposição, corte e acasalamento, organização das atividades sociais e em diversos outros comportamentos (VILELA & LÚCIA, 2001).

As substâncias químicas que mediam a comunicação química são denominadas semioquímicos (feromônios, cairomônios, sinomônios, alomônios e apneumônios) (NORDLAND, 1981). Os semioquímicos são capazes de alterar o comportamento dos insetos, dependendo do estado fisiológico destes. Quando usados como atraentes são capazes de atrair insetos em armadilhas ou mantê-los em áreas confinadas (EIRAS & MAFRANETO, 2001).

Tem sido relatado que feromônios de oviposição, assim como vários cairomônios são responsáveis pela atração dos sítios de oviposição em relação aos mosquitos da família dos Culicídeos (TAKKEN & KNOLS, 1999). MILLAR *et al.* (1992) mostraram que fenóis são atraentes para os mosquitos *C. quinquefasciatus*, sendo que uma mistura de cinco componentes contendo fenol, 4-metilfenol, 4-etilfenol, indol, e 3-metilindol (escatol) foi isolada a partir de infusões da gramínea *Cynodon dactylon*.

O potencial estimulante do comportamento de oviposição do fenol, 4-metilfenol, 4-etilfenol, indol, e 3-metilindol em relação às espécies *C. quinquefasciatus*, *C. tarsalis Coquillett* e *C. stigmatosoma Dyar* foi analisado em campo. Os resultados demonstraram que o 3-metilindol foi capaz de promover a oviposição das três espécies citadas (BEEHLER *et al.*, 1994).

SANT'ANA (2003) identificou através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS) e ao detector eletroantegráfico (GC-EAG) sete diferentes compostos: nonanal, decanal, benzotiazol, 3-metil indol, *p*-cresol, limoneno e indol, provenientes de infusões de 15 e 20 dias de período de fermentação do capim colônia (*Panicum maximum*). Os sete compostos, em sua forma sintética, foram avaliados individualmente em cinco diferentes concentrações ( $10^2$  a  $10^6$  ng/50 $\mu$ l solvente) em testes eletroantegráficos (EAD), bem como em armadilhas de oviposição no campo. Os sete compostos analisados foram considerados biologicamente ativos.

Posteriormente foi desenvolvido um atraente de oviposição sintético (AtrAedes®), constituído pelo aldeído nonanal, um dos sete compostos biologicamente ativos identificados na infusão de *P. maximum* (EIRAS & SANT'ANA, 2001).

### **3.7 – A planta *Aloe vera***

Babosa é o nome popular dado a uma planta africana pertencente à família das Liliáceas e do género *Aloe*, à qual pertencem mais de 300 espécies, muitas delas utilizadas em vários países, inclusive no Brasil, para fins medicinais e na cosmética. Dentre as espécies existentes, as mais conhecidas são: *Aloe socotrina*, *Aloe arborescens*, *Aloe chinensis*, *Aloe ferox* e *Aloe vera*, sendo essa última, a mais estudada pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e fitoterápica. Ela também é conhecida como *Aloe barbadenses*, por crescer, espontânea e abundantemente, na ilha de Barbados. O interior de suas folhas é constituído de um tecido parenquimático rico em polissacarídeos (mucilagem), que lhe confere uma consistência viscosa (baba) de onde o nome de babosa. Nessa mucilagem ou gel encontram-se seus princípios ativos, que são constituídos de tecidos orgânicos, enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos (BACH & LOPES, 2007).

Além desses componentes, a babosa possui um polissacarídeo chamado acemannan, que comprovadamente, é um extraordinário imunoestimulante já comprovado nos Estados Unidos pela FDA (Food and Drug Administration). Na sua casca, encontra-se a seiva que é rica em aloína, alantoína, e antraquinonas, que são excelentes cicatrizantes, porém, seu uso interno tem efeito laxante e para algumas pessoas pode afetar os rins, motivo pelo qual a casca da babosa ou sua seiva não devem ser usadas internamente (CREA, 1995).

## **4 – EXPERIMENTAL**

### **4.1 – Materiais e Métodos**

#### **4.1.1 - Colônia de Mosquitos *A. aegypti***

A colônia de mosquitos da espécie *A. aegypti* foi mantida no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios (LaSIF) situado no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Os ovos dos mosquitos *A. aegypti* foram provenientes de criadouros encontrados no município de Maceió, e foram fornecidos pela equipe do Núcleo de Entomologia de Alagoas, pertencente à FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Para a manutenção contínua de mosquitos saudáveis em laboratório, a cada 6 meses foram formadas novas colônias parentais com ovos provenientes do campo. As colônias de mosquitos foram mantidas em fotoperíodo de 12L:12E horas, sendo a temperatura do laboratório na faixa de 30±2°C, com umidade relativa do ar de 50-60%

A alimentação da fase imatura (larvas) da colônia de mosquitos foi realizada através da utilização de ração para gatos (LeRoy Mix), assim como através da utilização de ração em flocos, especial para peixes de aquários (Alcon BASIC). Sacarose P.A. (Vetec) foi utilizada para a preparação da alimentação dos adultos.

#### **4.1.2 – Gaiolas**

As gaiolas utilizadas nos bioensaios de oviposição foram produzidas de forma artesanal no município de Arapiraca (AL). As gaiolas foram confeccionadas com medidas de 30 x 30 x 30 cm, com estruturas de madeira e teladas com nylon.

#### **4.1.3 – Suportes de Oviposição**

Os suportes de oviposição utilizados nos bioensaios de oviposição foram preparados a partir de papel de filtro qualitativo (Qualy). Para a preparação dos suportes na forma de cone foram utilizados papel de filtro na forma de círculo com 15 cm de diâmetro. Para a preparação dos suportes flutuantes, foram utilizados papéis de filtro na forma de círculo com 4,8 cm de diâmetro sustentado na superfície da água sob cortiça ou isopor (espessura de 2 e 5 mm,

respectivamente) também na forma de círculo com diâmetro de 3,5 cm. O diâmetro do suporte flutuante deve sempre ser menor (aproximadamente 2 cm) do que o diâmetro da boca do copo.

#### **4.1.4 – Águas Testes**

As amostras aquosas (águas testes) estudadas em relação ao potencial estimulante de oviposição do mosquito *A. aegypti* foram coletadas dos criadouros aquáticos encontrados no campo, assim como preparadas através da infusão de plantas:

- As folhas da planta babosa (*Aloe vera*) foram diversas vezes coletadas no município de Arapiraca – AL, no período de janeiro de 2007 a março de 2008.
- As folhas de bambu foram coletadas no Instituto do Bambu localizado no Campus da Universidade Federal de Alagoas – AL, no dia 16 de agosto de 2007.
- A infusão de feno (IF) foi cedida pelo Sr. Edson Pacheco, Coordenador do Núcleo de Entomologia de Alagoas da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). A infusão foi preparada pela fermentação anaeróbica de 83,4 g de feno em 10 litros de água de torneira durante 1 semana segundo a metodologia de FAY & ELIASON (1966).

#### **4.1.5 – Solventes**

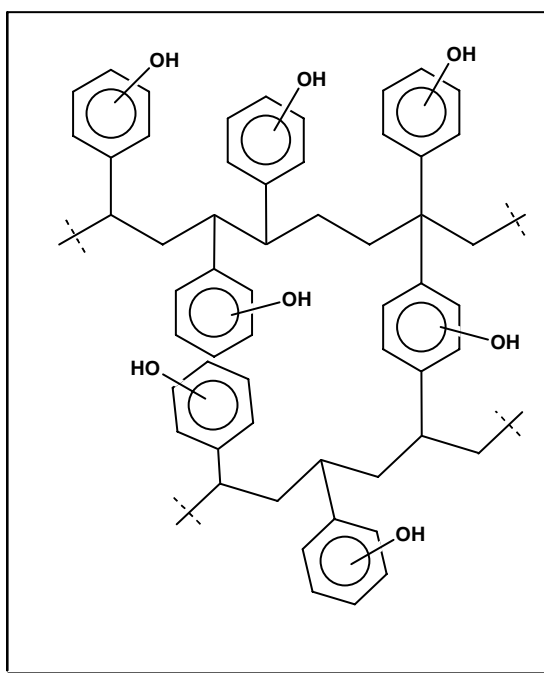
- O éter etílico (Vetec) utilizado para a extração líquido-líquido, extração por sorção em barras de agitação e extração em fase sólida, foi estabilizado com BHT (2,6-bis(1,1-dimetil)-4-metilfenol) (5mg/L), grau UV/HPLC. O éter dietílico utilizado para a SPE e a SBSE foi destilado momento antes de sua utilização.
- O metanol (Vetec) utilizado para o condicionamento da coluna de SPE foi grau UV/HPLC.

#### 4.1.6 – Nitrogênio

O nitrogênio gasoso utilizado na preparação dos extratos foi da White Martins grau analítico 5,0.

#### 4.1.7 – Extração em Fase Sólida (SPE)

As extrações em fase sólida foram realizadas com colunas de vidro no formato de seringa da marca IST – International Sorbent Technology - Isolute® de capacidade 6 mL contendo fases no modo mistura em camadas C2/ENV+ (700 mg). A estrutura química de ENV<sup>+</sup>, um copolímero de divinilbenzeno poliestireno-hidroxilado é mostrado na Figura 15.



**Figura 15:** Estrutura Química do Isolute ENV<sup>+</sup>

#### 4.1.8 – Extração por Sorção com Magneto de Agitação (SBSE)

As extrações por sorção com magneto de agitação foram realizadas com magnetos da marca Gerstel GmbH de comprimento 2,5 cm e tendo como fase sólida polidimetilsiloxano (PDMS).

#### **4.1.9 – Cromatografia Gasosa (GC)**

A Cromatografia gasosa foi realizada em aparelho Agilent 6890, contendo coluna capilar apolar de polidimetilsiloxano (HP1) (50 m x 0,32 mm ID; 0,32  $\mu$ m) e coluna capilar polar DB-WAX (30 m x 0,32 mm ID; 0,32  $\mu$ m). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio e o detector foi o de ionização de chama (FID). A temperatura do forno foi de 30 °C durante 1 min, e programada para aumentar 5 °C por min até atingir a temperatura de 150 °C, então 10 °C por min até 240 °C. Estes experimentos foram realizados pelo nosso grupo parceiro: Grupo de Ecologia Química – Rothamsted Research – Inglaterra.

#### **4.1.10 – Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massa (GC-MS)**

A Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada em aparelho Hewlett-Packard 5890 contendo coluna capilar apolar de polidimetilsiloxano (HP1) (50 m x 0,32 mm ID; 0,32  $\mu$ m). O gás de arraste utilizado foi o hélio. Impacto eletrônico a 70 eV, 250 °C. A temperatura do forno foi de 30 °C durante cinco minutos e programada para aumentar cinco °C por minuto até atingir a temperatura de 250 °C. Estes experimentos foram realizados pelo nosso grupo parceiro: Grupo de Ecologia Química – Rothamsted Research – Inglaterra.

#### **4.1.11 – Estudos eletrofisiológicos**

Antenas de fêmeas acasaladas do mosquito *Aedes aegypti* foram testadas em relação à sensibilidade de determinadas substâncias pelo registro de eletro-antenogramas (EAG). Registros de eletro-antenogramas foram realizados usando eletrodos de vidro Ag-AgCl, preenchidos com uma solução salina (“Insect Ringer”) detalhada abaixo. A cabeça do inseto foi removida usando um bisturi e com o uso de um microscópio binocular. A cabeça do inseto foi então colocada no micro-eletrodo indiferente, com o topo da cabeça e as antenas apontando para fora. Efetua-se um pequeno corte na ponta das antenas e o eletrodo foi colocado na garra especial para eletrodos. Assim, o eletrodo de registro já colocada na garra foi deslocado em direção as pontas das antenas e aproximados. Os sinais provenientes das antenas foram amplificados (x 10.000) e analisados em um computador usando um programa especial para isto (Syntech, Holanda). Os compostos testes (em 10  $\mu$ L de solvente) foram aplicados em tiras de papel de filtro de tamanho 25 x 8 mm. Deixa-se o solvente evaporar

(aproximadamente 30 segundos) e o papel foi colocado em uma pipeta de Pasteur individual. O solvente éter etílico foi utilizado como controle. A pipeta foi então conectada a um aparelho, que com o apoio do pé fornecem um jato de ar de  $1,5 \text{ mLs}^{-1}$ , ligados a uma corrente de ar umidificada com um fluxo de  $1 \text{ Lmin}^{-1}$  diretamente sobre a antena. Os sinais foram amplificados através de um aparelho SyntechUN-03 AC/DC amplifier. A umidade do ar mais elevada foi mantida pela colocação de algodão embebido em água colocado próximo à elaboração. Estes experimentos foram realizados pelo nosso grupo parthenário: Grupo de Ecologia Química – Rothamsted Research – Inglaterra.

#### **Composição da solução “Insect Ringer” (1 litro)**

Cloreto de sódio	7,55g
Cloreto de potássio	0,64g
Cloreto de cálcio (diidratado)	0,22g
Cloreto de magnésio	1,73g
Bicarbonato de sódio	0,86g
Ortofosfato de sódio	0,61g

#### **4.1.12 – Análise estatística**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (a fim de testar a hipótese de nulidade). Para a determinação do possível estímulo químico (capacidade atrativa) para a oviposição, os dados dos números de ovos foram registrados para cada experimento e foram transformados em porcentagem. Em seguida, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5, foram submetidos à análise pelo teste t de Student não pareado. O nível de significância ( $\alpha$ ) estabelecido foi de 0,05. A discussão estatística foi realizada através do valor obtido de P (MOTULSKY, 2003).

O valor de P é uma probabilidade, que varia de zero à um. Se o valor de P for menor do que o  $\alpha$  estabelecido pode-se garantir que a diferença entre a média das amostras não é devido à casualidade, rejeitando-se a hipótese nula. Se o valor de P for menor que 0,001, o resultado da análise estatística será classificado como extremamente significativo. Se o valor de P estiver entre 0,001 à 0,01, será classificado como muito significativo. Se o valor de P estiver entre 0,01 à 0,05 será classificado como significativo. Se o valor P for maior que 0,05, será classificado como não significativo (MOTULSKY, 2003).

#### **4.1.13 – Testes de Campo**

Os testes de campo foram realizados nos bairros Jacintinho e Jatiúca, localizados no município de Maceió – AL. Foram realizados 80 repetições de oviposição em ambientes peridomiciliares. Todas as 80 casas selecionadas para a instalação das ovitrampas possuíam quintal, ou jardim com algum tipo de vegetação. As armadilhas de oviposição (ovitrampas) foram instaladas e recolhidas pela equipe técnica do Núcleo de Entomologia da Alagoas (NEAL), da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Os testes de campo foram realizados no período de 19 de outubro a 12 de novembro de 2007. As armadilhas foram instaladas em 20 repetições por semana, totalizando 80 repetições, sempre no período da manhã e recolhidas no período da tarde 5 dias após a instalação.



## **4.2 – Procedimento Experimental**

### **4.2.1 – Formação da colônia de mosquitos da espécie *Aedes aegypti***

#### **4.2.1.1 – Larvas**

Em uma bacia de plástico retangular de dimensões 45 x 27 x 8 cm contendo 2L de água destilada foram colocados aproximadamente 500 ovos aderidos em papéis de filtro. Após imersão dos papéis de filtro na água durante 4 horas, ocorreu a eclosão de praticamente todas as larvas. Os papéis de filtro foram então lavados com água destilada com o auxílio de uma pisseta e então removidos. Foram então adicionados aproximadamente 4g de alimento especial para gatos (LeRoy Mix) ou peixes (Alcon BASIC). A temperatura da água foi mantida no intervalo de 27-29 °C a uma profundidade de 3 a 4 cm, e a bacia foi coberta com um tecido tule. O desenvolvimento e alimentação das larvas foram monitorados diariamente, adicionando-se mais ração conforme o necessário.

#### **4.2.1.2 – Pupas**

A partir do quinto dia após a imersão dos ovos em água foram removidas as primeiras pupas (maioria machos) com o auxílio de uma pipeta de plástico. Estas foram classificadas de acordo com o tamanho, em pupas machos e pupas fêmeas. Vinte (20) pupas maiores (consideradas fêmeas) e cinco (05) pupas menores (consideradas machos) foram colocadas em um copo plástico com água destilada. O copo plástico contendo as pupas foi então transferido para uma gaiola no aguardo das emergências dos adultos. As pupas não precisam de alimentação.

#### **4.2.1.3 – Adultos**

As formas aladas (adultos) foram alimentadas com solução de sacarose à 10 % através de um algodão embebido diariamente com a solução e colocado em copo de plástico descartável de capacidade 50 mL. O algodão foi embebido diariamente com a solução e trocado a cada três dias. As fêmeas com idade de quatro a seis dias realizaram o primeiro e único repasto sanguíneo durante o dia utilizando pombos da espécie *Columba livia*. Uma

parte do corpo do pombo foi depenada, e em seguida o pombo foi imobilizado, nesse momento deixando a parte depenada em contato com a tela superior da gaiola durante uma hora. As fêmeas partiram rapidamente em direção ao alimento. Durante o repasto sanguíneo a solução de sacarose foi removida.

#### **4.2.2 – Bioensaios comportamentais de oviposição**

Os bioensaios comportamentais foram sempre realizados com 20 fêmeas acasaladas do mosquito *A. aegypti* aprisionadas em gaiola de estrutura de madeira. As fêmeas aprisionadas possuíam idade entre sete a nove dias e os bioensaios foram realizados 60 horas após o repasto sanguíneo. As gaiolas também continham dois copos descartáveis de 100 mL cada, o primeiro copo continha 90 mL da água teste, e o segundo copo continha 90 mL da água controle (água destilada). Para os bioensaios realizados com o extrato etéreo, este foi adicionado diretamente no papel de filtro. Ambos os copos continham papéis de filtro em contato com a água e atuavam como suporte de oviposição das fêmeas acasaladas. Os copos ficaram em posição diagonal durante 16 horas. Os ovos postos nos copos foram recolhidos e quantificados com o auxílio de uma lupa ou mesmo a olho nu. Cada procedimento foi repetido no máximo 12 vezes e no mínimo 4 vezes, para que os resultados obtidos fossem tratados estatisticamente pelo teste *t de Student*.

#### **4.2.3 – Preparação das Águas Testes**

##### **4.2.3.1 – Infusão de *Aloe vera* (Babosa) (IB)**

Em um béquer com capacidade de quatro litros foram colocados 560g de folhas inteiras de babosa cortadas. As folhas foram deixadas em sentido vertical e em seguida foram colocado 2,5 L de água destilada. A água destilada pode também ser substituída por água de poço não clorada. O béquer foi então tapado com tecido tule e foi observado que em apenas uma hora de contato a infusão já começou a ficar de cor vermelha clara. Após uma semana de fermentação aeróbica as folhas foram então retiradas e a solução cor de vinho foi então transferida para um vasilhame de plástico próprio para armazenamento de água mineral de capacidade cinco litros. O vasilhame foi tapado com tecido tule e então guardado à temperatura ambiente.

Um excelente resultado foi obtido quando a planta recentemente retirada da terra com a raiz é transportada até o laboratório e as folhas foram cortadas próximas ao caule e deixadas em fermentação aeróbica durante uma semana em água destilada na proporção de 226 gL<sup>-1</sup>. A infusão de cor-de-vinho obtida pôde então ser armazenada a temperatura ambiente durante meses sem que houvesse perda da atividade biológica. Os resultados dos bioensaios de oviposição realizados com a infusão de *Aloe vera* (babosa) preparada em laboratório estão descritos na Tabela 5.

#### **4.2.3.2 – Infusão de *Aloe vera* Concentrada (IBC)**

Em um béquer com capacidade de 4L foram colocados 1.620g de folhas inteiras de babosa recentemente cortadas. As folhas foram deixadas em sentido vertical e em seguida foram colocados dois litros de água destilada conforme mostrado na Figura 16. A água destilada pôde também ser substituída por água de poço não clorada. O béquer foi então tapado com tecido tule e a infusão foi deixada em fermentação aeróbica durante uma semana. As folhas foram então retiradas e a solução cor de vinho foi então transferida para um vasilhame de plástico próprio para armazenamento de água mineral de capacidade cinco litros. O vasilhame foi tampado com tecido tule e foi então guardado à temperatura ambiente.

O controle e vigilância do mosquito *A. aegypti* no estado de Alagoas é realizado através da avaliação da densidade larvária nos imóveis existentes em área urbana (Índice de Breteau - IB). No entanto, para o estudo da resistência do mosquito *A. aegypti* pelo larvicida temefós, se faz necessário, primeiramente a captura de ovos através da utilização de armadilhas de oviposição. Nestas armadilhas, a equipe técnica da FUNASA utiliza como atraente de oviposição uma infusão de feno diluída em água de torneira na concentração de 10 % v/v (PACHECO, 2008). A infusão de feno é preparada segundo a metodologia de FAY & ELIASON (1966).

Portanto, para a realização dos testes de campo pela mesma equipe foi necessário preparar uma infusão de babosa mais concentrada para facilitar o transporte desta ao campo. Em campo, a infusão de babosa deveria também ser diluída em água de torneira na concentração de 10% v/v e ainda conservar sua atividade biológica. Assim, a infusão de babosa concentrada (IBC) foi preparada em concentração maior do que a IB, e depois diluída também na concentração de 10% v/v. Finalmente a infusão foi testada em laboratório segundo

o seu comportamento atraente/estimulante de oviposição. Os resultados dos bioensaios foram descritos na Tabela 6.



**Figura 16:** Infusão de *Aloe vera* concentrada

A infusão de feno (IF) também foi avaliada em nosso laboratório segundo seu potencial estimulante de oviposição. No entanto, uma vez que a IF já é utilizada como atraente de oviposição em muitos programas de controle e vigilância, foi realizado apenas um estudo comparativo entre a infusão de feno e a infusão de babosa concentrada. Assim, ambas as infusões (IF e IBC) foram diluídas na concentração de 10% v/v e conseqüentemente comparadas em bioensaios de oviposição para medir o potencial atraente de oviposição. A Tabela 7 mostra os resultados dos bioensaios de oviposição.

#### **4.2.3.3 – Infusão de Folhas de Bambu (IFB)**

Folhas de bambu (46,86 g) com um dia após a coleta foram colocadas em contato com dois litros de água destilada contida em um balde com capacidade três litros. O recipiente de plástico foi então tampado com tecido tule e deixado à temperatura ambiente. Após cinco dias de fermentação aeróbica, as folhas foram retiradas da infusão e esta foi filtrada em algodão à pressão atmosférica. Foram obtidos 1,8 L de infusão a qual foi armazenada em recipiente plástico, o qual foi mantido fechado (diferentemente da preparação da infusão de *Aloe vera*) à temperatura ambiente até que fosse utilizada nos bioensaios de oviposição.

#### **4.2.4 – Preparação de Amostras**

As amostras etéreas foram preparadas a partir da extração e do enriquecimento dos solutos presentes na matriz aquosa. Os procedimentos utilizados no trabalho de mestrado estão detalhados a seguir.

##### **4.2.4.1 – Extração Líquido-Líquido (LLE)**

Em um funil de separação de capacidade 250 mL suportado por um aro de funil conectado a um suporte universal foi adicionado 100 mL da infusão de babosa concentrada, seguido de adição de 30 mL de éter etílico. O funil de separação foi fechado com tampa esmerilhada, e este foi agitado rapidamente, abrindo-se a torneira do funil de tempos em tempos para normalizar a pressão interna. As fases orgânica e aquosa foram separadas, e a fase aquosa foi novamente colocada no balão de extração sendo repetido o procedimento de extração por mais duas vezes, sempre utilizando o mesmo volume de éter etílico (30 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com 30 mL de água destilada e então concentradas através de um fluxo de nitrogênio gasoso até um volume final de quatro mL. O concentrado foi então transferido para um pequeno vidro (4 mL), o qual foi fechado e deixado em freezer a uma temperatura de -18 °C durante 4 horas. Houve então uma nova separação entre as fases orgânica e aquosa. Com a fase aquosa inferior congelada, a fase etérea foi rapidamente transferida para uma ampola, a qual foi em seguida fechada com o uso de chama. Parte da amostra etérea foi então enviada por correio ao nosso grupo parceiro para análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, e outra parte foi utilizada nos bioensaios de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*. Essa mesma metodologia foi aplicada para os extratos LLE-I, LLE-II, LLE-III e LLE-IV.

##### **4.2.4.2 – Extração por Sorção em Barras de Agitação (SBSE)**

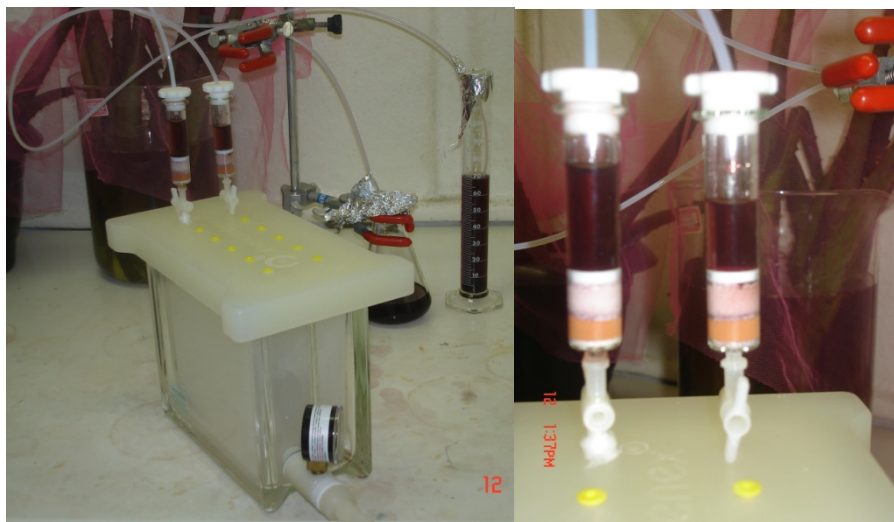
Em um erlenmeyer de capacidade 250 mL foram adicionadas 100 mL de infusão de babosa concentrada. Em seguida o magneto da SBSE foi suavemente colocado dentro do erlenmeyer com o auxílio de uma pinça. O erlenmeyer foi tampado com papel alumínio, e com o auxílio de uma garra e de um suporte universal foi deixado debaixo da placa de agitação magnética à 1200 rpm por três horas. O magneto foi retirado da solução com o

auxílio de uma pinça e colocado em superfície de papel toalha, sendo então rapidamente lavado com um pequeno jato de água destilada. O magneto foi então suavemente enxuto com papel toalha e depois transferido para dentro de uma pipeta de Pasteur com a ponta cortada. A pipeta de Pasteur foi então colocada dentro de recipiente de vidro pequeno (capacidade 4 mL) e o magneto pode então ser lavado com 800  $\mu$ L de éter etílico destilado (dessorção por solvente). O recipiente de vidro foi tampado e o extrato etéreo foi mantido em freezer a uma temperatura de -18 °C até que fosse utilizada nos bioensaios de oviposição ou analisada por experimentos (GC-FID), (GC-MS) e (GC-EAG).

O extrato denominado SBSE-I foi obtido através da SBSE de 100 mL de IBC. A lavagem do magneto foi realizada com 2,5 mL éter etílico. Nos bioensaios de oviposição, o extrato etéreo foi adicionado no suporte de oviposição colocado no copo teste, e o mesmo volume de éter etílico foi adicionado no suporte de oviposição do copo controle. O suporte de oviposição utilizado foi o papel de filtro na forma de cone. A Tabela 12 mostra os resultados dos bioensaios de oviposição.

#### **4.2.4.3 – Extração em Fase Sólida (SPE)**

Um sistema convencional para a realização da extração em fase sólida foi montado conforme mostra a Figura 17. Assim, as etapas para o processo geral da SPE foram iniciadas. A coluna de SPE foi condicionada com 10 mL de metanol, seguido de lavagem da coluna com 10 mL de água destilada para a remoção do metanol. Assim, 100 mL de infusão de babosa (IB) recentemente filtrada em papel de filtro, foi aplicada à coluna (aproximadamente 5 horas) com o auxílio de uma bomba de vácuo. A coluna foi então lavada com 10 mL de água destilada e depois secada durante 2 horas através de vácuo e utilizando um pequeno tubo de carvão ativo no topo da coluna. Finalmente a eluição dos analitos pode ser feita através da passagem de 2 mL de éter etílico. A amostra etérea foi recolhida em ampola, depois fechada e mantida a uma temperatura de -18°C até que fosse utilizada nos bioensaios de oviposição ou analisada por experimentos de cromatografia gasosa (GC-FID), (GC-MS) e (GC-EAG).



**Figura 17:** Extração em fase sólida

O extrato denominado SPE-I foi obtido através da extração em fase sólida de 30 mL de IBC. Para a etapa de eluição da coluna foi utilizado éter etílico. Nos bioensaios de oviposição, o extrato etéreo foi adicionado no suporte de oviposição colocado no copo teste, e o mesmo volume de éter etílico foi adicionado no suporte de oviposição do copo controle. O suporte de oviposição utilizado foi o papel de filtro na forma de cone.

#### **4.2.5 – Destilação do Éter Etílico**

Em um balão de uma boca com capacidade 150 mL adaptado a uma coluna vigreux, termômetro e condensador de refluxo foram adicionados 100 mL de éter etílico. O balão foi fixado através do uso de uma garra e de um suporte universal em cuba com água colocada debaixo da placa de aquecimento/agitação magnética. O éter etílico pôde então ser destilado a uma temperatura de 34 °C.

#### **4.2.6 – Testes de Campo**

Em cada casa foi instalado um bioensaio de oviposição, composto por duas armadilhas de oviposição (ovitrapas) instaladas no solo – uma armadilha teste, e uma armadilha controle. Foi mantida uma distância relativa entre as armadilhas de aproximadamente 1m. Cada armadilha de oviposição foi constituída de um vaso de material plástico de cor preta, com capacidade de 300 mL. A armadilha teste recebeu 20 mL da infusão de babosa concentrada (IBC) e 180 mL de água de torneira. A armadilha controle recebeu 20 mL da

infusão de feno (IF) e 180 mL de água de torneira. Cada armadilha (teste e controle) recebeu uma palheta de madeira (8 x 3 cm), a qual foi colocada em posição vertical com uma parte imersa na solução, e uma parte acima da superfície para o recebimento dos ovos. Após cinco dias, todos os experimentos foram recolhidos e levados até o laboratório para a quantificação dos ovos.



## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 – Bioensaios de Oviposição com Águas Provenientes de Criadouros de Campo

É de conhecimento que as substâncias voláteis emitidas de criadouros larvais têm sido implicadas como mediadores potenciais do comportamento da oviposição de fêmeas de mosquitos. Estas substâncias podem ser feromônios de oviposição ou atraentes de oviposição dissolvidos em águas de criadouros naturais ou de criadouros artificiais (BENTLEY & DAY, 1989). Assim, para a realização de um estudo do potencial estimulante de criadouros aquáticos em relação ao comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*, iniciamos primeiramente um grande trabalho de procura e coleta de criadouros aquáticos deste mosquito.

Várias águas de criadouros aquáticos do mosquito *A. aegypti* foram encontrados, coletados, transportados até o laboratório, e em seguida filtrados em papel de filtro à pressão atmosférica. As amostras aquosas obtidas foram então transferidas para recipientes plásticos, etiquetadas e depois mantidas à temperatura de -18°C até que fossem utilizadas nos bioensaios de oviposição. Alguns destes bioensaios de oviposição realizados com a fêmea do mosquito *A. aegypti* estão descritos a seguir.

#### 5.1.1 – Água coletada de pneu de trator (APT)

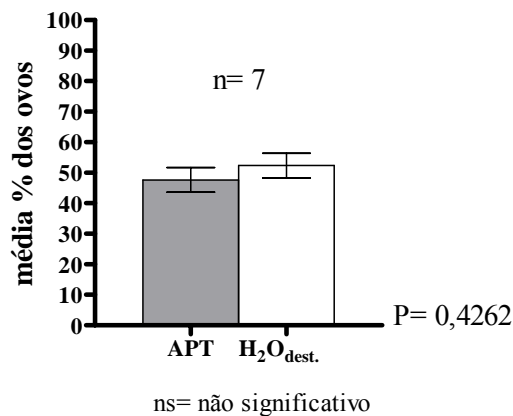
Um dos grandes problemas da disseminação do mosquito *A. aegypti* é a grande quantidade de pneus sem uso descartados no meio ambiente. Na estação das chuvas, os pneus podem acumular grande quantidade de água, formando assim verdadeiros criadouros aquáticos de mosquitos (LOUNIBOS, 2002). Dessa forma, um pneu de trator foi encontrado abandonado no município de Rio Largo, contendo um criadouro aquático com larvas do mosquito *A. aegypti*. A amostra aquosa (dois litros) foi coletada, transportada até o laboratório, filtrada e testada nos bioensaios comportamentais de oviposição. Os números de ovos depositados na água teste (APT) e na água controle (água destilada), assim como a média destes valores estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Bioensaio de Oviposição: APT x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

APT: Teste; H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> : Controle								
<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>Média</b>
<b>T</b>	180	430	43	251	304	283	297	255±111
<b>C</b>	550	304	41	284	295	288	253	288±137

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

Foram então realizados sete (07) bioensaios de oviposição com a água coletada de pneu de trator (APT). Nos bioensaios de números um, quatro e seis houveram mais ovos depositados na água controle do que na água teste. Nos bioensaios (números dois, três, cinco e sete), apesar da água APT ter recebido maior número de ovos em comparação com a água destilada, a diferença do total no número de ovos não foi significativa. A água coletada de um pneu de trator (Figura 18) não se mostrou atraente/estimulante para a realização da oviposição mosquito *A. Aegypti*. Mosquitos *Aedes spp.* tem o hábito de espalhar seus ovos em vários depósitos aquáticos diferentes (FUNASA, 2001), o que justificaria a presença de larvas do mosquito *Ae. aegypti* na água encontrada dentro do pneu de trator.



**Figura 18:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente APT x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.1.2 – Água proveniente de córrego do bairro do Trapiche (AT)

O Bairro do Trapiche é considerado como um dos locais de maior índice de infestação do mosquito *C. quinquefasciatus*. O feromônio de oviposição deste mosquito já foi isolado e identificado como sendo o composto (-)-(5R,6S)-6-acetoxi-5-hexadecanolida (LAURENCE & PICKETT, 1982). Apesar de nosso projeto inicial basear-se no estudo de criadouros potenciais do mosquito *A. aegypti*, com o desenvolvimento de nosso trabalho, não

descartamos a possibilidade de obtenção de um resultado positivo com o estudo de criadouros aquáticos de outros mosquitos vetores de doenças tropicais. Portanto, uma amostra (dois litros) de água de córrego foi coletada e analisada segundo seu potencial estimulante do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti*. Os resultados estão descritos na Tabela 2.

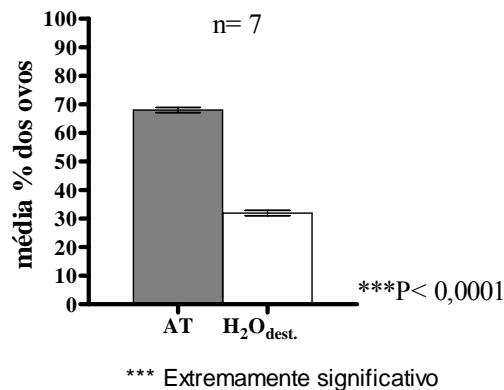
**Tabela 2:** Bioensaio de Oviposição: AT x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

AT: Teste; H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> : Controle								
<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>Média</b>
<b>T</b>	452	407	398	431	419	408	432	421±17
<b>C</b>	221	218	207	180	164	195	203	198±19

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

Em todos os bioensaios realizados, o número de ovos foi sempre superior na água teste (AT) em relação à água controle (H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>). No entanto, a diferença entre o número de ovos depositados na água teste e na água controle não foi satisfatória.

A água proveniente do córrego do Trapiche (Figura 19) recebeu aproximadamente 70% da média do número de ovos em relação ao controle (água destilada). A água coletada de um pneu de trator não atingiu o limiar de 80% do comportamento de oviposição médio para o mosquito *A. aegypti*, sendo assim testadas outras águas.



**Figura 19:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente AT x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.1.3 – Água coletada de criadouro artificial do mosquito *Culex quinquefasciatus* (ACq)

Esta amostra aquosa foi coletada de um vaso de flores contendo grande quantidade de larvas e pupas. As larvas e pupas foram conseqüentemente deixadas em desenvolvimento no

laboratório até que chegassem ao estágio adulto. No estágio adulto, pudemos realizar a identificação mais facilmente da espécie como *C. quinquefasciatus*. Assim, para avaliarmos se criadouros do mosquito *C. quinquefasciatus* seriam estimulantes de oviposição do mosquito *A. aegypti*, cinco bioensaios de oviposição foram então realizados. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.

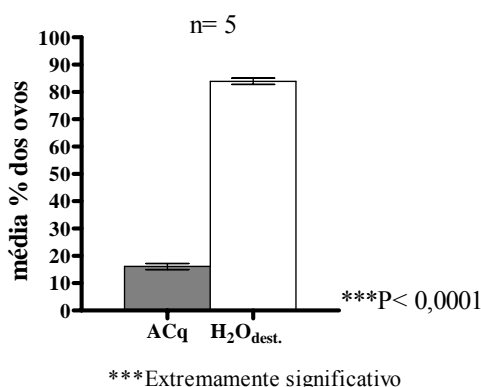
**Tabela 3:** Bioensaio de Oviposição: ACq x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

ACq: Teste; H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> : Controle						
n	1	2	3	4	5	Média
T	107	98	121	114	140	116±14
C	603	589	671	635	540	608±44

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

Em todos os experimentos realizados o número de ovos depositados foi sempre maior na água controle (água destilada) em relação à água teste (água de criadouro do mosquito *C. quinquefasciatus* - ACq). Uma vez que é de conhecimento que os mosquitos utilizam os estímulos contactéis para avaliar a química da água e outros fatores antes da oviposição, a água proveniente de criadouros do mosquito *C. quinquefasciatus* teve efeito repelente/deterrente para o mosquito *A. aegypti* (MBOERA, 1999).

A água proveniente de um criadouro do mosquito *C. quinquefasciatus* (Figura 20) se mostrou repelente em relação ao comportamento de oviposição com somente 16% da média do número de ovos em relação ao controle (água destilada).



**Figura 20:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente ACq x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.1.4 – Água coletada de vaso com Aloe vera (Babosa) (AVB)

Entre as diferentes amostras aquosas coletadas e estudadas em nosso laboratório em relação ao seu potencial estimulante de oviposição, a que mais se destacou foi a amostra aquosa coletada de um pequeno vaso plástico contendo a planta *Aloe vera* (Liliaceae) (AVB) imersa em água. Esta água contendo grande quantidade de larvas e pupas do mosquito *A. aegypti* foi encontrada durante nossos trabalhos de campo no quintal de uma residência localizada no bairro Vergel do Lago, Maceió – AL. A partir da amostra coleta foram realizados os bioensaios de oviposição e os trabalhos iniciais de identificação dos constituintes orgânicos presentes na amostra (NASCIMENTO, 2006). Os resultados dos bioensaios de oviposição realizados com esta amostra estão descritos na Tabela 4.

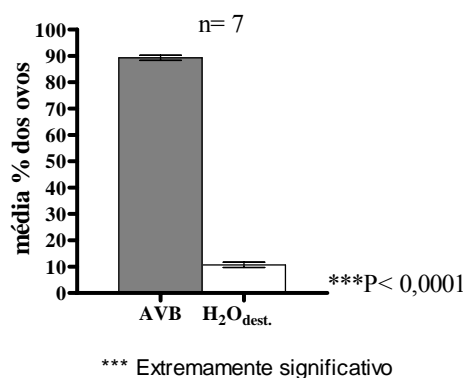
**Tabela 4:** Bioensaio de Oviposição: AVB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

AVB: Teste; H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> : Controle								
n	1	2	3	4	5	6	7	Média
T	563	695	629	708	807	827	851	726±100
C	74	120	54	104	96	89	70	87±21

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

Conforme observa-se pelo número de ovos depositados pelas fêmeas acasaladas do mosquito *A. aegypti*, os resultados com a água encontrada em campo foram bastante promissores. Em todas as sete repetições realizadas houve sempre a preferência da fêmea do mosquito pela água teste (AVB) em relação a água controle (água destilada).

A água proveniente de um vaso com babosa (Figura 21) foi a mais atraente/estimulante para mosquito *A. aegypti* realizar a oviposição, atingindo quase 90% da média do número de ovos em relação ao controle (água destilada).



**Figura 21:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente AVB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

## 5.2 – Bioensaios de Oviposição com Infusões de Plantas Preparadas em Laboratório

Mesmo tendo o conhecimento de que duas infusões nunca são idênticas, uma vez que a composição das substâncias orgânicas dissolvidas em uma infusão depende do material orgânico que está sendo fermentado, temperatura, tempo de fermentação, e outros fatores (MILLAR *et al.*, 1992), foram preparadas em laboratório diferentes infusões de *Aloe vera*. Estas foram preparadas na tentativa de obter uma composição orgânica que pudesse fornecer resultados de bioensaios de oviposição próximos ou melhores daqueles que obtidos com a água coletada em campo denominada AVB.

Portanto, diferentes procedimentos para a preparação de infusões de babosa foram realizados em nosso laboratório. As infusões obtidas foram então analisadas segundo seu potencial estimulante de oviposição para a fêmea grávida do mosquito *A. aegypti*. Os procedimentos experimentais para a obtenção de todas as infusões de babosa e os resultados dos testes de oviposição obtidos com estas infusões não serão aqui descritos, sendo relatadas somente as preparações das infusões que nos forneceram as melhores seletividades nos experimentos de oviposição, assim como os respectivos resultados dos bioensaios de oviposição.

### 5.2.1 – Infusão de *Aloe vera* (Babosa)(IB)

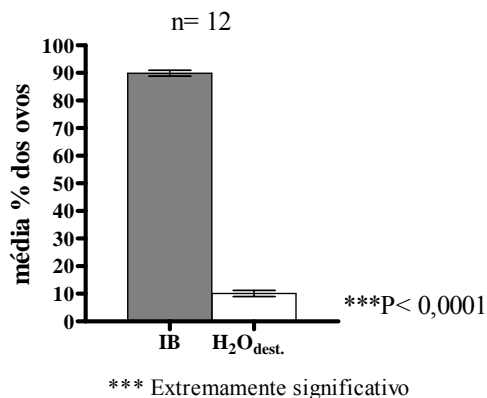
Tendo em mãos uma metodologia para a preparação da infusão de *Aloe vera*, foram realizados vários bioensaios de oviposição com a infusão. O número de ovos depositados na água teste (IB) foi sempre muito superior ao número de ovos depositados na água controle ( $H_2O_{dest.}$ ), comprovando assim a eficácia da infusão de *Aloe vera* como atraente e/ou estimulante de oviposição de fêmeas acasaladas do mosquito *A. aegypti* (ver tabela 5).

**Tabela 5:** Bioensaio de Oviposição: IB x  $H_2O_{dest.}$

IB: Teste; $H_2O_{dest.}$ : Controle													
n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Média
T	651	704	596	623	721	827	700	683	707	729	693	718	696±56
C	108	117	78	104	112	131	53	44	51	47	61	45	79±30

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

A infusão de babosa (Figura 22) se mostrou reprodutível em laboratório. Sendo considerado um excelente atraente/estimulante de oviposição com atividade de oviposição superior a 90% da média de oviposição do mosquito *A. aegypti*.



**Figura 22:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.2.2 – Infusão de babosa concentrada (IBC)

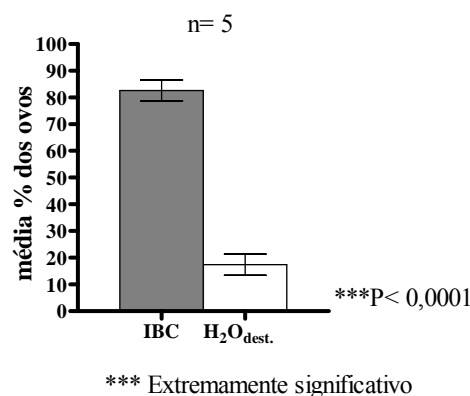
Todos os bioensaios realizados a partir da infusão de babosa concentrada (IBC) foram excelentes (ver tabela 6). A nova metodologia de preparação de uma infusão de babosa mais concentrada para facilitar o transporte ao campo e depois diluída precedentemente a realização do bioensaio de oviposição deveria fornecer resultados interessantes no campo, uma vez que os resultados em laboratório foram excelentes.

**Tabela 6:** Bioensaio de Oviposição: IBC x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

IBC: Teste; H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> : Controle						
n	1	2	3	4	5	Média
T	340	708	128	539	439	431±194
C	71	28	46	93	149	77±42

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

A infusão de babosa concentrada (Figura 23) também se mostrou reprodutiva tendo atividade de oviposição superior a 80% da oviposição média para o mosquito *A. aegypti*.



**Figura 23:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IBC x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.2.3 – Infusão de feno (IF)

O teste de oviposição realizado para fazer um estudo comparativo da infusão de feno (IF) *versus* a infusão de babosa concentrada (IBC), ambas as infusões na concentração de 10% v/v obteve uma quantidade de ovos significativa em ambas as infusões, como está mostrado na tabela 7. Embora a quantidade de ovos dê preferência pela infusão de babosa. No entanto, a IBC tem algumas vantagens em relação à IF: IF tem cheiro forte enquanto a IBC tem um cheiro suave quase não perceptível para equipe do laboratório. Além disso, IBC pode ainda ser reaproveitada e estocada sem que haja diminuição da atividade biológica. A IF não pode ser reaproveitada, pois perde a atividade biológica após aproximadamente seis meses do preparo.

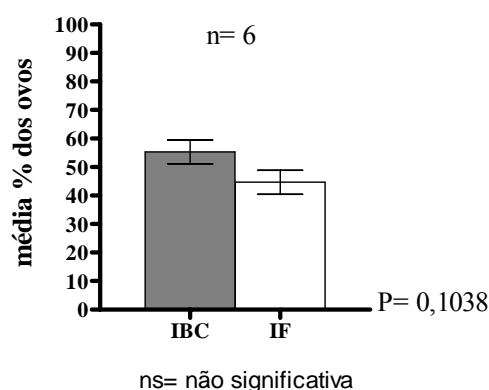
**Tabela 7:** Bioensaio de Oviposição: IBC x IF

IBC: Teste; IF: Controle							
<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Média</b>
<b>T</b>	713	297	303	509	103	764	448±237
<b>C</b>	684	341	325	509	58	296	369±193

**n** = número do bioensaio; **T** = número de ovos na IBC; **C** = número de ovos na IF

A análise estatística do resultado IB x IF (Figura 24) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as infusões, embora tivesse uma tendência para IBC em relação a IF.





**Figura 24:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IBC x IF

#### 5.2.4 – Infusão de folhas de bambu (IFB)

A infusão de folhas de *Bambusa vulgaris* (Poaceae) (IFB) também foi analisada em relação ao seu potencial estimulante do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*. Assim, a infusão preparada foi diluída na concentração de 10% v/v, depois foi utilizada diretamente nos bioensaios de oviposição. Para o controle foi utilizada a água destilada. A Tabela 8 mostra os resultados dos bioensaios de oviposição.

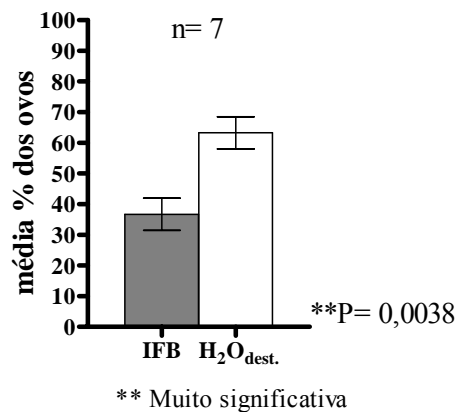
**Tabela 8:** Bioensaio de Oviposição: IFB x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

IFB: Teste; H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> : Controle								
n	1	2	3	4	5	6	7	Média
T	469	236	184	539	177	171	583	337±171
C	257	529	448	1061	632	224	1146	614±338

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

Pela análise da Tabela 8 acima, pode-se concluir que a infusão de folhas de bambu utilizada na concentração de 10% não pode ser considerada como uma infusão atraente de oviposição. Em todos os bioensaios houve um grande número de ovos no copo controle, diferentemente dos bioensaios realizados na presença da infusão de *Aloe vera*.

A infusão de folhas de bambu (Figura 25) se mostrou repelente em relação ao comportamento de oviposição.



**Figura 25:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente IFC x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.3 – Bioensaios de Oviposição com Extratos Etéreos de IBC

Com os excelentes resultados obtidos nos testes de oviposição, quando utilizados a IBC como atraente de oviposição, o próximo passo foi trabalhar na extração e isolamento das substâncias orgânicas dissolvidas nesta infusão. Posteriormente, foram realizados novos testes de oviposição com os extratos obtidos, com a finalidade de identificar se os princípios ativos responsáveis pelo estímulo de oviposição que estariam presentes nos extratos. Três diferentes técnicas para a extração e isolamento das substâncias orgânicas dissolvidas em IBC foram realizadas: Extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração por sorção em barras de agitação. Os resultados dos testes de oviposição realizados com os extratos e as análises estatísticas destes resultados estão relacionados a seguir.

#### 5.3.1 – Extração líquido-líquido I (LLE-I)

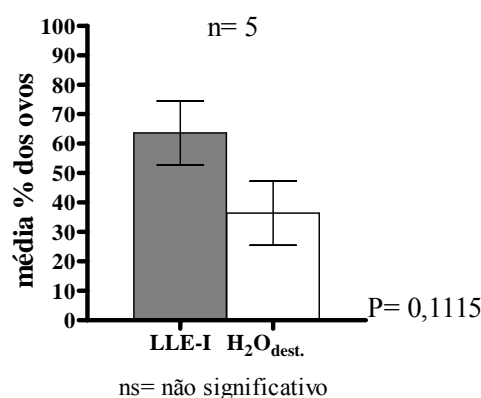
Nos bioensaios de oviposição, o extrato etéreo foi adicionado no suporte de oviposição colocado no copo teste, e o mesmo volume de éter etílico foi adicionado ao suporte de oviposição do copo controle. O suporte de oviposição utilizado foi o papel de filtro na forma de cone. A Tabela 9 mostra os resultados dos bioensaios de oviposição.

**Tabela 9:** Bioensaio de Oviposição: LLE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Volume final do extrato: 2,7 mL: 300 µL de extrato para cada bioensaio						
n	1	2	3	4	5	Média
T	100	65	60	117	330	134±100
C	35	53	135	74	10	61±42

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

A Figura 26 mostra a análise estatística do resultado do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* frente ao extrato etéreo obtido pela extração líquido-líquido I. O resultado não foi significativo para o comportamento de oviposição deste mosquito.



**Figura 26:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente LLE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.3.2 – Extração líquido-líquido II (LLE-II)

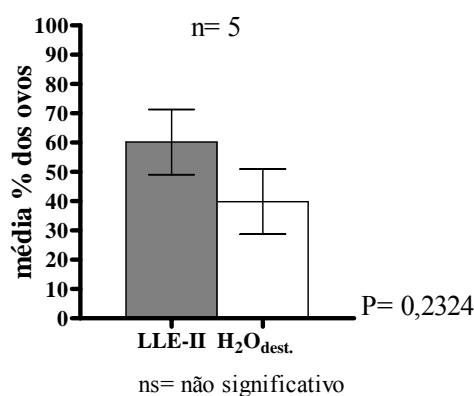
Nas Tabelas 9 e 10 está descrito o volume obtido através da LLE (2,7 mL), assim como os volumes de extrato utilizado em cada bioensaio. O número de ovos postos pelas fêmeas do mosquito *A. aegypti* nos bioensaios de oviposição utilizando como atraente de oviposição os extratos etéreos LLE-I e LLE-II foram bastante baixos. O extrato obtido através da extração líquido-líquido de 100 mL da infusão de babosa concentrada (IBC) com éter dietílico não pode ser considerado biologicamente ativo em relação ao estímulo da oviposição com as amostras utilizadas (300 e 500 µL para o primeiro e segundo lotes de bioensaios de oviposição). Assim, outras técnicas de extração de amostras aquosas foram realizadas e os extratos obtidos através dessas extrações foram também testados em relação ao potencial estimulante do comportamento de oviposição.

**Tabela 10:** Bioensaio de Oviposição: LLE-II x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Volume final do extrato: 2,7 mL: 500 µL de extrato para cada bioensaio						
n	1	2	3	4	5	Média
T	46	192	33	142	177	118±66
C	62	166	65	9	53	71±52

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

A Figura 27 mostra que a análise estatística do resultado do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* frente ao extrato etéreo obtido pela extração líquido-líquido II não foi significativo para o comportamento de oviposição deste mosquito.



**Figura 27:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente LLE-II x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.3.3 – Extração em fase sólida (SPE)

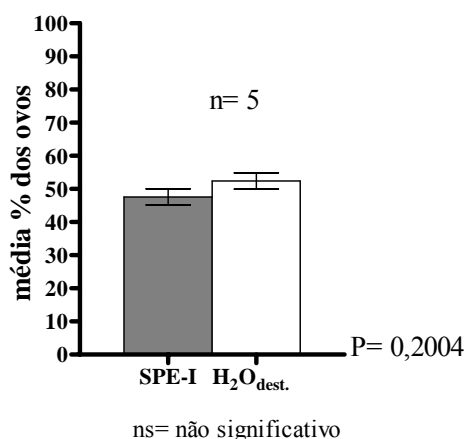
A partir de 2,0 mL do extrato etéreo obtido através da realização da extração em fase sólida foram realizados um bioensaios de oviposição. Como mostra a Tabela 11, embora o número de ovos postos pelas fêmeas tenha sido significativo nos bioensaios realizados, não houve preferência pela água teste no momento da postura.

**Tabela 11:** Bioensaio de Oviposição: SPE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Volume final do extrato: 2,0 mL: 400 µL de extrato para cada bioensaio						
n	1	2	3	4	5	Média
T	281	308	295	287	307	296±11
C	431	369	302	294	260	331±61

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

A Figura 28 mostra que a análise estatística do resultado do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* frente ao extrato etéreo obtido pela extração em fase sólida I não foi significativo para o comportamento de oviposição deste mosquito.



**Figura 28:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente SPE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

#### 5.3.4 – Extração por sorção em barras de agitação (SBSE)

Mais uma vez os resultados não foram positivos quando os bioensaios de oviposição foram realizados com os extratos etéreos como estimulantes de oviposição (ver tabela 12). Mesmo que estes extratos etéreos tenham sido obtidos a partir de infusões consideradas estimulantes de oviposição, o número de resultados insatisfatórios obtidos quando trabalhamos com os extratos (obtidos por LLE, SPE e SBSE) nos indica que os extratos não podem ser considerados biologicamente ativos nas concentrações utilizadas nos bioensaios de oviposição.

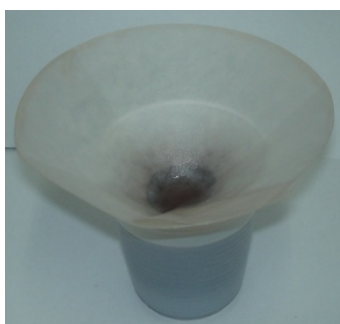
**Tabela 12:** Bioensaio de Oviposição: SBSE-I x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Volume final do extrato: 2,5 mL: 500 µL de extrato para cada bioensaio						
<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>Média</b>
<b>T</b>	5	6	6	0	47	13±17
<b>C</b>	2	9	0	2	15	6±6

**n** = número do bioensaio; **T** = número de ovos na água teste; **C** = número de ovos na água destilada

#### 5.4 – Teste de um Novo Suporte de Oviposição

Todos os bioensaios de oviposição anteriormente citados foram realizados com o tradicional papel de filtro na forma de cone (Figura 29) como suporte de oviposição das fêmeas do mosquito *A. aegypti*. Contudo, a partir de observações experimentais em nosso laboratório, de que a fêmea do mosquito *A. aegypti* também realiza a postura de ovos na superfície da água, principalmente quando esta água contém substâncias dissolvidas que estimulam a oviposição, foi estudado o comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* em relação ao suporte de oviposição colocado na superfície da água.



**Figura 29:** Suporte de oviposição na forma cone

Recentemente, GOMES *et al.* (2006) em estudo da determinação do padrão gonotrópico de fêmeas de *A. aegypti* em condições de laboratório e em campo analisou diferentes substratos de oviposição (suporte de oviposição) para testes de laboratório (papel sulfite, filtro, manteiga e toalha). O papel de filtro recebeu significativamente maior deposição de ovos. Assim, foi mantido o uso do papel de filtro para preparar os suportes de oviposição. Este foi cortado na forma de círculo, com diâmetro de 4,8 cm, e deixado sob cortiça ou isopor de espessura entre dois e cinco mm, também na forma de círculo, podendo ser mantido na superfície da água (Figura 30). A eficácia do novo suporte de oviposição foi primeiramente observada em laboratório através de experimentos de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*.



**Figura 30:** Suporte de oviposição flutuante

#### 5.4.1 – Suporte Flutuante versus Suporte Cone em IBC a 10%

Foi então realizada uma série de bioensaios de oviposição utilizando a infusão de babosa concentrada (IBC) a 10% v/v no copo teste e no copo controle. No copo teste foi colocado o suporte flutuante (T) e no copo controle o suporte cone (C).

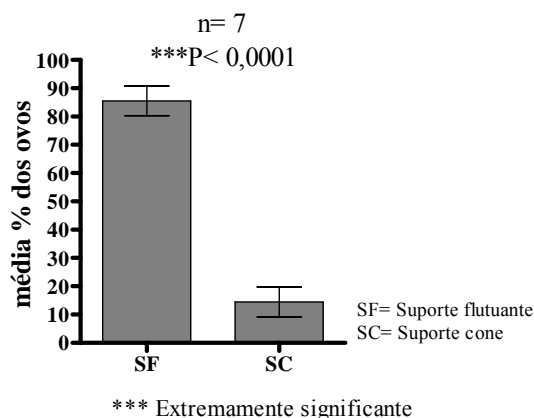
**Tabela 13:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Cone (C)

IBC a 10% no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (suporte cone)								
n	1	2	3	4	5	6	7	Média
T	493	492	104	268	533	596	640	447±178
C	10	0	76	27	98	107	132	64±48

n = número do bioensaio; T = número de ovos no suporte flutuante; C = número de ovos no suporte cone

Como mostrou a Tabela 13, houve uma grande preferência da fêmea do mosquito *A. aegypti* pela realização da postura de ovos no suporte flutuante em relação ao suporte cone, quando ambos os suportes de oviposição estavam na presença da IBC a 10%. Estes primeiros resultados obtidos com o suporte flutuante já demonstraram que a fêmea do mosquito *A. aegypti* tem preferência pela realização da postura de ovos no suporte flutuante em relação ao suporte cone.

A análise estatística mostrou a grande seletividade em favor do suporte flutuante, superior a 80% (figura 31) para a IBC a 10%.



**Figura 31:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) versus suporte cone (SC) em IBC à 10%

#### 5.4.2 – Suporte Flutuante (SF) versus Suporte Cone (SC) em água destilada

Uma vez que a água destilada é desprovida de substâncias orgânicas dissolvidas que podem ser consideradas como atraente de oviposição, a eficácia do suporte de oviposição flutuante foi analisada também em água destilada. Os resultados dos bioensaios de oviposição estão descritos na Tabela 14.

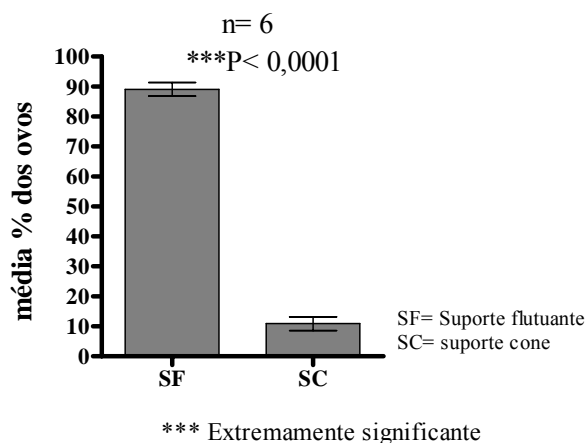
**Tabela 14:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Cone (C)  
 Água destilada no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (suporte cone)

n	1	2	3	4	5	6	Média
T	171	338	710	562	795	406	497±215
C	22	2	140	84	86	68	67±42

n = número do bioensaio; T = número de ovos no suporte flutuante; C = número de ovos no suporte cone

Em todos os bioensaios realizados houve grande preferência da fêmea do mosquito *A. aegypti* pela realização da postura de ovos no suporte flutuante em relação ao suporte cone. Provavelmente isto ocorreu devido ao suporte flutuante permanecer mais hidratado do que o suporte cone.

A análise estatística mostrou a grande seletividade em favor do suporte flutuante, superior a 80% (figura 32) para água destilada que é desprovida de qualquer substância, mostrando ser atraente e/ou estimulante de oviposição para o mosquito *A. aegypti*.



**Figura 32:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) versus suporte cone (SC) em água destilada



### 5.4.3 – Suporte Flutuante (T) versus Suporte Cone (C) em água de feno (IF)

Mais uma série de bioensaios de oviposição foram realizados. Desta vez, a infusão de feno a 10% foi utilizada para testar a eficácia dos suportes cone e flutuante. A Tabela 15 mostra os resultados dos bioensaios de oviposição.

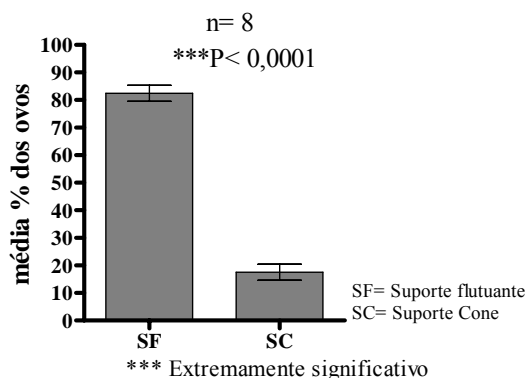
**Tabela 15:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Cone (C)

Infusão de feno a 10% no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (suporte cone)									
<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>Média</b>
<b>T</b>	482	606	705	466	489	629	723	598	587± 93
<b>C</b>	106	140	137	245	25	94	162	119	129±55

**n** = número do bioensaio; **T** = número de ovos no suporte flutuante; **C** = número de ovos no suporte cone

Uma vez que todos os resultados obtidos nos bioensaios de oviposição realizados para comparar a preferência de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* pelo o suporte de oviposição flutuante em relação ao suporte de oviposição na forma de cone foram favoráveis ao suporte flutuante, pode-se dizer que a fêmea do mosquito *A. aegypti* em condições de laboratório prefere realizar a oviposição no suporte flutuante ao invés de realizar a oviposição no suporte cone.

A análise estatística mostrou a grande seletividade em favor do suporte flutuante, superior a 80% (figura 33) para a IF a 10%. Isto indica que, apesar do suporte cone ser mais comumente utilizado, o suporte flutuante pode ser indicado para a realização dos testes de oviposição em laboratório.



**Figura 33:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) versus suporte cone (SC) em IF à 10%

#### 5.4.4 – Suporte Flutuante (T) versus Copo sem Suporte (C) em IBC à 10%

Para continuarmos nosso estudo de análise do melhor suporte de oviposição para a fêmea do mosquito *A. aegypti*. Prosseguimos nossos bioensaios de oviposição. Desta vez foi analisada a eficácia do suporte flutuante *versus* o copo sem suporte. No caso da oviposição no copo sem suporte a fêmea do mosquito deveria optar entre realizar a postura nas paredes do copo acima da superfície da água, ou na superfície da água. Assim, a IBC a 10% foi utilizada para iniciarmos os testes de oviposição. Os resultados estão colocados na Tabela 16.

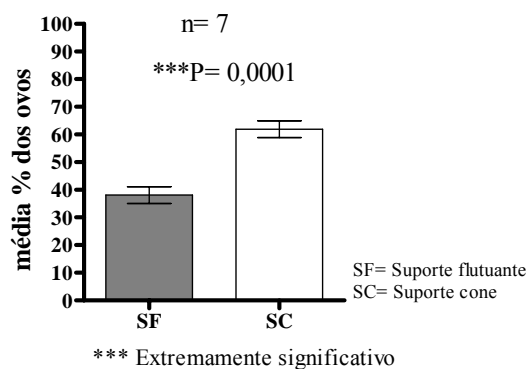
**Tabela 16:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Copo sem Suporte (C) IBC a 10% no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (copo sem suporte)

n	1	2	3	4	5	6	7	Média
T	627	482	357	599	283	842	454	521±173
C	677	652	466	906	873	1370	1045	856±257

n = número do bioensaio; T = número de ovos no suporte flutuante; C = número de ovos no copo sem suporte

Como pode ser visto na Tabela 16, no um bioensaio de oviposição realizados com IBC a 10% como atraente de oviposição, houve predominância do número de ovos no copo controle. Este grande número de ovos depositados diretamente sob a superfície da água pode ser atribuído à grande atratividade da infusão de *Aloe vera*.

Análise estatística dos resultados do bioensaio de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* (figura 34) com o suporte flutuante *versus* copo sem suporte. Pode-se observar que em relação à infusão babosa concentrada houve uma atração de oviposição menor do que 40%, indicando que quando o mosquito tem o contato direto com esta infusão, tem maior estímulo para realizar a postura de seus ovos.



**Figura 34:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* copo sem suporte (SS) em IBC a 10%

#### 5.4.5 – Suporte Flutuante (T) versus Copo sem Suporte (C) em H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

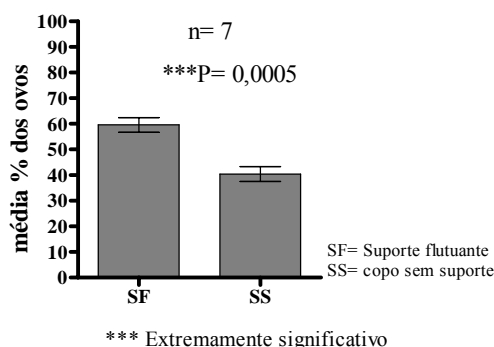
A eficácia do suporte flutuante *versus* o copo sem suporte também foi analisada em água destilada. Os resultados dos bioensaios de oviposição estão na Tabela 17.

**Tabela 17:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Copo sem Suporte (C)  
H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (copo sem suporte)

n	1	2	3	4	5	6	7	Média
T	159	569	304	453	189	207	424	329±144
C	175	309	194	437	104	97	280	228±106

n = número do bioensaio; T = número de ovos no suporte flutuante; C = número de ovos no copo sem suporte

Análise estatística dos resultados do bioensaio de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* (figura 35) com o suporte flutuante *versus* copo sem suporte. O comportamento de oviposição para a água destilada teve um atração maior que 60%, o que indica que esse suporte tem potencial com um estimulante de oviposição.



**Figura 35:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* copo sem suporte (SS) em água destilada

#### 5.4.6 – Suporte Flutuante (SF) versus Copo sem Suporte (SS) em infusão de Feno (IF)

A infusão de feno a 10% v/v também foi utilizada para testar a eficácia do suporte flutuante em relação ao copo sem suporte. A Tabela 18 mostra os resultados dos bioensaios de oviposição.

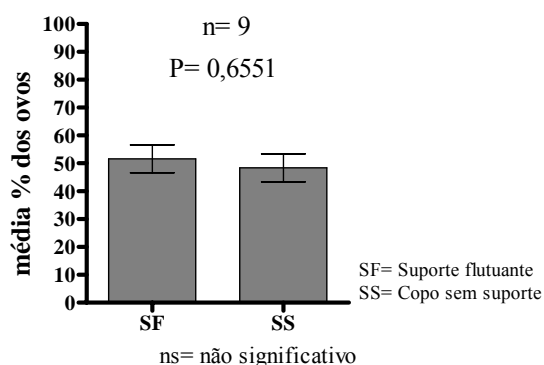
**Tabela 18:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Copo sem Suporte (C)  
 Infusão de feno a 10% no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (copo sem suporte)

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média
T	298	228	266	489	405	174	296	407	498	340±108
C	198	305	213	307	200	411	662	473	205	330±142

n = número do bioensaio; T = número de ovos no suporte flutuante; C = número de ovos no copo sem suporte

Os resultados acima são contraditórios. Nos bioensaios de números 1, 3, 4, 5 e 9 houve um maior número de ovos no copo teste, enquanto nos bioensaios de números 2, 6, 7 e 8 houve um maior número de ovos no copo controle. Uma vez que a infusão de feno (IF) também é considerada como estimulante de oviposição, a fêmea do mosquito *A. aegypti* reconhece que a IF tem elementos nutrientes para o desenvolvimento da larva, e assim tem preferência em realizar a postura de seus ovos diretamente sob a superfície da água.

Análise estatística dos resultados do bioensaio de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti* (figura 36) com o suporte flutuante *versus* copo sem suporte. Quando foi utilizada a infusão do feno (IF), não houve uma diferença significativa entre a oviposição no suporte flutuante e no copo sem suporte.



**Figura 36:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) *versus* copo sem suporte (SS) em IF a 10%

#### 5.4.7 – Suporte Flutuante (T) versus suporte trapézio (C) em IBC

Para nos certificarmos mais uma vez, de que a fêmea do mosquito *A. aegypti* prefere realizar a oviposição em papel de filtro na superfície da água, foram realizados sete bioensaios simultâneos. Foram utilizados como suportes de oviposição, o suporte de oviposição flutuante e o suporte de oviposição colocado em torno do copo, denominado suporte trapézio (Figura 37).



**Figura 37:** Suporte de oviposição trapézio

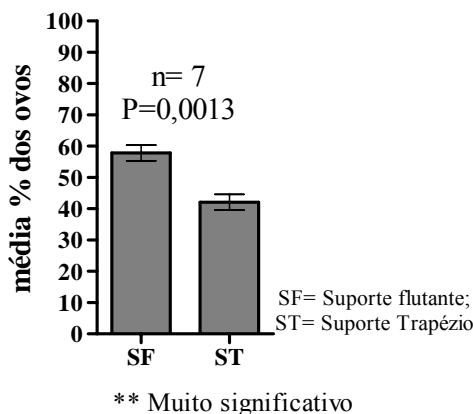
A infusão de babosa concentrada foi utilizada como atraente de oviposição em ambos os copos teste e controle. Os resultados dos bioensaios de oviposição estão descritos na Tabela 19. O suporte de oviposição flutuante recebeu um maior número de ovos em todas as sete repetições realizadas. Apesar do suporte de oviposição colocado em torno do copo (trapézio) também se manter hidratado durante todo o período de oviposição, a preferência da fêmea do mosquito *A. aegypti* é pelo suporte de oviposição flutuante.

**Tabela 19:** Bioensaio de Oviposição: Suporte Flutuante (T) x Suporte Trapézio (C) IBC no copo teste (suporte flutuante) e no copo controle (Suporte trapézio)

<b>n</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>Média</b>
<b>T</b>	282	327	227	392	203	244	294	281±60
<b>C</b>	261	206	209	190	159	167	283	211±40

**n** = número do bioensaio; **T** = número de ovos no suporte flutuante; **C** = número de ovos suporte trapézio

O gráfico abaixo (Figura 38) mostra o resultado da análise estatística indicando a preferência pelo suporte flutuante em relação ao suporte trapézio.



**Figura 38:** Gráfico da análise estatística: suporte flutuante (SF) versus suporte trapézio (ST) em IBC a 10%

## 5.5 – Bioensaios de Oviposição com Extratos Etéreos de IBC Utilizando o Suporte Flutuante

Um dos objetivos deste trabalho consiste no isolamento das substâncias orgânicas dissolvidas nas amostras aquosas que foram consideradas biologicamente ativas nos bioensaios de oviposição. Uma vez isolados os constituintes ativos, seja por LLE, SPE ou SBSE, estes extratos devem ser também analisados em relação ao seu potencial atraente/estimulante de oviposição. Uma série de bioensaios realizados com extratos etéreos já foi discutida anteriormente, contudo os resultados não foram satisfatórios. Assim, uma nova série de bioensaios de oviposição foi realizada utilizando o suporte flutuante como suporte de oviposição. Os extratos etéreos foram preparados, adicionados no papel de filtro, evaporados e depois utilizados nos testes de oviposição. O mesmo volume de éter etílico utilizado no suporte teste foi também adicionado no suporte controle.

### 5.5.1 – Extração líquido-líquido III (LLE-III)

A partir da extração líquido-líquido realizada com 100 mL de IBC, foi obtido 2,0 mL de extrato etéreo. Assim, foi realizado um bioensaio de oviposição utilizando em cada bioensaio 500 µL de extrato etéreo colocado no copo teste. O suporte flutuante foi utilizado no copo controle e no copo teste. Os resultados estão descritos na Tabela 20.

**Tabela 20:** Bioensaio de Oviposição: LLE-III x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

---

100 mL de IBC: volume total: 2,0 mL: 500 µL de extrato para cada bioensaio (suporte flutuante)

---

n	1	2	3	4	Média
T	456	443	652	227	445±150
C	409	623	601	393	507±95

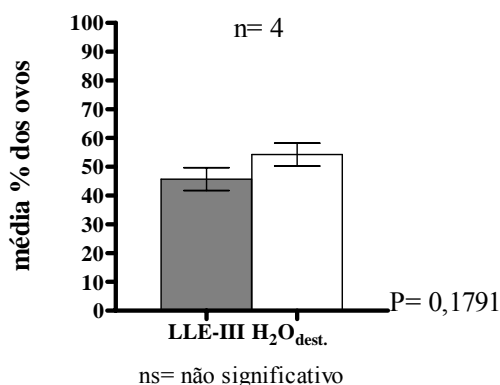
---

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

Apesar do número de ovos depositados nos copos testes e controles terem sido próximos, o número de ovos depositados foi bastante elevado. Estes resultados vêm confirmar mais uma vez a eficácia do suporte flutuante. No entanto, uma vez que não houve grande diferença de número de ovos depositados no copo teste em relação ao copo controle, ou seja, os resultados não foram seletivos, conforme mostrou a Tabela 20, isto indica que a extração líquido-líquido não foi eficiente no isolamento dos constituintes biologicamente

ativos de IBC, ou que as concentrações utilizadas nos bioensaios de oviposição acima não foram as concentrações necessárias para induzir um efeito estimulante do comportamento de oviposição.

A Figura 39 mostra que o extrato LLE-III não pode ser considerado atraente/estimulante de oviposição do mosquito *A. aegypti* atrativo na concentração utilizada de 5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ .



**Figura 39:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente à LLE-III x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 5.5.2 – Extração líquido-líquido IV (LLE-IV)

O procedimento de extração líquido-líquido com a infusão de *Aloe vera* (IBC) foi repetido mais uma vez, uma vez que a LLE é uma técnica eficiente na remoção dos componentes orgânicos. O volume de IBC foi o mesmo do procedimento para a obtenção do extrato LLE-III, no entanto o volume de extrato utilizado nos bioensaios de oviposição foi diferente. O volume total de extrato obtido foi de 1,7 mL, e para cada bioensaio foi utilizado 150  $\mu\text{L}$ . O suporte flutuante foi utilizado no copo controle e no copo teste. Os resultados estão descritos na Tabela 21.

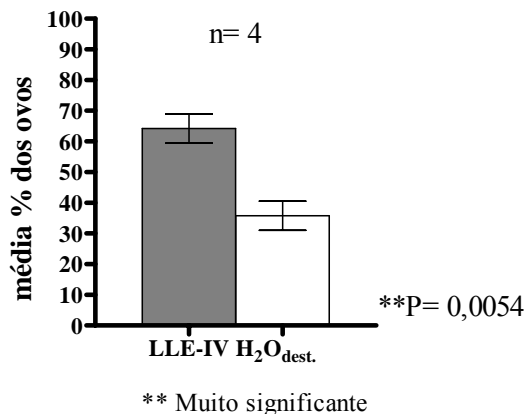
**Tabela 21:** Bioensaio de Oviposição: LLE-IV x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

100 mL de IBC: volume total: 1,7 mL: 150  $\mu\text{L}$  de extrato para cada bioensaio (suporte flutuante)

n	1	2	3	4	Média
T	195	260	410	101	242±113
C	65	223	282	46	154±90

n = número do bioensaio; T = número de ovos na água teste; C = número de ovos na água destilada

O gráfico abaixo (Figura 40) mostra que o extrato LLE-IV utilizado na concentração de  $1,5 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$  foi estimulante do comportamento de oviposição para a fêmea do mosquito *A. aegypti*.



**Figura 40:** Gráfico das análises estatísticas do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti* frente à LLE-IV x H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

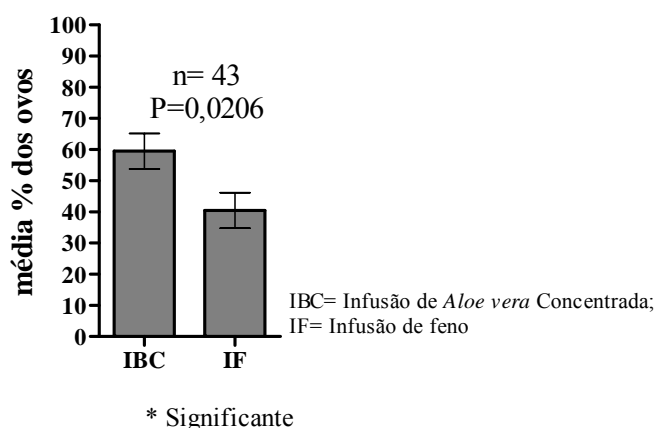
## 5.6 – Testes de Oviposição Realizados em Campo

O padrão de oviposição do *A. aegypti* foi também estudado no campo. Para isto foram escolhidos dois bairros do município de Maceió-AL, considerados com alto índice de infestação pelo mosquito *A. aegypti*: bairro de Jatiúca e bairro do Jacintinho. Uma vez que substratos escuros têm sido considerados os mais estimulantes de oviposição (GOMES *et al.*, 2006), as ovitrampas (armadilhas de oviposição) foram preparadas a partir de recipientes plásticos de cor preta. Cada instalação de armadilha teste e controle foram considerados como 01 experimento de oviposição. A armadilha teste recebeu IBC a 10% v/v, e a armadilha controle receberam IF a 10% v/v. As armadilhas foram instaladas no período da manhã e foram recolhidas no período da tarde cinco dias após a instalação. Foram realizados no total de 80 repetições. A utilização de ovitrampas em campo é bastante indicada por ser sensível é indicada para detectar baixas populações do vetor. Os números de ovos depositados nas palhetas foram quantificados, mas não foram descritos aqui, pois seria bastante exaustivo. A análise estatística mostra que o tratamento dos dados foi realizado com um valor de  $n = 43$ . Apesar de terem sido instalados 80 experimentos, somente em 43 experimentos o resultado foi positivo, com a presença de ovos do mosquito, seja no teste ou no controle.

Figura 41 mostra a preferência média da infusão de *Aloe vera* em relação à infusão de feno (IF), comprovando assim a eficiência da infusão de babosa com uma atraente e/ou



estimulante de oviposição. Esses resultados estão de acordo com os resultados dos bioensaios realizados em laboratório, no qual foi feito um bioensaio com seis repetições para a comparação de efeito atraente/estimulante entre IBC e IF (Figura 41). No entanto, uma vez que o nosso interesse maior é o isolamento e a identificação das substâncias biologicamente ativas contidas nesta infusão, o trabalho prossegue-se com a infusão de *Aloe vera*.



**Figura 41:** Gráfico da análise estatística do comportamento de oviposição do mosquito *A. aegypti*: IBC x IF no campo

### 5.7 – Identificação dos Compostos Orgânicos Presentes na Infusão de *Aloe vera*

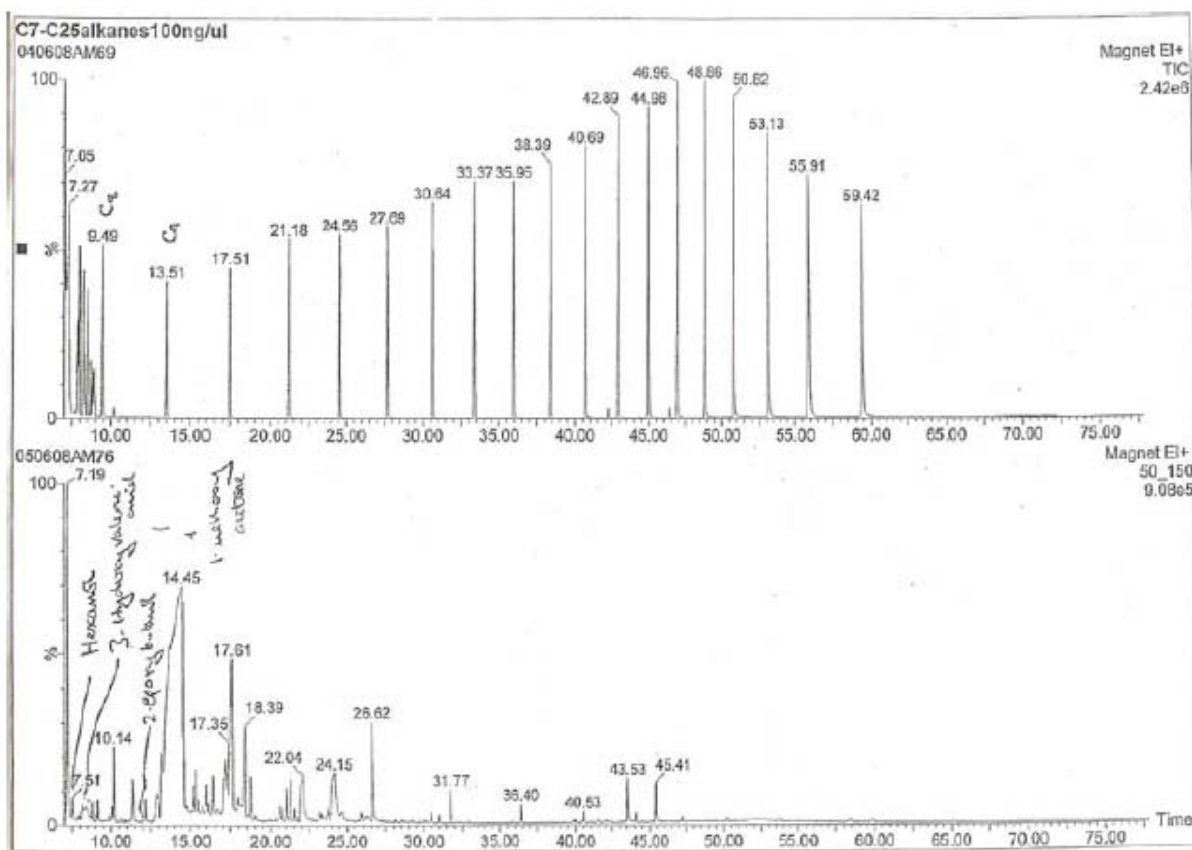
Um dos objetivos desse trabalho é a identificação das substâncias orgânicas dissolvidas nas águas consideradas atraentes e/ou estimulantes de oviposição para fêmeas acasaladas do mosquito *A. aegypti*. Assim, a partir da infusão de *Aloe vera* foram preparadas as amostras etéreas utilizando as técnicas de extração de matrizes aquosas: LLE, SBSE e SPE. Estas amostras foram primeiramente analisadas segundo seu potencial estimulante de oviposição e então foram separadas através do uso da cromatografia gasosa. Os seguintes extratos foram separados: SBSE-I, LLE-I e SPE-I. Os respectivos cromatogramas estão descritos no Anexo 1.

Alguns trabalhos também têm sido descritos na literatura, onde se estuda a atração de fêmeas acasaladas do mosquito *A. aegypti* em relação às águas contaminadas com matéria orgânica. No entanto, os resultados destes trabalhos tem sido contraditórios, onde muitas vezes os pesquisadores publicam respostas insignificantes de oviposição de fêmeas acasaladas de mosquitos frente as águas estudadas (ALLAN & KLINE, 1995; CHADEE *et al.*, 1993).

No entanto, mais recentemente SANT'ANA *et al.* (2006) estudando a eficiência da infusão de capim colônia (*Panicum maximum*) (Jacq.) como atraente e/ou estimulante de

oviposição para fêmeas acasaladas do mosquito *A. aegypti*, observaram que as infusões com período de 15 a 20 dias coletaram significativamente maior número de ovos quando comparadas com o controle. A partir desta mesma infusão, foi isolado e identificado o nonanal, composto biologicamente ativo, o qual tem sido utilizado associado com um polímero em armadilha para mosquitos adultos denominada MosquiTRAP<sup>®</sup> (FAVARO *et al.*, 2006; ROQUE, 2007).

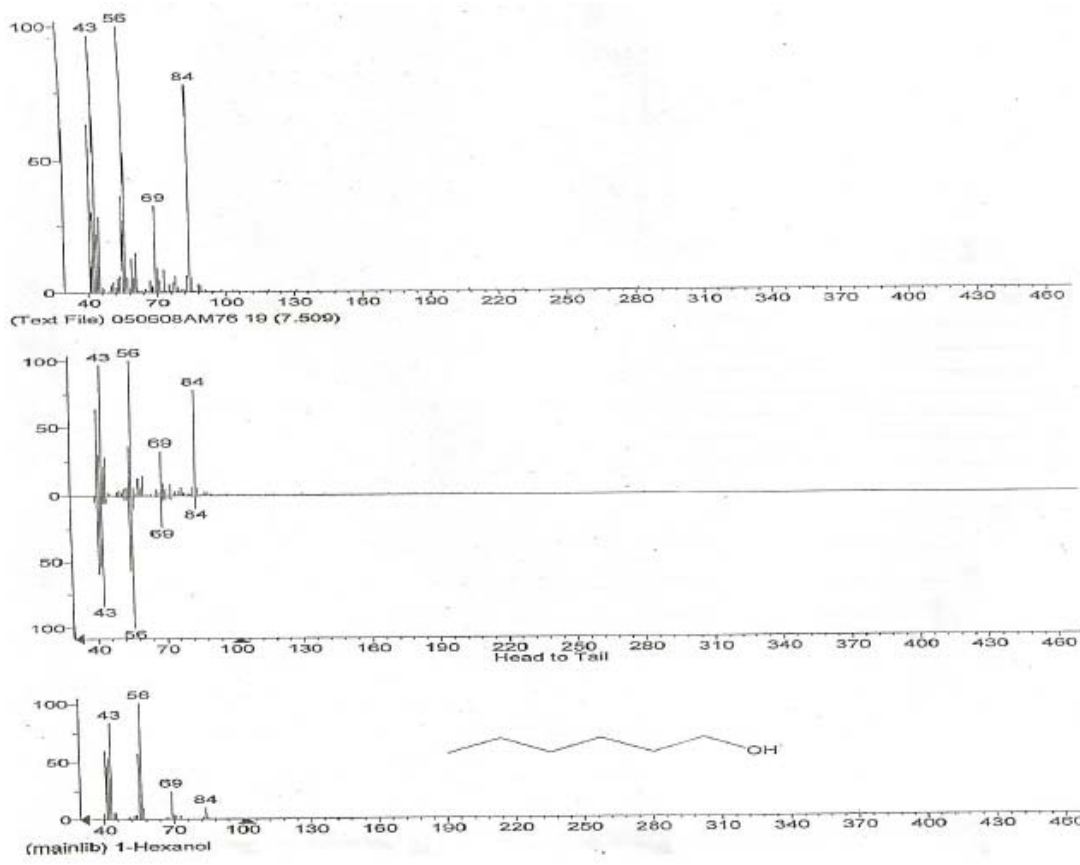
Dando continuidade ao trabalho de identificação dos constituintes biologicamente ativos presentes na infusão de *Aloe vera*, foi possível identificar algumas substâncias presentes no extrato LLE-III, através da utilização de equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (CG-MS). As seguintes substâncias foram identificadas: 1-hexanol, ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico e 2-epoxibutanol. Os espectros de cromatografia gasosa do extrato LLE-III, juntamente com a série homóloga dos alcanos (C<sub>7</sub> a C<sub>25</sub>) estão descritos na Figura 42.



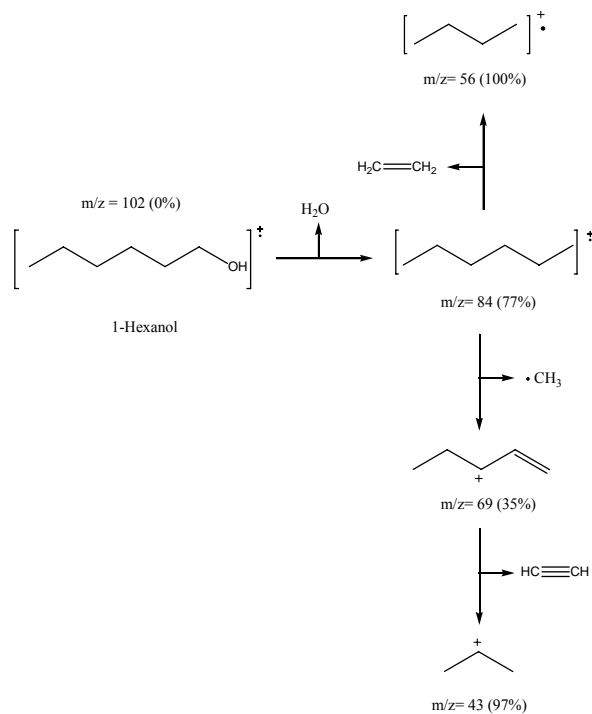
**Figura 42:** Cromatogramas da série homóloga dos alcanos e extrato LLE-III

Os espectros de massa das substâncias isoladas e identificadas em LLE-III, juntamente com suas respectivas fragmentações estão descritos nas figuras 43, 44 e 45. Ainda não se pode afirmar que estes compostos são biologicamente ativos em relação ao comportamento de

oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*, pois os estudos eletrofisiológicos (Anexos 2, 3 e 4) ainda estão em desenvolvimento.

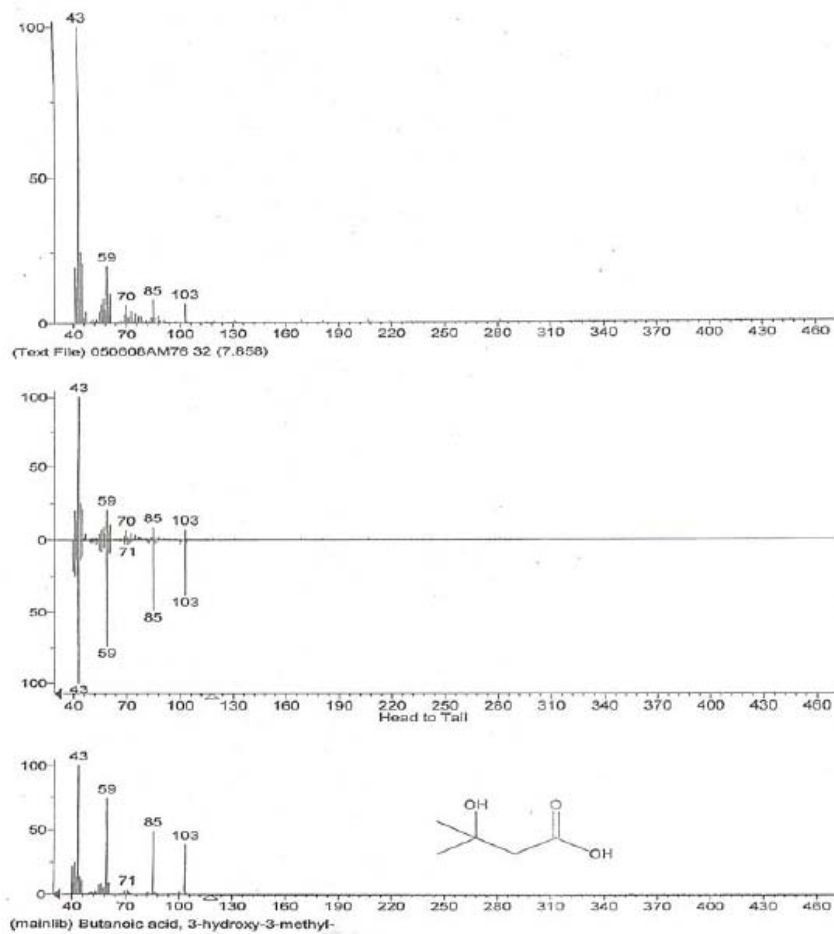


### Espectro de massa do 1-hexanol

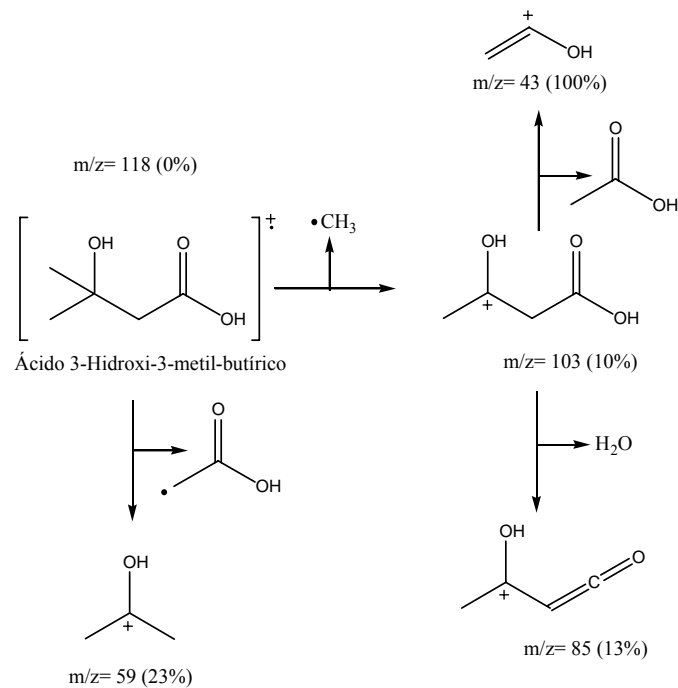


### Fragmentação da estrutura do 1-hexanol

Figura 43: Espectro de massa e fragmentação do 1-hexanol

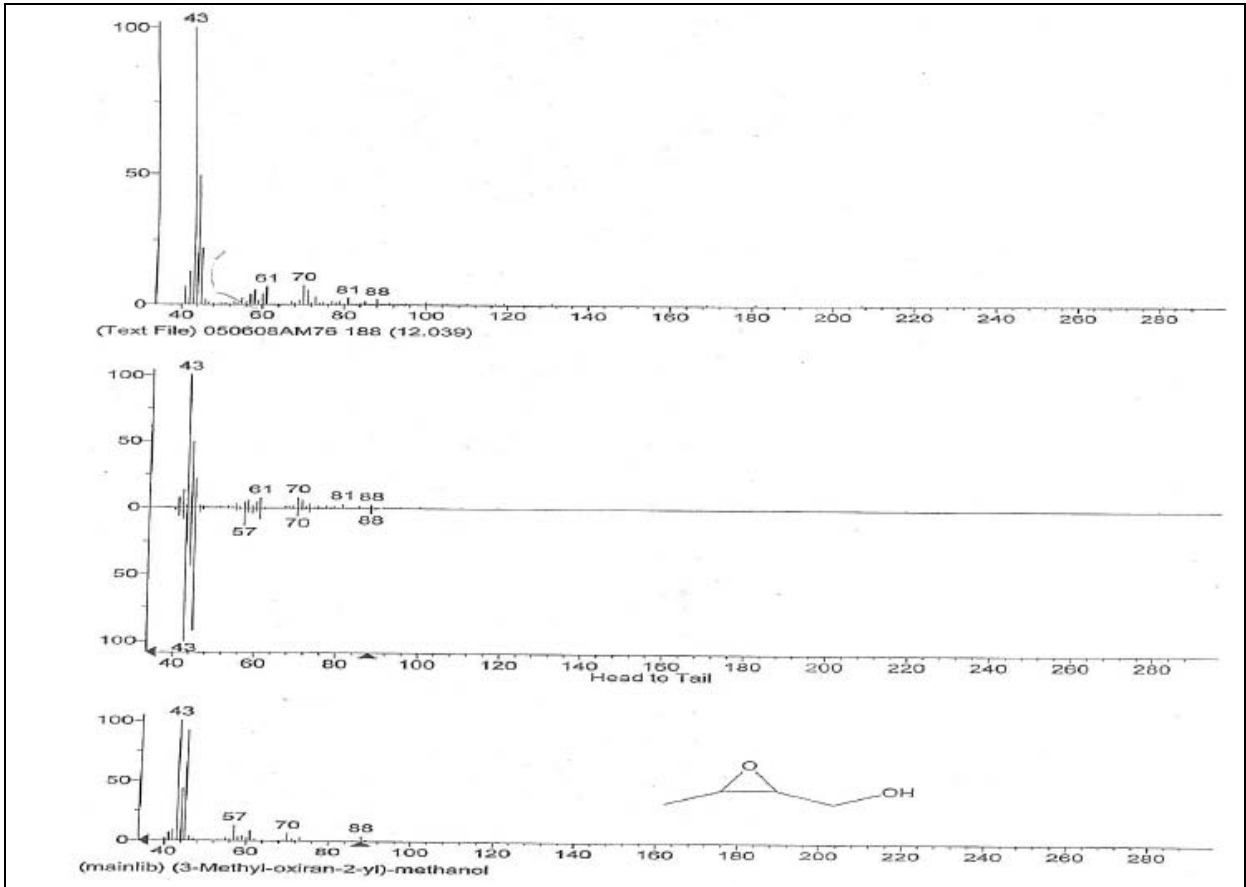


### Espectro de massa do ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico

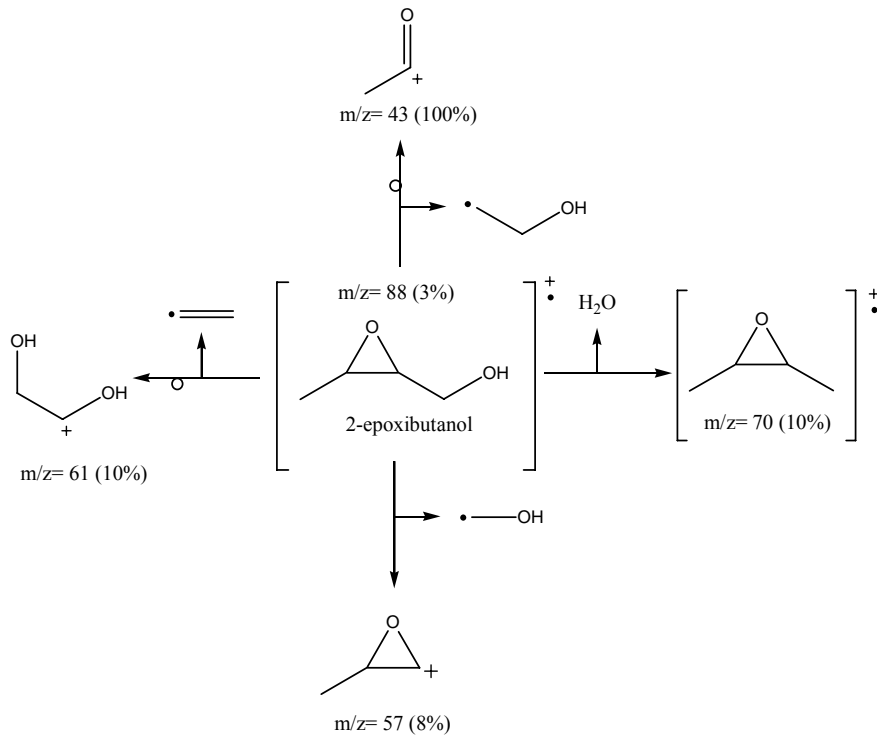


### Fragmentação da estrutura do ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico

Figura 44: Espectro de massa e fragmentação do ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico



**Espectro de massa do 2-epoxibutanol**



**Fragmentação da estrutura do 2-epoxibutanol**

**Figura 45: Espectro de massa e fragmentação do 2-epoxibutanol**

## 6 – CONCLUSÕES

- Foram realizados bioensaios de oviposição com a fêmea do mosquito *A. aegypti* na presença de diferentes águas para avaliar o potencial estimulante e/ou atraente de oviposição destas águas. Dentre todas as matrizes aquosas estudadas, a infusão de *Aloe vera* foi considerada a mais estimulante do comportamento de oviposição.
- A infusão de *Aloe vera* foi testada em campo, utilizando como comparação a tradicional infusão de feno utilizada normalmente nos programas de monitoramento e controle da dengue. A infusão de *Aloe vera* recebeu significativamente maior número de ovos do que a infusão de feno.
- Foi demonstrado que águas provenientes de criadouros do mosquito *C. quinquefasciatus* têm efeito repelente de oviposição para o mosquito *A. aegypti*.
- Foi desenvolvido um novo suporte de oviposição denominado suporte flutuante. O novo suporte, ideal para a realização de bioensaios em laboratório recebeu maior número de ovos que o suporte convencional na forma de cone, em todas as águas dos testes experimentais.
- Foram utilizados diferentes métodos de preparação de amostras a partir da infusão de *Aloe vera*: extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração por sorção em barras de agitação. Os diferentes extratos obtidos puderam ser separados através da técnica da cromatografia gasosa e detectados com o detector de ionização de chama.
- O extrato obtido através do uso da extração líquido-líquido foi considerado o mais estimulante do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*. O extrato LLE-III foi analisado através da técnica de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massa de alta resolução. Três substâncias orgânicas puderam ser identificadas: 1-hexanol, ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico e 2-epoxibutanol.

## 7 – PERSPECTIVAS

O trabalho de identificação de substâncias biologicamente ativas presentes na infusão de *Aloe vera* ainda está sendo desenvolvido. O uso da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa de alta resolução (GC-MS), assim como da cromatografia gasosa acoplada ao eletroanténógrafo poderá propor algumas estruturas com potencial de atividade biológica estimulante do comportamento de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*.

As substâncias isoladas e identificadas durante o trabalho (1-hexanol, ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico e 2-epoxibutanol) deverão ainda ser analisadas por eletrofisiologia, e depois analisadas em bioensaios de oviposição em laboratório e finalmente em campo.

Uma vez que a infusão de *Aloe vera* foi biologicamente ativa em relação ao comportamento estimulante de oviposição da fêmea do mosquito *A. aegypti*, esta infusão também deverá ser testada para o mosquito *A. albopictus*, vetor secundário do vírus do dengue.

A partir deste trabalho, um artigo deverá ser preparado e submetido ao Journal of Chemical Ecology.



## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALDRIDCE, W.N. Insecticides, past, present and future: practice and understanding of mechanisms. **The Annals of Occupational Hygiene**, v.22, p.407-409, 1979.
- ALLAN, S.A.; KLINE, D.L. Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albipictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.21, n.11, p.1847-1860, 1995.
- ARTHUR, C.L.; BELARDI, R.; PRATT, K.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. Environmental Analysis of Organic Compounds in Water Using Solid Phase Microextraction. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.15, p.741-744, 1992.
- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v.435, n.62, p.2145-2148, 1990.
- ATKINS, P.; JONES L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Trad. Ricardo Bicca de Alencastro, 3.ed. Porto Alegre, Bookman, 2006, 968p.
- BACH, D.B.; LOPES, M.A. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*Aloe vera* L.). **Ciências Agrotécnicas**, v.31, n.4, p.1136-1144, 2007.
- BALTUSSEN, E.; CRAMERS, C.A.; SANDRA, P.J.F. Sorptive sample preparation – a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.373, p.3-22, 2002.
- BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H.; CRAMERS, C. Study into the equilibrium mechanism between water and poly(dimethylsiloxane) for very apolar solutes: Adsorption or sorption?. **Analytical Chemistry**, v.71, p.5213-5216, 1999.
- BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p.151-162, 2007.
- BEEHLER, J.W.; MILLAR, J.G.; MULLA, M.S. Field evaluation of synthetic compounds mediating oviposition in *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal Chemical Ecology**, v.20, p.281-291, 1994.
- BENTLEY, M.D.; DAY, J.F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review Entomology**, v.34, p.401-421, 1989.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.2, p.113-118, 2007.
- BROWN, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.2, n.2, p.123-140, 1986.

CAMPILLO, N.; PEÑALVER, R.; AGUINAGA, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. **Analytica Chimica Acta**, v.562, p.9-15, 2006.

CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, R.J.S.; REGAZZI, A.C.F.; PAULA JÚNIOR, F.J.; FRUTUOSO, R.L.; SOUSA, E.P.; DANTAS FILHO, F.F.D.; LIMA, J.W.O. Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. **Revista de Saúde Pública**, v.4, p.638-644, 2007.

CHADEE, D.D.; LAKHAN, L.; RAMDATH, W.R.; PERSAD, R.C. Oviposition response of *Aedes aegypti* mosquitoes to different concentrations of hay infusion in Trinidad, west indies. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.9, n.3, p.346-348, 1993.

CHIA, K.J., HUANG SD. Analysis of organochlorine pesticides in wine by solvent bar micro-extraction coupled with gas chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, p.118–124, 2006.

CLEMENTS, A.N. **The biology of mosquitoes. Sensory reception and behavior**, 2.ed. New York, CABI Publishing, 2000, 740p.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 1994, 225p.

CREA, P. **Aloe Sabila manual práctico y clínico: terapias e medicinas alternativas**. Continente, Bueno Aires, 1995, 128p.

DAVID, F.; SANDRA, P. Stir Bar Sorptive Extraction for Trace Analysis, **Journal of Chromatography A**, v.1152, p.54-69, 2007.

DAVID, F.; TIENPONT, B.; SANDRA, P. Sample preparation perspectives Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. **LC/GC Europe Solutions for Separation Scientists**, p.1-6, 2003.

DONALÍSIO, M. R., GLASSER, C. M., Vigilância Entomológica e Controle de Vetores da Dengue, **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.5, n.3, p.259-272, 2002.

EIRAS, A.E. & MAFRA-NETO, A. **Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos**. In: E.F. VILELA & LÚCIA. Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Editora Holos, 2001, 206p.

EIRAS, A.E. & SANT'ANA, A.L. **Atraentes de oviposição para mosquitos**. Depósito de patente no Brasil: PI0106701-0. Data 20/12/2001.

- EIRAS, A.E. Culicidae. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11.ed., Rio de Janeiro, Atheneu, 2005, 494p.
- ETTRE, L.S. Chromatography: the Separation Technique of the 20th Century. **Chromatographia**, v.51, n.1/2, p.7-18, 2000.
- FAVARO, E.A.; DIBO, M.R.; MONDINI, A.; FERREIRA, A.C.; BARBOSA, A.A.C.; EIRAS, A.E.; BARATA, E.A.M.F.; CHIARAVOLLOTTI-NETO, F. Physiological state of *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs<sup>®</sup> in Mirrasol, São Paulo, Brazil. **Journal of Vector Ecology**, v.31, p.285-291, 2006.
- FAY, R.W.; ELIASON, D.A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**, v.26, p.531-535, 1966.
- FIOCRUZ, A dengue. Reunião, análise e difusão de informação sobre Saúde, **Súmula**, n.87, p.1-16, 2002.
- FRANÇA, S. **Aspectos clínicos do dengue**. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em <http://www.fiocruz.br>, acessado em 2 de abril de 2008.
- FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue, Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas**. 3.ed. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, 2001, 84p.
- GOMES, A.S.; SCIAVICO, C.J.S.; EIRAS, A.E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.4, p.327-332, 2006.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, Trad. de José Alberto Portela Bonapace e Oswaldo Esteves Barcia. 6.ed. Rio de Janeiro, LTC, 2005, 876p.
- HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. 1.ed. New York, McGraw-Hill, 2000, 798p.
- HERNANDEZ-BORGES, J.; GARCIA-MONTELONGO, F.J.; CIFUENTES, A.; RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. Analysis of triazolopyrimidine herbicides in soils using field-enhanced sample injection-coelectroosmotic capillary electrophoresis combined with solid-phase extraction. **Journal Chromatography A**, v.1100, p.236–242, 2005.
- IST. **Catalogue of Sample Preparation Products and Services**. Mid Glamorgan, IST-International Sorbent Technology Ltd, 2001, 130p.
- JUAN-GARCIA, A.; PICO, Y.; FONT, G. Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stirbar sorptive extraction. **Journal Chromatography A**, v.1073 p.229–236. 2005.

KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry **Journal Chromatography B**, v.805, p.41–48, 2004.

KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.500-508, 2006.

KLIN, D.L. Introduction to symposium on attractants for mosquito surveillance and control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.10, n.2, p.253-257, 1994.

LAMBERT, J.P.; MULLETT, W.M.; KWONG, E.; LUBDA, D. **Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. Journal Chromatography A**, v.1075, p.43–49, 2005.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos, RiMa, 2004, 96p.

LAURENCE, B.R.; PICKETT, J.A. Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone, **Journal of the Chemical Society, Chemical Communication**, v.1, p.59-60, 1982.

LIMA, E.P.; OLIVEIRA-FILHO, A.M.; LIMA, J.W.O.; RAMOS JÚNIOR, A.N.; CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, R.J.S. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.259-263, 2006.

LIMA, J.B.P.; SILVA JÚNIOR, R.C.; GALARDO, A.K.P.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.A. Resistence of *Aedes aegypti* to Organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brasil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.3, p.329-333, 2003.

LOUNIBOS, L.P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**, v.47, p.233-266, 2002.

LUNA, J.D. MARTINS, M.F. ANJOS, A.F. KUWABARA, E.F. NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.6, p.842-843, 2004.

LYANIWURA, T.T. Non-target and environmental hazards of pesticides. **Reviews on Environmental Health**, v.9, n.3, p.161-176, 1991.

**Manual da vigilância epidemiológica de febre amarela**, Brasília, Ministério da Saúde, 1999, 58p.

- MBOERA, L.E.G. **Chemical ecology of the behaviour of the filariasis mosquito *Cx. quinquefasciatus* Say**. Holanda, 1999. 189p. Tese (Doutorado) - Laboratory of Entomology, Wageningen Agricultural University.
- McCALL, P.J.; CAMERON, M.M. Oviposition pheromone in insect vectors. **Parasitology Today**, v.11, n.9, p.352-355, 1995.
- MILLAR, J.G.; CHANEY, J.D.; BEEHLER, J.W.; MULLA, M.S. Interactions of the *Culex quinquefasciatus* egg raft pheromone with natural chemical associated with oviposition sites. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.10, n.3, p.374-379, 1994.
- MILLAR, J.G.; CHANEY, J.D.; MULLA, M.S. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented Bermuda grass infusion. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.8, n.1, p.11-17, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <http://www.saude.gov.br>, acessado em 23 de março de 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Saúde, Brasília. Disponível em <http://www.saude.gov.br>, acessado em 05/07/2008.
- MOTULSKY, H. **Statistics Guide. Statistical analyses for laboratory and clinical researchers**. GraphPad PRISM Version 4.0, 2003, 148p.
- NAKAMURA, S; DAISHIMA, S. Simultaneous determination of 64 pesticides in river water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.382, p.99–107, 2005.
- NASCIMENTO, Gicélia Santos. **Estudo de Atraentes de Oviposição para o Controle Populacional do Principal Vetor da Dengue: O Mosquito *Aedes aegypti***. Maceió, 2006. 45p. Monografia (Bacharelado) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.
- NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006, **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.22, n.5, p.1986-2006, 2007.
- NOPPE, H.; BIZEC, B.L.; VERHEYDEN, K.; BRABANDER, H.F. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. **Analytica Chimica ACTA**, v.611, p.1-16, 2008.
- NORDLAND, R.T. **In the role of semiochemicals in insect pest control**. Academic Press. New York. 1981, 306p.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em <http://www.who.int>, acessado em 13 de maio de 2008.

PACHECO, E.D. Comunicação pessoal.

PANUWET, P.; NGUYEN, J.V.; KUKLENYIK, P.; UDUNKA, S.O.; NEEDHAM, L.L.; BARR, D.B. Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.391, p.1931-1939, 2008.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p.117-131, 2007.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v.6, n.6, p.813-816, 2003.

POLSON, K.A.; CURTIS, C.; SENG, C.M.; OLSON, J.G.; CHANTHA, N.; RAWLINS, S. The use of ovitraps baited with hay infusion as a surveillance tool for *Aedes aegypti* mosquitoes in Cambodia. **Dengue Bulletin**, v.26, p.174-178, 2002.

PONTES, R.J.S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil, **Revista de Saúde Pública**, v.3, n.28, p.218-227, 1994.

POZO, O.J; GUERRERO, C.; SANCHO, J.V.; IBÁÑEZ, M.; PITARCH, E.; HOGENDOORN, E.; HERNÁNDEZ, F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1103, p.83-93, 2006.

PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALÇÃO, R.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.11-16, 2004.

REITER, P.; AMADOR, M.A.; COLON, N.; Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.7, n.1, p.52-55, 1991.

REYNOL, F. Vacina da dengue a partir de dezembro. **Combate à dengue**. Disponível em <http://www.combateadengue.com.br>, acessado em 15 de agosto de 2008.

RIGAU-PÉREZ, J.G.; CLARK, G.G.; GUBLER, D.J.; REITER, P.; SANDERS, E.J.; VORDAN, A.V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v.352, p.971-977, 1998.

ROQUE, R.A. **Avaliação de atraentes de oviposição, identificados em infusões de capim colômbio (*Panicum maximum*) para fêmeas de *Aedes aegypti* (L. 1762) (Diptera: Culicidae) em condições de campo e semicampo.** Brasil, 2007. 98p. Tese (Doutorado) – Laboratório de Culicídeos, Universidade Federal de Minas Gerais.

SANDRA, P.; BALTUSSEN, E.; DAVID, F.; HOFFMANN, A. Stir bar Sorptive Extraction (SBSE) applied to Environmental aqueous samples. **Global Analytical Solutions Gerstel**, v.2, p.1-6, 2000

SANFONI PASTEUR. **Sanofi Pasteur presents positive results of tetravalent dengue candidate vaccine**, Lyon, 2007, Disponível em <http://www.sanofipasteur.com.br>, acessado em 28 de maio de 2008.

SANT'ANA, A.L.; ROQUE, R.A.; EIRAS, A.E. Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes* (*Stegomyia*) (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.43, n.2, p.214-220, 2006.

SANT'ANA, A. L. **Avaliação, Extração, Identificação e Estudos Eletrofisiológicos dos Voláteis Presentes em Infusões de *Panicum maximum* que Estimulam e/ou Atraem Fêmeas de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) para Oviposição.** Brasil, 2003. 103p. Tese (Doutorado) - Laboratório de Culicídeos, Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTOS, S.P. A química dos inseticidas (parte I). **Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa**, p.43-47, 1999.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Organic Chemistry**, 9.ed, New York, John Wiley, 2007, 1191p.

STAJNBAHER, D.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v.1015, p.185–198, 2003.

TAKKEN, W.; KNOLS, B.G. J. Odor-mediated behaviour of afrotropical malaria mosquitoes. **Annual Review Entomology**, v.44, p.131-157, 1999.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, M.L.; BARRETO, F.R. Epidemiologia do dengue em Salvador-Bahia, 1995-1999, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.3, p.269-274, 2001.

THURMAN, E.M.; MILLS, M.S. **Solid-phase Extraction. Principles and Practice.** New York, John Wiley & Sons, 1998, 344p., v.147.

TIENPONT, B.; DAVID, F.; DESMET, K.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.373, p.46-55, 2002.

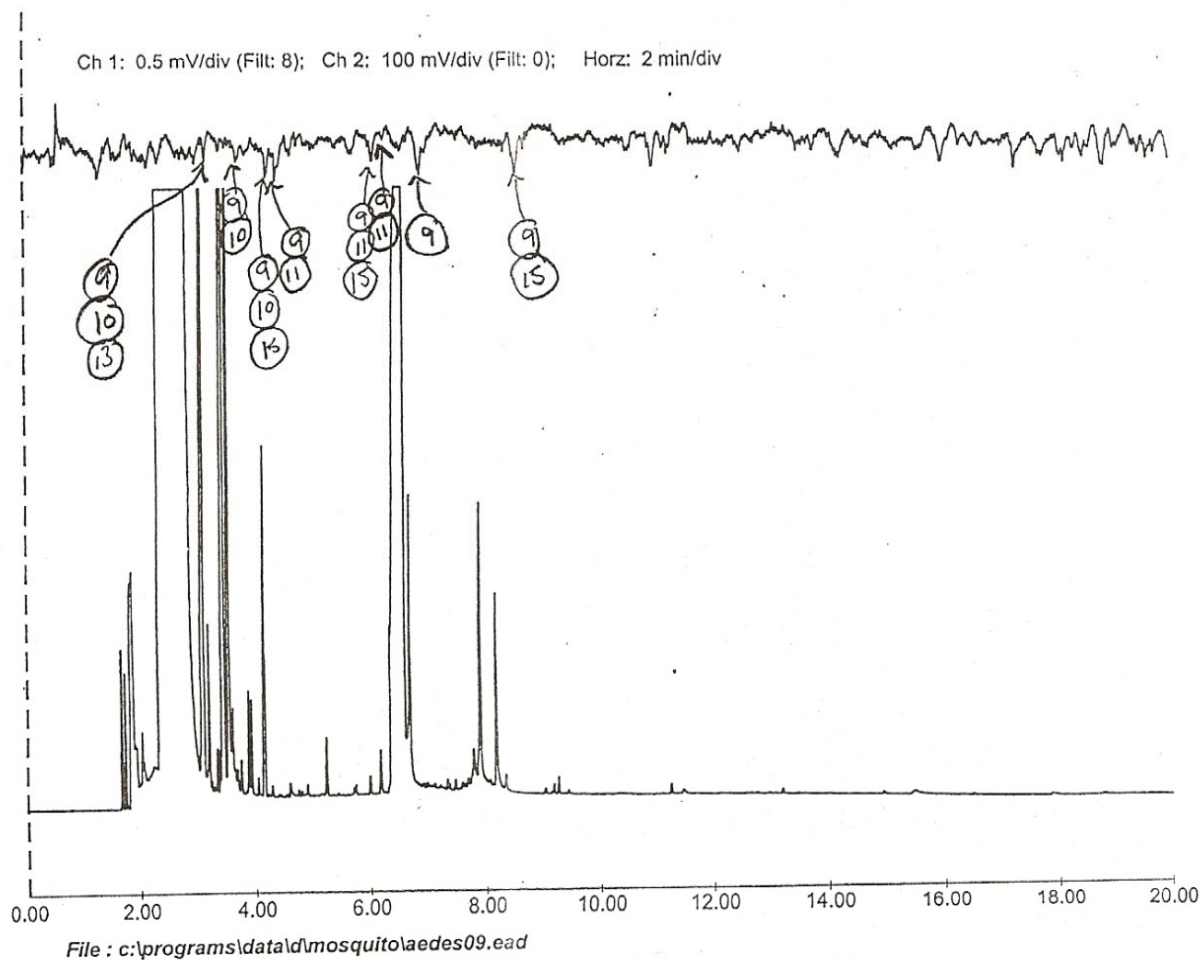
VILELA, E.F; LÚCIA, M.T.D. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Editora Holos, 2001, 206p.

VOGEL, A.I. **Química Orgânica**. Análise Orgânica Qualitativa. Trad. Carlos Alberto Coelho Costa, Oswaldo Faria dos Santos e Carlos Edmundo Metelo Neves, 3.ed. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, 1988, v.1, 458p.



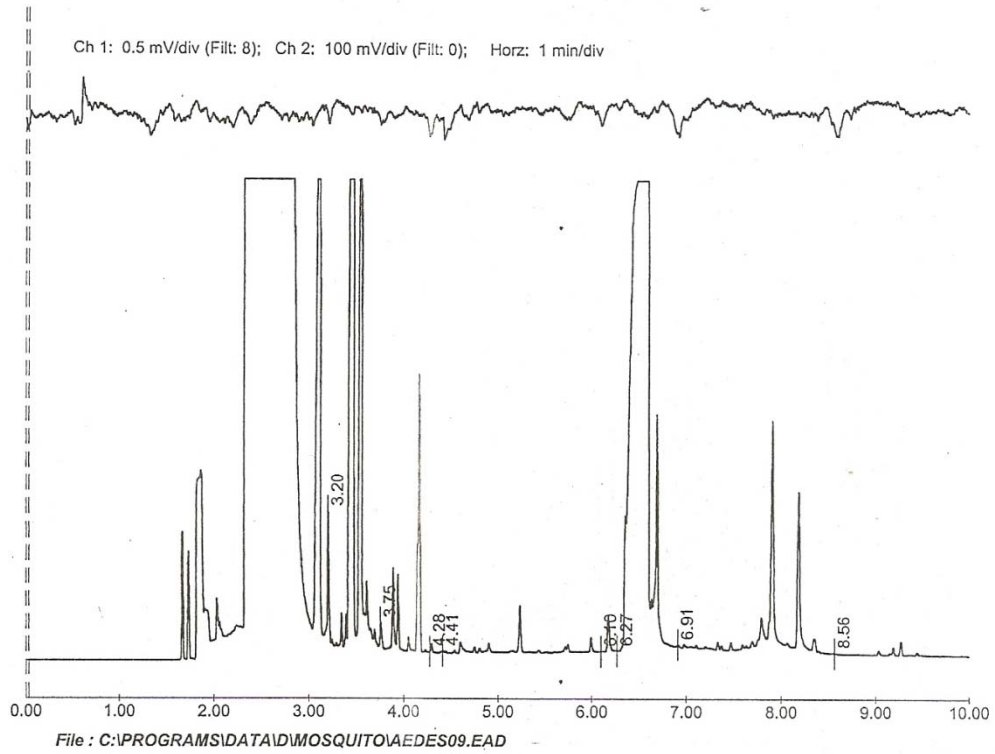


## ANEXO 2



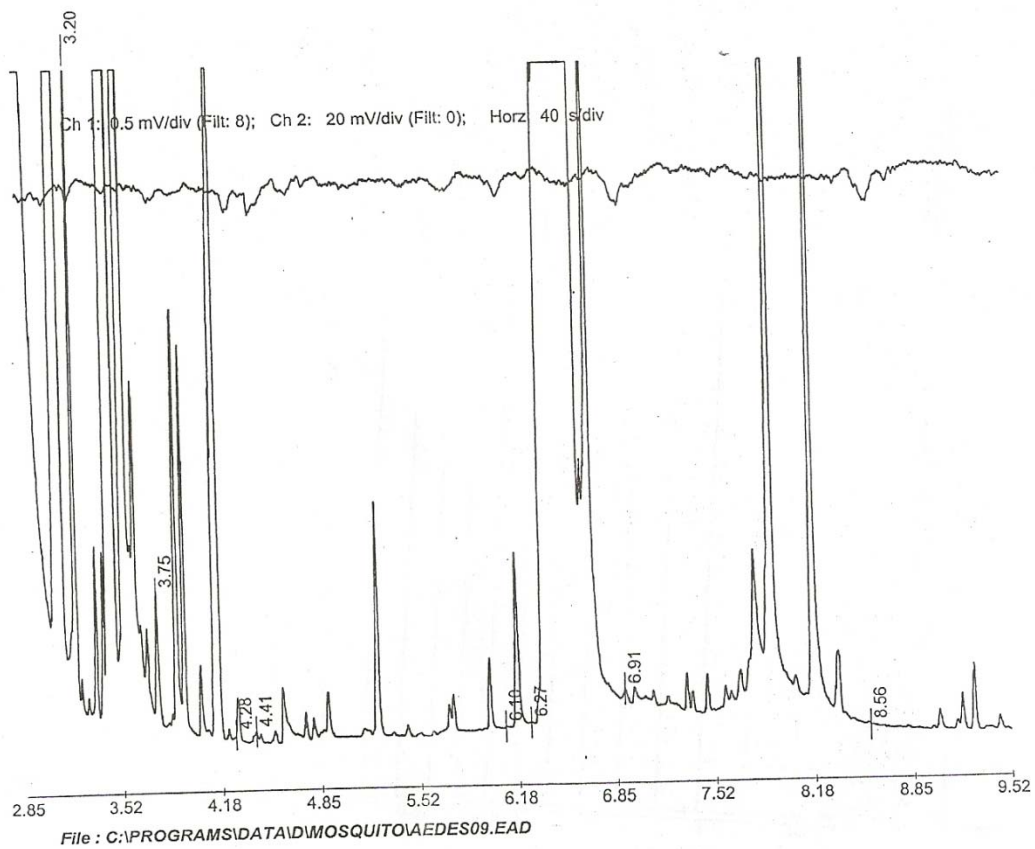
*Aedes aegypti* (I think), gravid female, indifferent inside head capsule,  
tips removed, 01/05/08.  
Run on GC93A, HP-1, vs Aloe veraL-L extract MCCA20/07/07.

### ANEXO 3



*Aedes aegypti* (I think), gravid female, indifferent inside head capsule,  
tips removed, 01/05/08.  
Run on GC93A, HP-1, vs Aloe vera L-L extract MCCA 20/07/07.

# ANEXO 4



*Aedes aegypti* (I think), gravid female, indifferent inside head capsule,  
tips removed, 01/05/08.  
Run on GC93A, HP-1, vs Aloe vera L-L extract MCCA 20/07/07.