

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL

SILAS DA SILVA SANTOS

**Isolamento e Identificação de Semioquímicos do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus,
1762)**

MACEIÓ - ALAGOAS

2018

SILAS DA SILVA SANTOS

**Isolamento e Identificação de Semioquímicos do Mosquito *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química e Biotecnologia
(IQB) da Universidade Federal de Alagoas
(UFAL), como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Química
Tecnológica e Industrial.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Cristina Caño
de Andrade

MACEIÓ - ALAGOAS

2018



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 24/10/2018

2. Aluno / matrícula: Silas da Silva Santos

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:

Maria Cristina Lobo de Andrade - IQB

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

<u>Maria Cristina Lobo de Andrade</u>	(Presidente)	Nota: <u>10,0</u>
<u>Dimas José da Paz Lima</u>	(1º avaliador)	Nota: <u>10,0</u>
<u>Henrique Fonseca Goulart</u>	(2º avaliador)	Nota: <u>10,0</u>
	(3º avaliador)	Nota: _____

5. Título do Trabalho: Isolamento e Identificação de Semicquímicos do Mosquito Aedes aegypti (Linnaeus, 1762)

6. Local: Sala de Reuniões do IQB

7. Apresentação: Horário início: 9:03 hs Horário final: 9:23 hs
Arguição: Horário início: 9:25 hs Horário final: 10:06 hs

8. Nota final: 10,0 (dez inteiros)

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 20 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 41 minutos, tendo como resultado:

☒ APROVADO

☐ APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

☐ NÃO APROVADO.



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)
Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.
www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 24 de outubro de 2018

Presidente:

1º Avaliador:

2º Avaliador:

3º Avaliador:

Candidato:

Dimas José da Paz Lima
Lilas da Silva Santos

Nota:	(3º avaliador)
Nota:	(2º avaliador)
Nota:	(1º avaliador)
Nota:	(Presidente)

Assinatura do Candidato: Lilas da Silva Santos

Assinatura do Presidente: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 1º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 2º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 3º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do Presidente: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 1º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 2º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 3º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do Presidente: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 1º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 2º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 3º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do Presidente: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 1º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 2º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do 3º Avaliador: Dimas José da Paz Lima

Assinatura do Presidente: Dimas José da Paz Lima

Folha de aprovação

SILAS DA SILVA SANTOS

Isolamento e Identificação de Semioquímicos do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) /
Trabalho de conclusão de curso em Química Tecnológica e Industrial, da Universidade
Federal de Alagoas

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química e
Biotecnologia (IQB) da Universidade
Federal de Alagoas (UFAL), como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Química Tecnológica e
Industrial e aprovado em 24/10/18.



Prof.ª Dra. Maria Cristina Caño de Andrade, UFAL (Orientadora)

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima, UFAL (Membro)



Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart, UFAL (Membro)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Francisca, que sempre me educaram e guiaram mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e ainda, por conceder saúde e a força para concluir esse trabalho.

A nossa Senhora, pela intercessão e proteção.

A meus pais, Antonio e Francisca por tudo que me proporcionaram, além de todo apoio e esforço que sempre ofertaram até hoje. Meu eterno agradecimento e amor!

Aos meus irmãos Franciane e Lucas, pelo companheirismo e ensinamentos ao longo de tantos anos. Amo vocês!

A minha orientadora Prof.^a Dra. Maria Cristina Caño de Andrade pelo acolhimento e parceria durante os anos de graduação, além, da oportunidade ofertada para ser seu bolsista.

Aos professores Henrique e Eusébio Goulart por toda a ajuda, ensinamentos e ainda, pela disponibilidade dos equipamentos.

A minha namorada Talia, por todo incentivo e carinho que me traz, sempre. Te amo!

Aos amigos que a UFAL me propiciou. Jaelson, mais que um amigo, um irmão que a vida me concedeu; Igor, pelas horas em que dava dicas, macetes e pelas melhores discussões futebolísticas; A Ledja pelo apoio nos cromatogramas; A Guimarães pela ajuda no trabalho e suas resenhas sobre tudo.

A toda minha família, em especial, ao meu Primo Wesley pela prestatividade.

Aos meus prezados amigos, Emmanuel Teixeira, Kevin, Maxwillien, Eric, Éverton, Douglas e Rafael pelos anos de amizade.

A todo pessoal do LINQA, em especial, a Wood, Alisson, Amanda e Fátima pela parceria de longa data.

Ao pessoal do LaSIF, pela recepção e apoio durante toda estadia no laboratório.

À Nilda, pela paciência e convívio durante tantos anos.

Aos professores, Josué, Daniela, Dimas e PC pela ajuda ao longo do curso.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente ao longo da produção desse trabalho ou da minha graduação. Muito obrigado!

RESUMO

O número de casos de doenças transmitidas pelo *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) tem aumentado nos últimos anos, tornando-se um problema de saúde mundial. As epidemias mais recentes de febre amarela, zika vírus e chikungunya, além da dengue e de outras doenças, transmitidas pelo vetor, evidenciam a necessidade do combate mais eficiente ao mosquito. A proliferação dos mosquitos dos criadouros aquáticos nos centros urbanos, aliados à resistência adquirida a inseticidas como os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides fazem com que a população de mosquitos cresça de maneira vertiginosa. São empregados alguns métodos para o controle dos mosquitos hematófagos vetores de doenças tropicais, sendo os principais: o mecânico, o biológico e o químico, no entanto, eficácia desses métodos têm diminuído ao longo dos anos. A existência de substâncias voláteis nas águas presentes nos criadouros funciona como atraente de oviposição para as fêmeas grávidas do mosquito, e estas águas vêm sendo estudadas pelo LASIF (laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios) com intuito de identificar moléculas com potencial atraente de oviposição. Este trabalho tem como objetivo o estudo comportamental da oviposição das fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*, em relação às substâncias isoladas e identificadas a partir das águas de criadouros artificiais e estudadas em diferentes concentrações (1, 10 e 100 mg/L), através da realização de bioensaios de campo e de laboratório com os compostos contidos nessas águas para verificar a atração das fêmeas para oviposição; após a análise os dados obtidos foram estudados, estatisticamente, através do teste t de student, obtendo respostas significativas ($p < 0,05$) e muito significativas ($p < 0,01$) para oviposição, indicando como resultado que os compostos isolados e identificados são atraentes para fêmeas grávidas.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; fêmeas grávidas; oviposição; feromônios.

ABSTRACT

The number of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) cases (Diptera: Culicidae) has increased in recent years and became a worldwide health problem. The latest epidemic of yellow fever, zika virus and chikungunya, as well as dengue and other diseases transmitted by this vector show the need for more efficient mosquito control. The proliferation of aquatic breeding sites in urban centers, together with resistance to insecticides such as organochlorines, organophosphates, carbamates and pyrethroids, causes the increase in the mosquito population. Several approaches have been used to control the mosquito, being the main ones the mechanical, biological and chemical methods in which the effectiveness of these methods has weakened over the years. Volatile substances in the water of breeding sites works as attractive substances for oviposition of mosquito pregnant females and these waters have been studied by LASIF (Laboratory of Synthesis and Isolation of Pheromones) in order to identify molecules with attractive oviposition potential. This work aims to study the behavior of oviposition of female *Ae. aegypti* mosquito in relation to substances isolated and identified from the waters of artificial breeding sites in different concentrations (1, 10 and 100 mg/L) through field and laboratory bioassays with the compounds from these waters to verify the attraction of females to oviposition; using the obtained data, statistical analysis through the student t test with significant ($p < 0.05$) and very significant ($p < 0.01$) data for oviposition, indicating that the isolated and identified compounds are attractive to pregnant females.

Keywords: *Aedes aegypti*; pregnant females; oviposition; pheromones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da presença do vírus	5
Figura 2 - Sintomas das principais doenças transmitidas pelo vetor.....	6
Figura 3 - Ciclos epidemiológicos da febre amarela no Brasil	7
Figura 4 - Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	8
Figura 5 - Fêmea do <i>Ae. aegypti</i> em processo de hematofagia.	9
Figura 6 - Estrutura química do DDT	10
Figura 7 - Estrutura química do malation.....	11
Figura 8 - Estrutura química do carbaril	12
Figura 9 - Estrutura química da cipermetrina.....	12
Figura 10 - Armadilha adultrap	13
Figura 11 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito	15
Figura 12 - Polímero de polidimetilsiloxano (PDMS)	16
Figura 13 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG.	16
Figura 14 - Gaiola utilizada nos bioensaios	18
Figuras 15 e 16 - Procedimento para extração dos analitos.	19
Figura 17 - Teste de campo	21
Figura 18 - Extração direta	23
Figura 19 - Estrutura química do ácido 1,2-benzenodicarboxílico	24
Figura 20 - Análise em headspace.....	24
Figura 21 e 22 - Fragmentação do ácido oleico	25
Figura 23 - Proposta de fragmentação do ácido (9Z)-octadecenóico.....	26
Figura 24 - Rearranjo de McLafferty.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos extraídos por extração direta	23
Tabela 2 - Compostos extraídos por headspace.....	25
Tabela 3 - Teste em laboratório da solução hexanólica 100 mg/L	27
Tabela 4 - Teste em laboratório da solução hexanólica 10 mg/L	28
Tabela 5 - Teste em laboratório da solução hexanólica 1 mg/L	29
Tabela 6 - Teste em campo da solução hexanólica 100 mg/L.....	30
Tabela 7 - Teste em campo da solução hexanólica 10 mg/L.....	30
Tabela 8 - Teste em campo da solução hexanólica 1 mg/L	31

LISTA DE ABREVIações

<i>Ae</i>	<i>Aedes</i>
cm	Centímetros
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Den-1	Vírus do Sorotipo 1
Den-2	Vírus do Sorotipo 2
Den-3	Vírus do Sorotipo 3
Den-4	Vírus do Sorotipo 4
ECDC	Centro Europeu para prevenção e controle de doenças
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
mg/L	Miligramas por Litro
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Ministério da Saúde
PDMS	Polidimetilsiloxano
ppm	Porcentagem por milhão
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em fase sólida
WHO	World Health Organization
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral:	3
2.2 Específicos:.....	3
3 REVISÃO LITERÁRIA	4
3.1 Principais doenças transmitidas pelo vetor <i>Ae. aegypti</i>	4
3.1.1 Dengue.....	4
3.1.2 Zika vírus	5
3.1.3 Chikungunya.....	5
3.1.4 Febre amarela	6
3.2 Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	8
3.3 Controle do vetor	9
3.3.1 Controle químico	9
3.3.2 Uso de inseticidas no controle do <i>Ae. aegypti</i>	10
3.3.2.1 Organoclorados.....	10
3.3.2.2 Organofosforados	10
3.3.2.3 Carbamatos	11
3.3.2.4 Piretróides	12
3.3.2 Controle físico	12
3.3.2.1 Telas e uniformes.....	12
3.3.2.2 Armadilha de oviposição	13
3.3.3 Controle biológico	14
3.4 Atrantes de oviposição.....	14
3.5 Técnicas de preparo de amostras orgânicas.....	15
3.5.1 Extração em fase sólida (SPE).....	15
3.5.2 Microextração em fase sólida (SPME).....	16

4 PARTE EXPERIMENTAL	18
4.1 Formação das colônias de mosquitos	18
4.2 Preparo da água de pupas	19
4.3 Preparação do extrato por SPME – Microextração em fase sólida	19
4.4 Identificação química dos extratos	19
4.5 Bioensaios comportamentais de oviposição	20
4.6 Testes de campo.....	20
4.7 Análise estatística	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Testes em laboratório.....	27
5.2 Testes de campo.....	30
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) são os responsáveis pelas principais arboviroses do mundo, entre elas o vírus da dengue, febre amarela, chikungunya e zika (KRAEMER et al., 2015). O vírus é transmitido através das fêmeas infectadas da espécie *Ae. aegypti* em sua maioria, no entanto, pode também ser contraído através do mosquito *Ae. albopictus* (WHO, 2017). Tanto o mosquito *Ae. aegypti* quanto o mosquito *Ae. albopictus* são espécies bastante adaptáveis, podendo ocorrer em uma grande variedade de ambientes naturais, ou mesmo em recipientes aquáticos artificiais (REY; O'CONNELL, 2014).

O índice crescente da população de mosquitos ocorre devido ao alto número de criadouros aquáticos presentes nas áreas urbanas e rurais e ainda pela capacidade de se desenvolverem em águas com índices de poluição cada vez maiores (BESERRA et al., 2009). Outro fator importante a ser considerado é o aumento na resistência genética desenvolvida pelos mosquitos ao uso de inseticidas (BRAGA; VALLE, 2007).

Os organismos fazem uso de alguma forma de comunicação química, para isso fazem uso de sinais sendo chamados de semioquímicos e ainda podendo ser caracterizados como feromônios, quando a comunicação ocorre entre indivíduos da mesma espécie (PICKETT et al., 2014).

A atração gerada por estímulos oriundos da pele humana é acentuada entre os mosquitos, no entanto, algumas espécies como o *Ae. aegypti* possui maior seletividade com relação ao seu hospedeiro, quando em comparação com outras espécies de mosquito (FERNÁNDEZ-GRANDON et al., 2015). Estímulos como a liberação de compostos voláteis, aliados ao calor e a umidade permitem que as fêmeas do *Ae. aegypti* encontrem seu hospedeiro específico (CABRINI; ANDRADE, 2006).

Outro fator de atração para as mesmas é a presença de CO₂ associados com o ácido láctico. A partir de altas concentrações de CO₂, em associação com baixas concentrações do ácido láctico ocasionam uma resposta de pouso das fêmeas da espécie sobre a fonte de atração (EIRAS; JEPSON, 1991).

Em virtude da preocupação com o meio ambiente, existe a necessidade do uso de atraentes e feromônios como alternativa ecológica para o controle e a vigilância de mosquitos (KLINE, 1994). Desta forma, a água proveniente de criadouros larvais tem sido estudada como potencial atraente para oviposição das fêmeas, pelo fato de liberar substâncias voláteis

no qual foram obtidos resultados positivos quanto à oviposição das fêmeas (BENTLEY; DAY, 1889).

Faz-se necessário então, o estudo de novos atraentes quanto à oviposição do mosquito *Ae. aegypti*, permitindo que ocorra a possibilidade de controle da espécie. O laboratório de Síntese isolamento de Feromônios (LaSIF) faz uso de uma metodologia desenvolvida com relação ao isolamento e identificação de possíveis feromônios e atraentes para a oviposição das fêmeas do mosquito. O presente trabalho tem como objetivo o isolamento e identificação de substâncias com potencial de atração para oviposição de fêmeas em fase de postura do *Ae. aegypti*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Realizar o isolamento, identificação e análise de semioquímicos com potencial de atração para fêmeas grávidas do mosquito *Ae. aegypti* em fase de postura visando a construção de armadilhas de oviposição.

2.2 Específicos:

- Formação e manutenção das colônias do mosquito *Ae. Aegypti*;
- Preparação das matrizes aquosas estimulantes de oviposição;
- Bioensaios de oviposição com fêmeas grávidas do mosquito *Ae. aegypti* utilizando diferentes matrizes aquosas em campo e em laboratório;
- Análise bioestatística do comportamento de oviposição do mosquito *Ae. aegypti* frente as matrizes aquosas;
- Preparação de amostras orgânicas a partir das matrizes aquosas biologicamente ativas através da técnica de SPME (microextração em fase sólida);
- Identificação dos atraentes e/ou estimulantes de oviposição contidos nos extratos biologicamente ativos através da utilização de equipamento de cromatografia gasosa (GC/FID) e de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS);
- Bioensaios comportamentais de oviposição em laboratório com as substâncias (atraentes identificados) nas diferentes concentrações: 1, 10 e 100 mg/L, e análise bioestatística;
- Construção de armadilhas de oviposição para a realização de bioensaios comportamentais de oviposição no campo.

3. REVISÃO LITERÁRIA

3.1 Principais doenças transmitidas pelo vetor *Ae. aegypti*

3.1.1 Dengue

A dengue é uma doença viral que se alastrou rapidamente pelo mundo (BRAGA; VALLE, 2007). Nos últimos 50 anos, a incidência da doença aumentou em cerca de trinta vezes, sendo associado com a expansão geográfica de alguns países (WHO, 2017). Calcula-se que ocorram cerca de 390 milhões de infecções anualmente, onde existe aproximadamente 2,5 bilhões de habitantes nos países onde esta é endêmica (MS, 2017). A dengue configura-se entre as últimas décadas como uma das principais causas de mortalidade e morbidade tanto no Brasil quanto no mundo, atingindo desde zonas tropicais até zonas mais frias ou subtropicais (VIANNA; IGNOTTI, 2013).

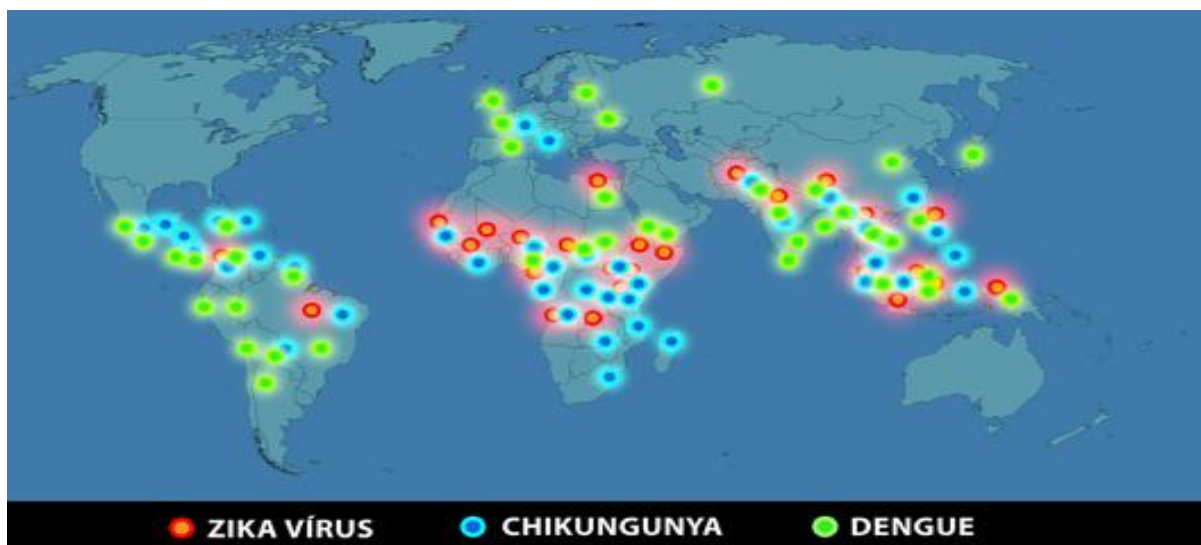
O vírus da dengue é transmitido através da picada do mosquito *Ae. aegypti*, sendo este o vetor dos quatro sorotipos distintos do vírus (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4) (FIOCRUZ, 2002). Os sintomas da dengue podem variar desde uma síndrome viral inespecífica benigna, até um quadro mais grave no qual a doença se manifesta na forma hemorrágica podendo levar à morte. Os fatores que levam às formas mais graves da doença não estão bem claros. Existem teorias que levam em consideração a virulência das cepas do vírus infectante, ou ainda, fatores como a sequência de infecções causadas pelos sorotipos bem como fatores relacionados à saúde do indivíduo (TAUIL, 2002).

O vírus é transmitido pelos mosquitos fêmeas da espécie *Ae. aegypti* em sua maioria. No entanto, pode também ser contraído de forma menos frequente através do *Ae. albopictus*. Recentemente, foi descoberto ainda, que o mosquito *Ae. aegypti* pode transmitir a chikungunya e a infecção por Zika (WHO, 2017). Já foram registrados casos destes vírus em todos os continentes (figura 1).

A doença é considerada uma epidemia letal, e seu combate é caracterizado por um contexto histórico em que ocorreu com a participação de todas as classes da sociedade, com o auxílio de órgãos e instituições de ensino que ajudaram de maneira complementar no processo (MENDONÇA et al., 2009).

A existência de uma vacina (ainda em fase experimental), apresentando resultados promissores no combate à arbovirose, porém, ainda não se encontra disponível para a população. O manejo da doença, de maneira geral, baseia-se na redução do transmissor a partir da eliminação dos criadouros larvais existentes (ARDUINO; ÁVILA, 2015).

Figura 1: Mapa da presença do zika vírus, vírus chikungunya e o vírus da dengue



Fonte: <https://rededengue.fiocruz.br/noticias/31-zika-chikungunya-e-dengue-entenda-as-diferencas>. Acessado em 20/12/17.

3.1.2 Zika vírus

A febre pelo vírus Zika é uma doença pouco conhecida e sua descrição é feita através de um número limitado de relatos de casos e investigações de surtos (OLIVEIRA, 2015). Essa doença causa não só um estado clínico de risco ao organismo infectado, mas também está associada aos recentes casos de microcefalia quando contraída por gestantes (ROMANO, 2017).

Os casos da doença registrados no Brasil foram causados por um arbovírus encontrado na África e Ásia, sendo que sua transmissão ocorre pelos mosquitos do gênero *Aedes*. A ocorrência dos mosquitos em toda América Latina, em conjunto com as condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, ocasionaram uma epidemia do vírus no país (ECDC, 2015).

Os sintomas da doença ocorrem na maioria das vezes de maneira leve, durando de 2 a 7 dias. Este tipo de infecção pode não ser reconhecida ou ser mal diagnosticada como dengue, chikungunya ou outro tipo de infecção viral com sintomas comuns como febre e erupção cutânea (DUFFY et al., 2009). A doença apresenta ainda, alguns aspectos clínicos como: artralgia, mialgia, dor de cabeça, tosse, vômitos entre outros. O tratamento dos casos sintomáticos é baseado no uso de acetaminofeno (paracetamol) indicado para febre e dor. Por sua vez, para as erupções pruriginosas, os anti-histamínicos são aconselhados (OLIVEIRA, 2015).

3.1.3 Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus transmitido pelos mosquitos da família togaviridae, tendo sido isolado pela primeira vez em 1952, na Tanzânia. Este vírus passou por um processo de mutação mais recentemente, aumentando seu grau de infecção passando a ser transmitido tanto pelo *Ae. aegypti* quanto pelo *Ae. albopictus* (CAGLIOTI et al., 2013).

Os sintomas da doença são muito parecidos com aqueles apresentados pela dengue (febre, dores articulares e musculares, cefaléia, náusea, fadiga, dentre outros). O sintoma característico da doença são as fortes dores nas articulações, podendo estar acompanhadas com edemas. A doença pode evoluir de duas maneiras, uma fase aguda ou uma fase crônica. A febre de chikungunya possui caráter epidêmico apresentando altas taxas de morbidade associada no atrofiamento das articulações, reduzindo a mobilidade e qualidade na vida do indivíduo (SVS, 2017).

Figura 2: Sintomas das principais doenças transmitidas pelo vetor

Sintomas	Dengue	Chikungunya	zika
Febre	Sempre presente, alta e de início imediato	Quase sempre presente; alta e de início imediato	Pode estar presente; baixa
Dores nas articulações	Quase sempre presente; dores moderadas	Presente em 90% dos casos; dores intensas	Pode estar presente; dores leves
Manchas vermelhas na pele	Pode estar presente	Pode estar presente	Quase sempre presente
Prurido	Pode estar presente	Presente em 50% dos casos; leve	Pode estar presente; de leve a intenso
Vermelhidão nos olhos	Não está presente	Pode estar presente	Pode estar presente

Fonte: <http://www.diarioonline.com.br/noticias/para/noticia-361175-.html>. Acessado em 20/06/18

3.1.4 Febre amarela

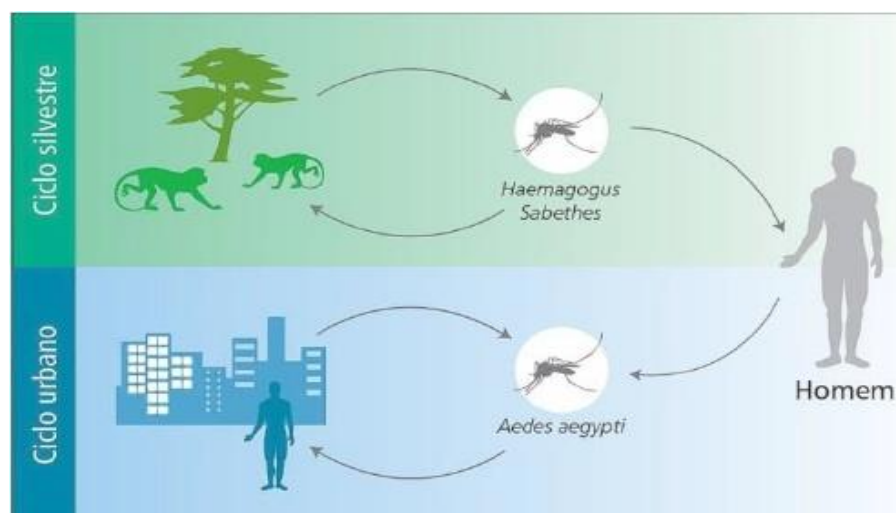
A febre amarela caracteriza-se por ser uma doença não infecciosa, sendo endêmica nas florestas tropicais da América e da África, sendo registrados periodicamente casos da doença. É transmitida ao homem através da picada de mosquitos da família Culicidae, destacando-se os gêneros *Aedes* e *Haemagogus* (MONATH, 2001).

No Brasil, os primeiros casos foram registrados em 1685 ocorridos em Recife. No século XIX, a doença teve seu primeiro surto, onde cerca de 4 mil pessoas morreram em Salvador. Em 1850, através de uma grande campanha realizada pelo governo imperial a

doença foi controlada através de medidas como a desinfecção de navios, isolamento ou quarentena, aterramento de valas e limpeza de esgotos.

O vírus caracteriza-se por apresentar dois ciclos característicos de transmissão (silvestre e urbano). No ciclo urbano, o principal vetor é o *Ae. aegypti*, onde a transmissão ocorre diretamente através da picada do mosquito ao homem. No ciclo silvestre, a febre amarela é uma zoonose, transmitida por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* (*H. janthinomys* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* (*S. chloropterus*), sendo que a principal fonte de infecção da doença são os primatas. Os seres humanos não apresentam imunidade e podem ser infectados, acidentalmente, ao entrarem em zonas enzoóticas (CHEBABO et al., 2017).

Figura 3: Ciclos epidemiológicos da febre amarela no Brasil



Fonte: <http://u.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-febreamarela>.

Acessado em 06/02/18.

A vacinação é medida de controle mais utilizada no combate à doença, é fornecida em dose única e conferindo proteção permanente, sendo distribuída, gratuitamente, na rede pública de saúde. O uso da vacina é indicado a partir dos 9 meses de idade com reforço a cada 10 anos em regiões consideradas endêmicas, bem como, a qualquer pessoa que se desloque a essas regiões (MS, 2018).

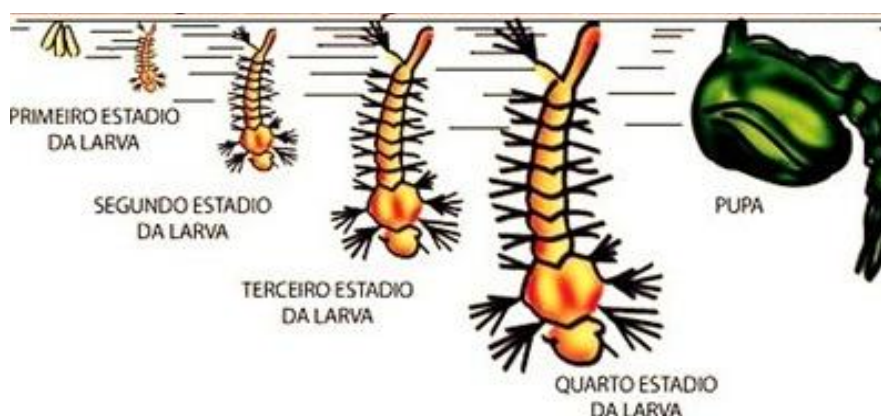
A maioria das pessoas que não passaram pelo processo de imunização ao entrarem em contato com o vírus da doença podem apresentar dois quadros clínicos distintos: assintomático ou o indivíduo desenvolve um quadro de sintomas como dor de cabeça, febre, fadiga muscular, vômito, entre outros; durante um período de até 3 dias. Cerca de 15% das pessoas ao contraírem o vírus desenvolvem a doença na forma mais grave a qual pode levar ao óbito (FAPESPE, 2017).

3.2 Mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é um inseto com características antropofílicas, oriundo do continente africano, o qual espalhou-se pelas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Sua dispersão ocorreu através do transporte em navios negreiros durante o período colonial, sendo levado para todo o mundo inclusive para o Brasil (LOZOVEI, 2001). A ocorrência do mosquito *Ae. aegypti* estende-se desde a Ásia, passando pela África e América do sul. Sendo este o vetor responsável pela transmissão do vírus do gênero *Flavivírus* que é causador de doenças em humanos como a febre amarela e a dengue (ROBERTS, 2002). Sabe-se ainda, que a proliferação deste mosquito está ligada diretamente a presença das chuvas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

O ciclo biológico consiste na fase imatura, caracterizada por ovos, larvas (L₁, L₂, L₃ e L₄) e pupas, a fase adulta (figura 4) (GADELHA; TODA, 1985).

Figura 4: Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*



Fonte: <https://aedesaegyptiblog.files.wordpress.com/2016/04/page.jpg?w=640>.

Acessado em 21/06/18.

Chegando a fase adulta, os mosquitos *Ae. aegypti* podem ser facilmente reconhecidos por apresentarem uma coloração escura. Seu tórax apresenta escamas claras criando ornamentos prateados característicos. Apresentam ainda, faixas longitudinais curvilíneas em ambos os lados do tórax. No abdômen e nas pernas ocorrem manchas branco-prateadas (LOZOVEI, 2001). Alimentam-se de fontes de carboidratos, encontrados em substâncias açucaradas como o néctar das flores e açúcares das frutas, permitindo, então, que possam desenvolver-se e realizar funções para sua sobrevivência, como o voo. Por último, as fêmeas buscam fontes proteicas necessárias para a maturação dos ovos, obtendo através do sangue de vertebrados, nos quais podem ser incluídos os humanos (figura 5) (FORATTINI, 2002).

Figura 5: Fêmea do *Ae. aegypti* em processo de hematofagia.



Fonte: Rothamsted Research

O *Ae. aegypti* apresenta hábitos diurnos e realiza uma estratégia de rastreamento ativo combinado com a permanência em locais frequentados pelos hospedeiros. Sendo então, atraídos por estímulos químicos (EDMAN, 1979).

Os ovos são depositados pelas fêmeas na fase adulta, preferencialmente, na superfície da parede dos criadouros um pouco acima da superfície aquosa. No entanto, ocasionalmente são depositados diretamente na água. O desenvolvimento da fase embrionária dura entre 2 e 3 dias, após isso os ovos tornam-se resistentes à dessecação causada pelo ambiente. Os ovos permanecem férteis por um período de aproximadamente um ano, mesmo secos e sujeitos a contaminação. Através do contato com a água, ocorre o estímulo para a eclosão, iniciando-se então, um novo ciclo (NATAL, 2002).

3.3 Controle do vetor

As medidas aplicadas ao controle de mosquitos podem ser direcionadas às larvas ou para os adultos. No que diz respeito às larvas, abrangem a eliminação ou modificação do criadouro, até a aplicação de larvicidas nestes ambientes. Já para os adultos ocorrem medidas preventivas como o uso de roupas, repelentes, telas protetoras ou mesmo a aplicação de inseticidas (BORROR & DELONG, 1988). Os principais métodos para o controle utilizados no combate ao vetor são: o físico, o biológico e químico. Os inseticidas mais utilizados para este fim são os organofosforados, carbamatos, e os piretroídes (LUNA et al., 2004). Porém, nas últimas décadas os métodos de controle utilizados no combate aos insetos fizeram uso de menores quantidades de inseticidas, tornando a atividade mais racional e diminuindo seu uso de forma indiscriminada (BOS, 1992).

3.3.1 Controle químico

Este método de controle faz uso de produtos químicos para que haja a eliminação de pragas e dos vetores de doenças. É a última forma de controle a ser utilizada, ações menos agressivas devem ser utilizadas de maneira prioritária. O uso de inseticidas produz inúmeras desvantagens, considerando seus efeitos diversos, dentre eles podem ser destacados: contaminação ambiental, destruição genética da fauna, e ainda, a geração de produtos bioacumulativos. Por outro lado, este tipo de controle oferece alguns benefícios como a rapidez e facilidade com que combatem os alvos (SILVA, 2011).

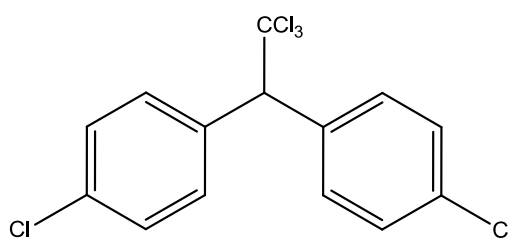
3.3.2 Uso de inseticidas no controle do *Ae. aegypti*

3.3.2.1 Organoclorados

O controle químico é aplicado a todas as fases de desenvolvimento do mosquito. O tratamento do tipo focal tem como característica a aplicação de larvicidas (inseticidas químico, biológicos ou hormonais), nos criadouros (FUNASA, 2001b).

O uso de compostos organoclorados foi a principal forma de controle do *Ae. aegypti* adotado no século passado, no entanto, por permanecer durante longo tempo no meio ambiente não pode ser mais utilizado. Entre os organoclorados o DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano) foi o mais utilizado. O uso desses compostos foi proibido pelo fato de não serem biodegradáveis ficando acumulados nas gorduras dos animais de sangue quente (ALDRID, 1979). Apesar da proibição de seu uso no restante do mundo, o DDT vem sendo empregado no continente africano no combate a malária nos últimos anos (OMS, 2018).

Figura 6: Estrutura química do DDT



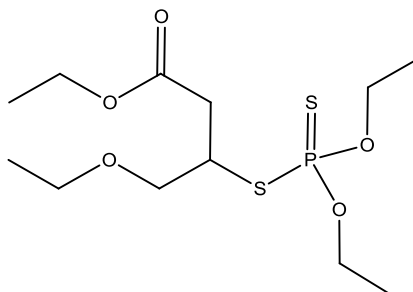
3.3.2.2 Organofosforados

Os inseticidas pertencentes a esta classe são todos aqueles que apresentam o fósforo em sua estrutura. Estes compostos foram descobertos depois dos organoclorados, em virtude da resistência adquirida pelos vetores ao seu uso prolongado (BROGDON, 1998).

São divididos em dois principais grupos quanto à sua estrutura: os alifáticos (malation, vidrin, etc) e os derivados dos grupos fenílicos (paration, fenitrothion, etc). Este tipo de composto apresenta vantagens se comparados aos organoclorados, a principal delas,

consiste em serem biodegradáveis, não sendo armazenados no interior dos tecidos (PALCHICK, 1996).

Figura 7: Estrutura química do malation

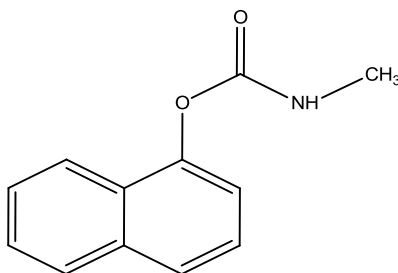


Outro organofosforado amplamente utilizado no combate ao *Ae. aegypti* é o temefós (O,O,O,O-tetrametil-O,O-tiodi-p-fenileno-bis fosforotiato), esse composto começou a ser utilizado na década de 60, nos EUA, visando o controle dos mosquitos na agricultura. Seu mecanismo de ação atua sobre as enzimas colinesterases, inibindo os impulsos nervosos. Seus efeitos aplicam-se aos insetos e mamíferos podendo ser absorvido pela pele, vias respiratórias e ainda, pela boca, no entanto, possui baixa toxicidade. É um dos larvicidas mais utilizados até hoje pelo mundo, no controle do mosquito, no entanto não apresenta atividade adulticida (TAYLOR; SCHOOFF, 1971). A partir da década de 90 foi constatada a resistência ao larvicida adquirida pelo vetor, fazendo com que seu uso fosse restringido, até que em 2014 tivesse seu uso proibido pelo ministério da saúde.

Atualmente, a relação dos compostos organofosforados e o câncer vêm sendo bastante estudada, há indício do favorecimento da doença em testes realizados em animais. No entanto, em humanos ainda não foi comprovado, sendo então classificados como prováveis cancerígenos (GUYTON et al., 2015).

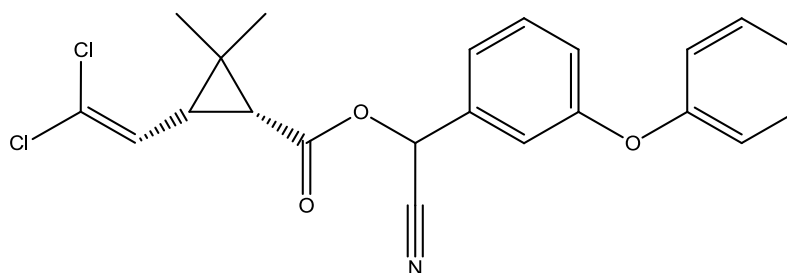
3.3.2.3 Carbamatos

Os carbamatos são compostos derivados do ácido carbâmico e sua comercialização teve início por volta dos anos de 1960. Possui uma rápida eficácia contra insetos mesmo possuindo um curto poder residual, em que seu período de decomposição dura de 1 a 4 dias. São moléculas bastante solúveis em água, o que faz com que tenham atuação sistêmica em plantas. (BRAGA; VALLE, 2007).

Figura 8: Estrutura química do Carbaril

3.3.2.4 Piretróides

A expressão piretróide é utilizada, usualmente para nomear os inseticidas fabricados a partir da derivação na estrutura das piretrinas (CARNEIRO, 2006). Os piretróides atuam de maneira similar ao DDT, em que atuam mantendo os canais de sódio abertos presentes nas membranas dos neurônios (PALCHICK, 1996). Dentre os compostos pertencentes a esta categoria, destacam-se como mais utilizados a cipermetrina e a deltametrina. Esses compostos são produzidos sinteticamente a partir de uma substância chamada piretro, obtida do crisântemo. Tem como característica ainda, não serem acumulativos, biodegradáveis e possuem baixa toxicidade a mamíferos e aves. Sua maior vantagem, consiste em sua atividade satisfatória mesmo fazendo o uso de baixas concentrações (BRAGA; VALLE, 2007).

Figura 9: Estrutura química da cipermetrina

3.3.2 Controle físico

Este tipo de controle se caracteriza pelo uso de elementos físicos ou mesmo intervenções no meio ambiente, para o combate do vetor. São utilizadas na maioria dos casos, armadilhas como forma de controle, em que o principal objetivo é a eliminação dos criadouros (EMDEN; SERVICE, 2004).

3.3.2.1 Telas e uniformes

Uma alternativa física para o controle consiste no uso de uniformes ou telas impregnados com inseticidas, tendo como principal objetivo, evitar a picada dos mosquitos.

Os uniformes já são utilizados em campanhas militares em selva para proteção dos soldados. As telas por sua vez, estão sendo utilizados nas portas e janelas das residências, escolas e unidades de saúde. A essas telas é adicionado o inseticida deltametrina, como são implantadas na parte externa das edificações contam ainda com a proteção ultravioleta aumentando sua eficácia (ZARA et al., 2016)

3.3.2.2 Armadilha de oviposição

O uso de armadilhas de oviposição mostrou-se um método mais eficaz na detecção e monitoramento tanto do *Ae. aegypti* quanto do *Ae. albopictus* (RAWLINS et al., 1998). Trabalhos existentes na literatura relatam a eficiência desse método em comparação a outros existentes, como por exemplo, o método de pesquisa larvária (BRAGA et al., 2000).

O desenvolvimento de novas armadilhas (figura 10) para a captura de indivíduos na fase adulta tem sido cada vez mais bem sucedido apresentando resultados favoráveis para a captura em testes realizados tanto no campo quanto em laboratório (DONATTI; GOMES, 2007).

Figura 10: Armadilha Adultrap



Fonte: Disponível em: <<http://www.jornaldocampus.usp.br/index.php/2010/10/combate-a-dengue-na-usp-nao-atinge-crusp/>>. Acessado em 27/12/17.

Existe ainda, outro tipo de armadilha que fazem uso de fitas adesivas como forma de captura para as fêmeas em fase de postura do mosquito. Essa armadilha é confeccionada em material plástico de cor escura, com forma cilíndrica de modo a reproduzir as condições encontradas em um criadouro natural. Em seu interior está contido um cartão adesivo inodoro de cor preta, responsável pela captura das fêmeas. São atraídas fazendo uso de uma solução

obtida através de infusões de gramíneas (*Panicum maximum*) adicionadas ao cartão (EIRAS; SANT'ANA, 2001).

3.3.3 Controle biológico

O controle biológico se caracteriza por sua menor toxicidade para os seres vivos e o meio ambiente, sendo uma técnica natural e biodegradável, impossibilitando o desenvolvimento de resistência pelo vetor (BARRETO, 2006). Dentre as alternativas encontradas para o uso deste tipo de controle podem ser utilizados peixes larvófagos como o *Gambusia affinis* ou mesmo larvas de outros mosquitos predadores.

Outro tipo de micro-organismo utilizado para o controle, atuando como bioinseticidas, são as bactérias do gênero *Bacillus*, em especial, o *Thuringiensis israelensis*. Este micro-organismo libera toxinas ao serem ingeridas pelas larvas do mosquito impedindo que ocorra o transporte de íons na região do intestino, levando, conseqüentemente à sua morte (MARCONDES, 2001).

3.4 Atraentes de oviposição

Os organismos fazem uso de alguma forma de comunicação química, para isso fazem uso de sinais que são os chamados semioquímicos e feromônios quando são utilizados para comunicação entre indivíduos da mesma espécie (PICKETT et al., 2014). Estímulos como a liberação de compostos voláteis, aliados ao calor e a umidade permitem que as fêmeas do *Ae. aegypti* encontrem seu hospedeiro específico (CABRINI; ANDRADE, 2006).

A atração gerada por estímulos oriundos da pele humana é acentuada entre os mosquitos. No entanto, algumas espécies como o *Ae. aegypti* possuem maior seletividade com relação ao seu hospedeiro, quando em comparação com outras espécies de mosquito. A hereditariedade é outro fator que possui influência na atração das fêmeas dos mosquitos, indivíduos gêmeos idênticos são capazes de atraí-las mais facilmente em comparação com aqueles não idênticos demonstrando que através de seu olfato as fêmeas podem detectar componentes genéticos (FERNÁNDEZ-GRANDON et al., 2015).

Outra forma de atração associada às mesmas ocorre na presença de CO₂ em conjunto com o ácido láctico. A partir de altas concentrações de CO₂, em associação com baixas concentrações do ácido ocasiona uma resposta de pouso das fêmeas da espécie sobre a fonte de atração (EIRAS; JEPSON, 1991).

Mais recentemente, o uso da matriz aquosa no qual o mosquito realiza seu ciclo de desenvolvimento vem sendo amplamente estudada. Após a transição de fase, são liberadas substâncias que atuam como atraentes para a oviposição de fêmeas em fase de postura.

Trabalhos realizados anteriormente mostram que os extratos obtidos das larvas do mosquito no terceiro e quarto estágios (L_3 e L_4) (COSTA, 2010), assim como aquele obtido após o término do ciclo completo de desenvolvimento, possuem a capacidade de atração quanto à oviposição das fêmeas (SANTOS, 2013).

3.5 Técnicas de preparo de amostras orgânicas

3.5.1 Extração em fase sólida (SPE)

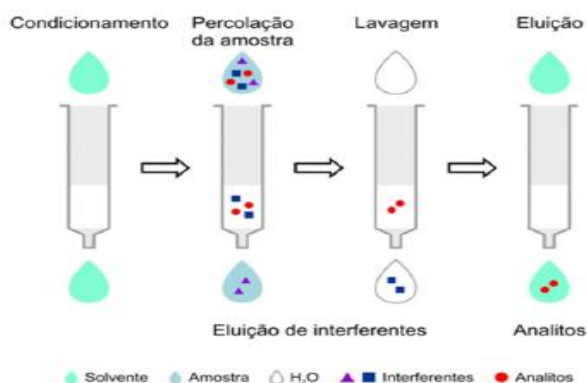
Dentre as técnicas utilizadas, atualmente para a extração e concentração de analitos oriundos de matrizes consideradas complexas, a extração em fase sólida é uma das mais utilizadas. Os analitos mesmo em concentrações muito baixas podem ser detectados pelos métodos cromatográficos podendo utilizar técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou mesmo a cromatografia gasosa (CG) combinada a esse tipo de extração (JARDIM, 2010).

A técnica consiste na separação líquido-sólido que é baseada em mecanismos semelhantes aqueles empregados pela cromatografia líquida de baixa pressão, sua principal aplicação consiste no isolamento dos analitos presentes em matrizes complexas (LANÇAS, 2004).

Na SPE os analitos presentes na matriz aquosa são retidos após atravessarem um cartucho contendo o sorvente. Em seguida, um solvente orgânico é utilizado para eluir os analitos contidos na fase sólida (figura 11) (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

Para a escolha do sorvente que venha a ser utilizado deve-se levar em consideração as características dos compostos de interesse, assim como, a natureza da matriz e das impurezas presentes (LANÇAS, 2004).

Figura 11: Etapas envolvidas na SPE: Condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.



Fonte: CALDAS et al., 2011.

As etapas envolvidas na extração consistem na ativação do sorvente empregado, percolação da amostra (sorção) dos analitos no sorvente, na eliminação dos interferentes presentes na matriz utilizada (clean up) e por fim, a eluição dos analitos, seguido por uma pré-concentração (SARTORATTO, 2001).

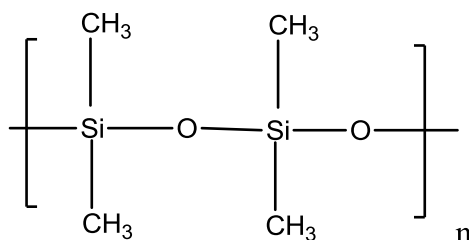
O desenvolvimento de novas fases estacionárias tem ocorrido para que ocorra uma melhor extração dos analitos. A adição de polímeros sobre a camada de sílica com a fixação do material por raios gama, tratamento térmico ou mesmo, o uso de micro-ondas mostra-se uma estratégia promissora no que diz respeito ao preparo de novos sorventes (JARDIM, 2010).

3.5.2 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME consiste em uma técnica para o preparo de amostras onde essas são isentas da presença de solventes, realizando a extração, bem como, concentração dos compostos voláteis, ou ainda, de compostos não voláteis presentes em matrizes líquidas. A extração é feita através de uma fibra modificada com um filme polimérico, sendo este, um sólido adsorvente (KATAOKA et al., 2000).

O dispositivo extrator é constituído por um bastão de fibra óptica de sílica fundida com um diâmetro em torno de 100 µm, recoberto por uma fina camada de polímero (~10 µm). Dentre os polímeros aplicados a técnica pode-se destacar: (polidimetilsiloxano (PDMS) (figura 12), poliacrilato (PA) ou CarboWax (Cwx) ou mesmo de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado (Carboxen)). O emprego de cada um destes, depende do tipo de analito de interesse e de sua polaridade (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Figura 12: Polímero de polidimetilsiloxano (PDMS)



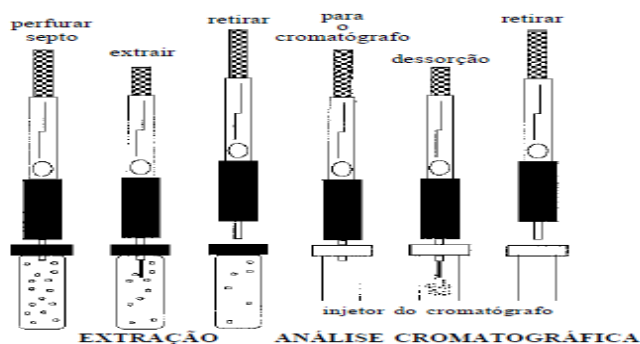
A fibra é fabricada em um material muito frágil. Para minimizar o risco de quebra, foi adicionado ao dispositivo, um amostrador (holder), nada mais que um suporte que ajuda na sustentação da fibra permitindo que seja manipulada mais facilmente durante a realização das análises. Ainda existe a presença de um êmbolo na outra extremidade da fibra, permitindo

a exposição de um tubo hipodérmico que é responsável por sua proteção. Esta parte do dispositivo atua como agulha, para que ocorra a perfuração dos septos no qual estão presentes as amostras (KATAOKA et al., 2000).

O processo de extração consiste na adição da amostra em frascos com tampas rosqueáveis, com a posterior introdução do amostrador SPME ao septo presente à tampa. Em seguida, a fibra é exposta a solução de interesse para que sejam adsorvidos os analitos de interesse. Por fim, o material é levado para a análise cromatográfica (figura 13) (PAWLISZYN, 2000).

Dentre as recentes aplicações que fizeram uso da técnica, estão relatadas na literatura as áreas da biomédica, farmacêutica, toxicologia social e ainda, como método de validação analítica dos métodos desenvolvidos (QUEIROZ, 2009).

Figura 13: Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CG.



Fonte: VALENTE; AUGUSTO, 2000

A SPME permite o uso de diferentes métodos no que diz respeito à extração de analitos, dentre eles podem ser destacados os três mais utilizados: Extração direta, indireta e headspace (VALDUGA et al., 2010). A extração direta é realizada através do contato direto entre a fibra e a amostra (aplicado a amostras com média ou baixa volatilidade em fase líquida ou gasosa), o método de extração indireta no qual a fibra é recoberta por uma membrana protetora evitando que a amostra degrade a superfície adsorvente da fibra. Já a técnica de headspace é empregada para a extração dos compostos voláteis liberados pelas amostras de interesse, sem que haja contato direto entre a fibra e a matriz, além de que esse método protege a fibra contra possíveis impurezas e permite ainda que ocorram a modificações na amostra (pH, força iônica, etc) (PAWLISZYN, 2000).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Formação das colônias de mosquitos

As colônias de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* foram mantidas no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios (LASIF) que se localiza no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, situado no campus A.C. Simões localizado em Maceió. Os ovos dos mosquitos *Ae. aegypti* são provenientes de colônias anteriores, criadas no próprio laboratório.

Para a formação das colônias de *Ae. aegypti* foram utilizados recipientes plásticos retangulares (40 X 26 X 8,5 cm) contendo água destilada, onde os ovos ficaram submersos por um período de 24 horas. As larvas foram alimentadas adicionando ração da marca WHISKAS® para cães ou para gatos. As colônias de mosquitos foram mantidas em fotoperíodo de 12L:12E horas, com temperatura do laboratório na faixa de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa do ar entre 50-60%.

Com a chegada a fase de pupas foi realizada a transferência das mesmas, separando-as das larvas existentes. As pupas foram submetidas a sucessivas transferências, no qual a água em que estas se encontravam era trocada com objetivo de eliminar o material particulado presente. Por fim, todas as pupas foram alocadas em gaiolas de madeira e telas de nylon com dimensões (30 x 30 x 30 cm). Após a emergência e chegada a fase adulta, os mosquitos foram alimentados com solução de mel a 5%, embebida em algodão.

O repasto sanguíneo foi realizado entre 4-5 dias após a emergência, sendo que as fêmeas foram alimentadas com sangue de galinha caipira. Os bioensaios foram realizados após o repasto sanguíneo, no período em que as fêmeas em fase de postura iniciaram a oviposição. Foram utilizados como suporte para oviposição papéis filtro cortados em forma circular e sustentados em superfícies de isopor colocados sobre a água.

Figura 14: Gaiola utilizada nos bioensaios



Fonte: SANTOS, 2013

4.2 Preparo da água de pupas

Foram colocadas 500 mL de água destilada em um recipiente de vidro, depois foram colocadas cerca de 700 pupas de *Ae. aegypti* de ambos os sexos. O recipiente foi colocado em uma gaiola (30 x 30 x 30 cm) ocorrendo a transição para a fase adulta. Após a completa transição para a fase alada, o recipiente contendo a matriz aquosa no qual ocorreu a emergência das pupas para a fase adulta foi retirado e o material filtrado em algodão e transferido para um recipiente de vidro com septo e este levado ao congelador, ficando armazenado sob uma temperatura de cerca de 0 °C.

4.3 Preparação do extrato por SPME – Microextração em fase sólida

Foram utilizados para extração o método de imersão no qual ocorre a extração direta, onde a fibra de PDMS (Polidimetilsiloxano) é imersa diretamente na amostra. Empregou-se ainda, a extração pelo método de headspace, no qual, ocorre a coleta dos compostos voláteis presentes.

Inicialmente, o material foi transferido para um frasco no qual foram adicionados, aproximadamente, 10 mL da amostra e levados para a chapa de aquecimento/ agitação por um período de 1 hora, onde se manteve a temperatura em torno de 40°C e sob agitação magnética constante do material. Decorrida a etapa inicial de estabilização da amostra foi introduzido ao frasco amostrador SPME para a extração dos analitos por um período de 2 horas.

Figuras 15 e 16: Procedimento para extração dos analitos.



Fonte: Autor, 2017

4.4 Identificação química dos extratos

Transcorrida a etapa de extração, os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A identificação química dos extratos foi realizada no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

A análise foi realizada em um aparelho GC-MS da marca SHIMADZU – MSQP5050A. As condições utilizadas são: coluna capilar (30m x 0,25 i.d. DB-1), Impacto eletrônico a 70 eV, 250°C; 30°C (5 min.), 5°C/min, até 250°C. Gás de arraste – hélio, ainda, com um analisador quadrupolar de massas. O tempo para realização da análise no equipamento foi de 40 minutos, com o procedimento sendo realizado em triplicata.

4.5 Bioensaios comportamentais de oviposição

Os bioensaios comportamentais de oviposição foram realizados da seguinte maneira: cada gaiola telada continha 10 machos e 20 fêmeas grávidas do mosquito *Ae. aegypti* com 3 dias de repasto sanguíneo, sendo feito a partir de frangos caipiras, e com idade de 7-10 dias. As gaiolas continham dois copos descartáveis de 50 mL cada. Um copo contendo 40 mL da água controle (água destilada) e o outro copo contendo 40 mL da solução teste. O copo com água teste continha a possível substância biologicamente ativa. A substância teste foi analisada na concentração de 1, 10 e 100 ppm. Ambos os copos continha papel de filtro qualitativo (Qualy) cortado em forma circular, imerso na água que atua como suporte de oviposição das fêmeas do mosquito. Os copos ficam em posição relativa diagonal durante 24 horas. Os ovos postos foram recolhidos e quantificados com o auxílio do microscópio óptico. Cada procedimento foi repetido 10 vezes e os resultados obtidos foram tratados, estatisticamente, pelo teste *t* de student.

4.6 Testes de campo

Para a realização dos testes de campo, foram estabelecidos 10 pontos que reunissem as melhores condições para a presença e o desenvolvimento de mosquitos, para isso foram considerados fatores como luminosidade, umidade e presença de vegetação. As armadilhas de oviposição eram compostas por um recipiente de cor escura com capacidade de 200 mL, onde foram adicionados 100 mL de água destilada (controle) e outra armadilha com 100 mL de água destilada em conjunto com uma gota (0,0010 g) da solução hexanólica (teste), posicionadas uma próxima a outra. As armadilhas continham um suporte de madeira para o auxílio na oviposição das fêmeas. Os resultados obtidos foram tratados, estatisticamente, através do teste *t* de student.

Figura 17: Teste de campo



Fonte: Autor, 2017

4.7 Análise estatística

Os ovos depositados nas soluções controle e testes de cada gaiola (ou armadilha) foram contabilizados, sendo esses dados convertidos em porcentagens e analisados através do Teste t de Student. Esta análise foi realizada com auxílio do programa GraphPadPrism 5, estabelecendo-se um intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram definidos como atraentes ou não, sendo medidos, qualitativamente pelo valor de P e classificados como significativo quando $P < 0,05$ muito significativo quando $P < 0,01$ e extremamente significativo quando $P < 0,001$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água proveniente de criadouros em seu ambiente natural (sem qualquer tratamento), já foi estudada no que diz respeito à atividade atraente para oviposição das fêmeas grávidas (BENTLEY; DAY, 1989). Para nosso trabalho foi escolhido apenas uma fase do ciclo biológico para ser estudada: a fase de pupa, uma vez que esta não se alimenta mais e é a última fase antes da fase alada, onde já não se faz mais necessário o criadouro aquático para o desenvolvimento. Assim, supondo que a liberação do feromônio de oviposição ocorre na fase de pupas como indicação e que o criadouro aquático é favorável a um novo desenvolvimento da espécie foi escolhido esta fase para a análise e identificação dos constituintes orgânicos. Essa passou por etapas de pré-tratamento no qual foram selecionadas apenas as pupas (machos e fêmeas), separando-as da água do criadouro inicial. Após a transição para a fase adulta (fase alada), a água residual foi filtrada a fim de separar o material orgânico presente do material aquoso a ser utilizado para análise.

O material, biologicamente ativo, foi levado para a análise em SPME. Foram empregados dois métodos para a extração dos analitos presentes, o método de extração direta onde ocorre o contato direto entre a fibra e a amostra e o método de extração por headspace, onde os compostos voláteis liberados pela amostra são adsorvidos pela fibra sem que haja o contato direto da fibra com a solução aquosa.

A escolha do método de extração por SPME ocorreu por esta ser uma técnica que oferece muitos benefícios como rapidez, não necessita de solvente, sensível e apresenta resultados quantitativos mesmo em concentrações muito baixas dos analitos, entre outros. Já a escolha da polaridade da fibra, foi baseada após a realização de um estudo prévio dos prováveis analitos existente na amostra, tendo visto que são compostos orgânicos liberados durante a transição do mosquito para a fase adulta.

O período de exposição da fibra foi de 2 horas; Decorrido este período o material foi levado para análise no GC-MS para que os analitos presentes na fibra fossem dessorvidos na coluna e, posteriormente analisados.

Após a realização da análise os resultados obtidos foram apresentados na forma de cromatogramas, onde foram destacados os compostos em função de sua intensidade no sinal. Alguns deles podem ser destacados (tabela 1) como possíveis candidatos a atraentes de oviposição.



Figura 18: Cromatograma obtido a partir da extração direta

Tabela 1: Compostos obtidos por extração direta

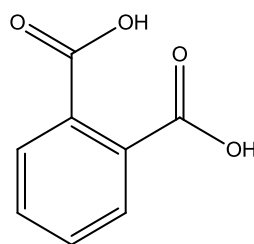
Pico	Rt (Min)	Similaridade (%)	Área (%)	Fórmula Molecular	Nome
1	23,875	86	4,88	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Ácido eicosanoico
2	27,109	90	20,89	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	Ácido 1,2-benzenodicarboxílico
3	29,191	91	27,56	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido (9Z)-octadecenóico
4	30,108	83	6,27	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido 9-hexadecanoico
5	30,727	84	9,71	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanoico
6	31,867	72	8,95	C ₁₆ H ₃₆ O ₂	9-Octacen-1-ol
7	32,238	74	10,08	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido hexadecanoico

Através dos compostos listados na tabela acima, podem ser destacados alguns ácidos graxos como o ácido (9Z)-octadecenóico, ácido 9-hexadecanoico e ácido octadecanoico. Em sua maioria, os compostos encontrados foram ácidos graxos de cadeia média, oriundos da transição da fase imatura (pupas) para a fase adulta. É importante ressaltar que esses ácidos graxos já foram isolados e identificados em outras pesquisas envolvendo o mosquito *Ae. aegypti*. GANESAN e colaboradores (2006), trabalhando com o extrato metanólico de ovos do mosquito *Ae. aegypti*, isolaram e identificaram os seguintes ácidos graxos: dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico, (9Z)-hexadecenóico, octadecanóico e (9Z)-octadecenóico. Os ésteres ((9Z)-hexadecenoato de metila e o (9Z)-octadecenoato de metila) obtidos através da esterificação dos ácidos graxos obtidos a partir do extrato metanólico também foram identificados. Esses ácidos graxos e ésteres foram testados em ensaios laboratoriais em relação à oviposição das fêmeas grávidas de *Ae. aegypti*, e entre todos os compostos testados,

o ácido dodecanóico e o ácido (9Z)-hexadecenóico demonstraram ação estimulante para oviposição em diferentes concentrações, enquanto os ésteres demonstraram efeito de repelência para oviposição. Por outro lado, os trabalhos de SHARMA et al., 2008; SEENIVASAGAN et al., 2013, resultaram em respostas positivas quanto à seletividade de oviposição para as fêmeas do *Ae. aegypti* e também do *Ae. albopictus* quando fizeram uso de ésteres de até 21 carbonos.

É possível observar ainda a existência de um sinal (2) no cromatograma, referente ao composto da classe dos ftalatos, oriundos do material plástico utilizado no armazenamento da água de pupas. Entre as sugestões de estrutura do equipamento, o ácido 1,2-benzenodicarboxílico (figura 18) foi aquele que obteve a maior similaridade dentre todos possíveis compostos assinalados após a análise.

Figura 19: Estrutura química do ácido 1,2-benzenodicarboxílico



A técnica de headspace também foi empregada para a extração dos voláteis existentes na amostra, com o objetivo de extrair os compostos voláteis presentes na amostra. A (figura 20) abaixo representa o cromatograma referente à análise.

Figura 20: Análise em headspace



A tabela (2) abaixo foi construída com base nos compostos que apresentaram maior intensidade no sinal dentre todos os apresentados, podendo-se destacar o ((ácido (9Z)-octadecenóico, ácido octadecanoíco, ácido hexadecanoíco), esses mesmos compostos foram observados a partir da extração direta, podendo assim, serem considerados como possíveis atraentes de oviposição. O número superior de sinais obtidos através da extração por headspace (figura 20) é explicado pelo fato da maioria dos compostos ser volátil à

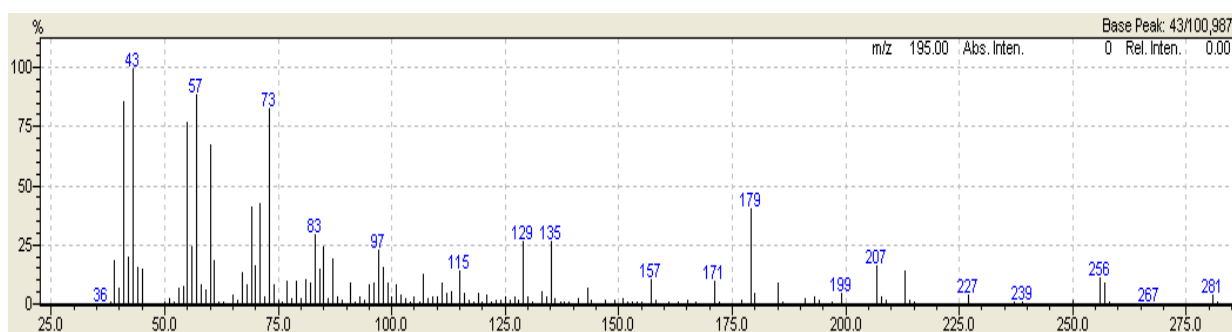
temperatura aplicada na análise (40°C). Assim, grande parte dos compostos obtidos através da extração direta também foram observados fazendo uso dessa técnica.

Tabela 2: Compostos extraídos por headspace

Pico	Rt (Min)	Similaridade (%)	Área (%)	Fórmula Molecular	Nome
1	25,252	76	23,88	C ₇ H ₁₄ O ₂	Ácido 2-heptanoíco
2	28,988	93	5,61	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido (9Z)-octadecenóico
3	20,013	88	2,96	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanoíco
4	31,137	85	12,86	C ₃ H ₈ O	Propan-2-ol
5	31,77	89	7,65	C ₁₁ H ₂₂ O	Undecanal
6	32,424	94	18,02	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido hexadecanoíco
7	32,238	71	10,08	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido 9-hexadecenoíco
8	35,54	87	3,66	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanoíco

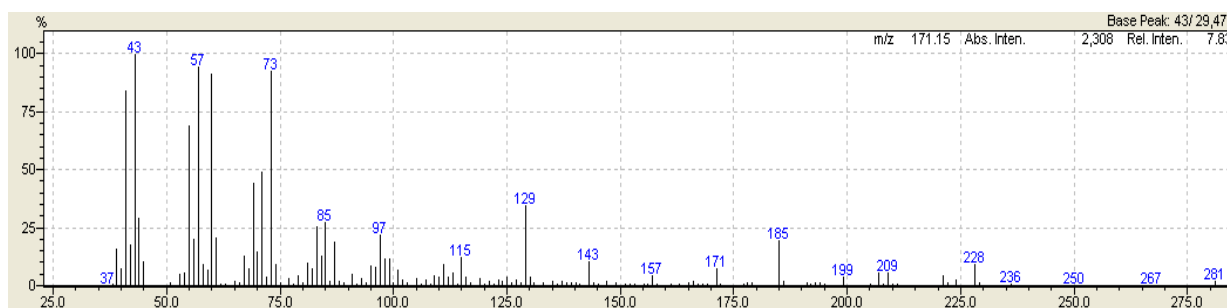
Após a realização da identificação dos compostos contidos na água de pupas os resultados foram comparados com aqueles encontrados na literatura (citados anteriormente), fazendo com que fosse escolhido o ácido oleico (ácido (9Z)-octadecenóico) pra ser testado como potencial atraente de oviposição para as fêmeas grávidas.

A fim de confirmar a presença do ácido oleíco, foi realizado um comparativo entre as

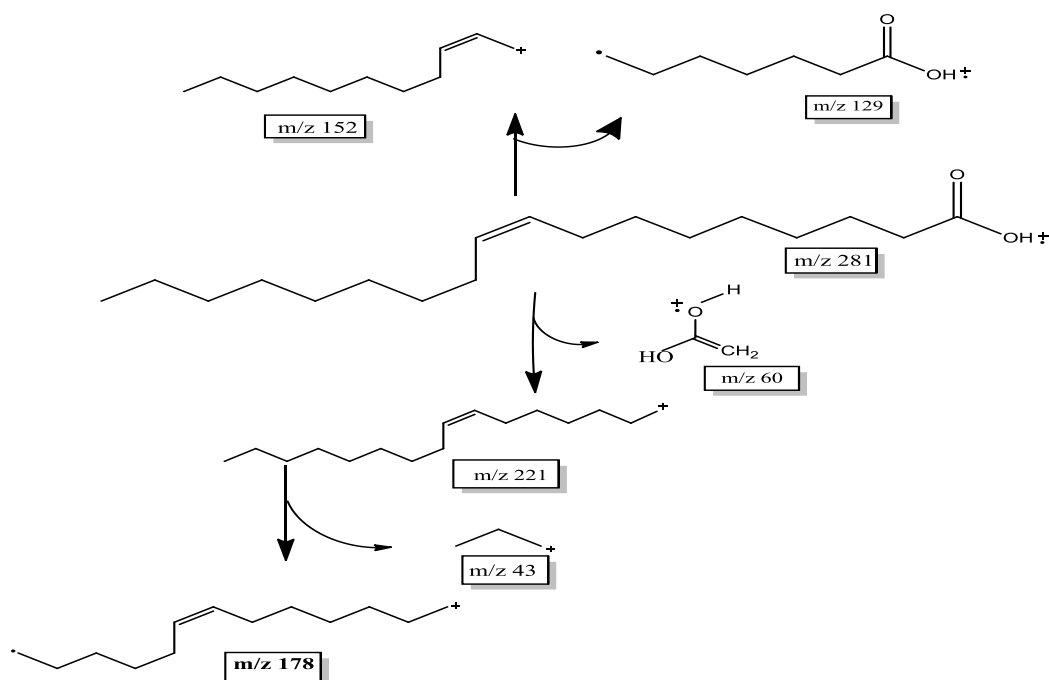


fragmentações obtidas tanto pra a extração direta, bem como, para análise em headspace.

Figura 21: Fragmentação do ácido oleíco (extração direta)

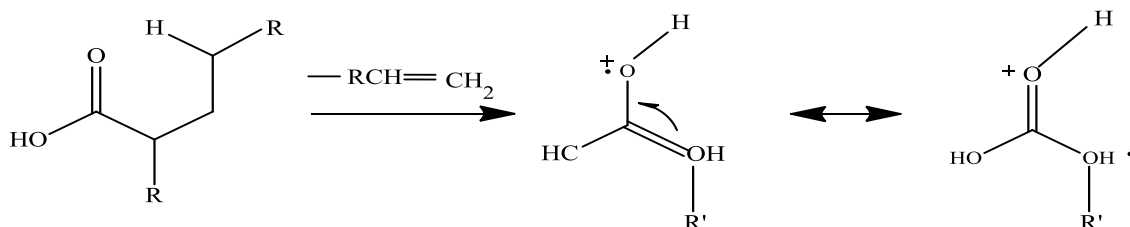
Figura 22: Fragmentação do ácido oleico (headspace)

O método de ionização utilizado pra análise foi o impacto de elétrons, permitindo que sejam formados os íons M^+ , onde são fornecidas informações estruturais à medida que ocorre fragmentação do composto formando novas moléculas com diferentes estabilidades. A partir do uso desse método, o ácido (9Z)-octadecenóico é bombardeado por elétrons dando origem a fragmentos de sua estrutura. Através dos Espectros acima podemos observar algumas picos característicos, como por exemplo, o pico do íon molecular apesar de pouco intenso pode ser visto (m/z 281), gerado a partir da perda de um próton inicial através do primeiro impacto de elétrons uma vez que a massa molecular do ácido (9Z)-octadecenóico é 282 g/mol. Pode observar a equivalência nas duas fragmentações, alguns picos característicos podem ser vistos. Por se tratar de um ácido graxo de cadeia longa, as sucessivas quebras entre as ligações C-C geram retenção de carga pelos fragmentos alquila obtendo uma relação m/z (43,57,73, ...). Abaixo está disposta a proposta de fragmentação do composto:

Figura 23: Proposta de fragmentação do ácido (9Z)-octadecenóico

Outro pico característico encontra-se em quando m/z é igual a 60, isto ocorre em função de um rearranjo de McLafferty que ocorre na carbonila (SILVERSTEIN, 2013).

Figura 24: Rearranjo de McLafferty



Assim após a confirmação da presença do ácido na amostra, foram realizados testes de oviposição em campo e também em laboratório na presença de diferentes concentrações (1, 10, 100 mg/L) do ácido (9Z)-octadecenóico (ácido oleico) a fim de confirmar atração perante as fêmeas grávidas do mosquito *Ae. aegypti*.

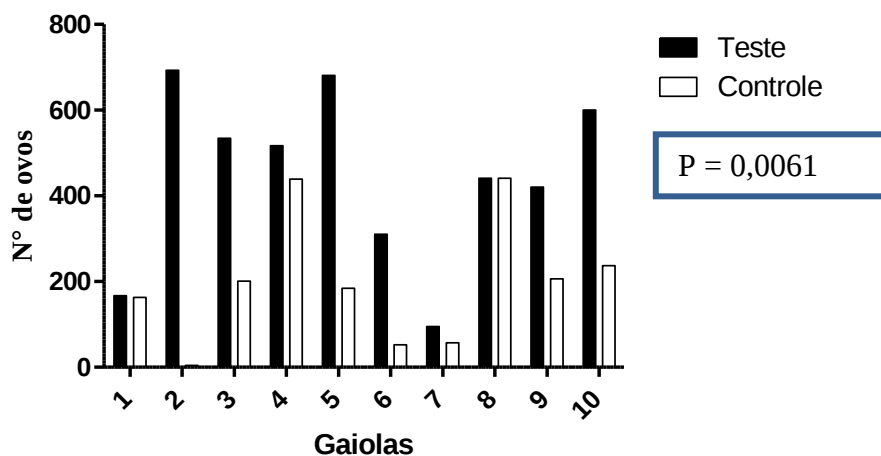
Inicialmente foram realizados os testes em laboratório com as diferentes concentrações estipuladas anteriormente, a fim de confirmar a capacidade atrativa dos compostos em condições ambientes equivalentes.

5.1 Testes em laboratório

Após a realização dos testes de oviposição, os ovos obtidos foram contabilizados para a realização dos testes estatísticos. A tabela abaixo mostra a distribuição do número de ovos perante o teste de dupla escolha.

Tabela 3: Teste em laboratório da solução hexanólica 100 mg/L

Gaiola	Teste	Controle
1	167	163
2	693	4
3	534	201
4	517	439
5	681	184
6	310	52
7	95	57
8	441	441
9	420	206
10	600	237
Total	4458	1747

Gráfico 1: Relação do número de ovos frente a solução 100 mg/L

Em seguida foram testadas as demais concentrações propostas.

Tabela 4: Teste em laboratório da solução hexanólica 10 mg/L

Gaiola	Teste	Controle
1	422	374
2	579	82
3	369	186
4	46	24
5	238	60
6	222	199
7	245	0
8	148	48
9	1	26
10	608	223
Total	2878	999

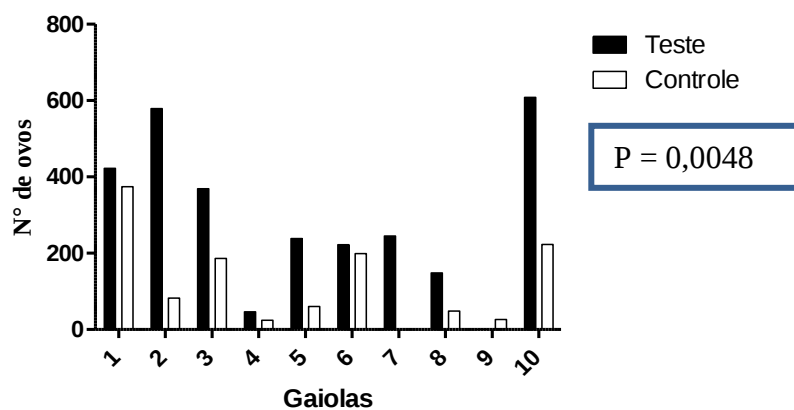
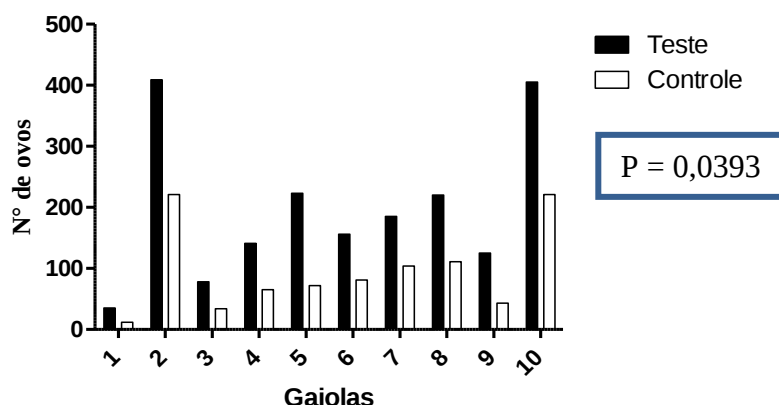
Gráfico 2: Relação do número de ovos frente a solução 10 mg/L

Tabela 5: Teste em laboratório da solução hexanólica 1 mg/L

Gaiola	Teste	Controle
1	35	12
2	409	221
3	78	34
4	141	65
5	223	72
6	156	81
7	185	104
8	220	111
9	125	43
10	405	221
Total	1977	743

Gráfico 3: Relação do número de ovos frente a solução 100 mg/L

Os resultados obtidos confirmam que o composto possuiu atratividade perante as fêmeas grávidas do mosquito *Ae. aegypti*. Em todos os experimentos realizados o número de ovos obtidos nos testes foi superior aqueles encontrados no controle. Dentre as concentrações da solução de ácido oleico testadas em laboratório a de 100 mg/L foi aquela que obteve o maior quantitativo de ovos com um total maior que 2,5 vezes maior que aquele encontrado no controle. A análise estatística realizada através do teste t de student apresentou resultados variando entre significativo com um valor de $p < 0,05$ quanto testada a solução de 1 mg/L e muito significativo para as concentrações de 10 e 100 mg/L com valores p menores que 0,01. A fim de confirmar os resultados foram realizados ainda, testes em campo, sendo que neste caso as condições ambientais podem apresentar variações em variáveis com temperatura, umidade e luminosidade.

5.2 Testes de campo

Foram testadas as soluções de ácido oleico em hexano nas diferentes concentrações descritas, onde foram obtidos o seguinte número de ovos expressos abaixo:

Tabela 6: Teste em campo da solução hexanólica 100 mg/L

Ponto	Teste	Controle
1	13	0
2	7	8
3	24	0
4	3	0
5	60	4
6	23	9
7	40	3
8	33	15
9	18	0
10	13	12
Total	234	51

Gráfico 4: Relação do número de ovos frente a solução 100 mg/L

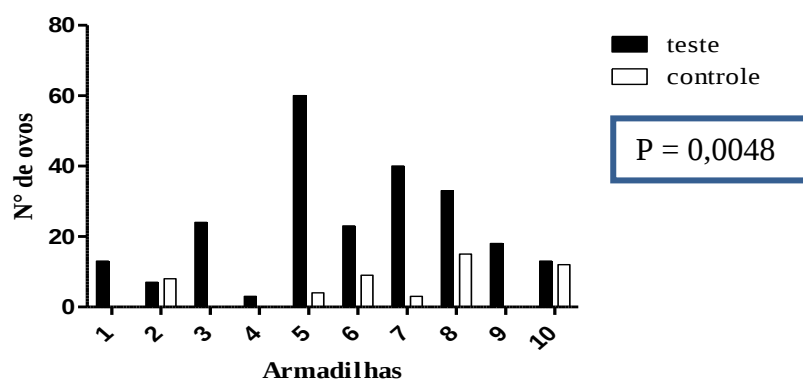


Tabela 7: Teste em campo da solução hexanólica 10 mg/L

Ponto	Teste	Controle
1	6	1
2	13	5
3	41	0
4	74	29
5	27	16
6	9	0
7	14	3

8	7	0
9	75	26
10	15	0
Total	281	80

Gráfico 5: Relação do número de ovos frente a solução 10 mg/L

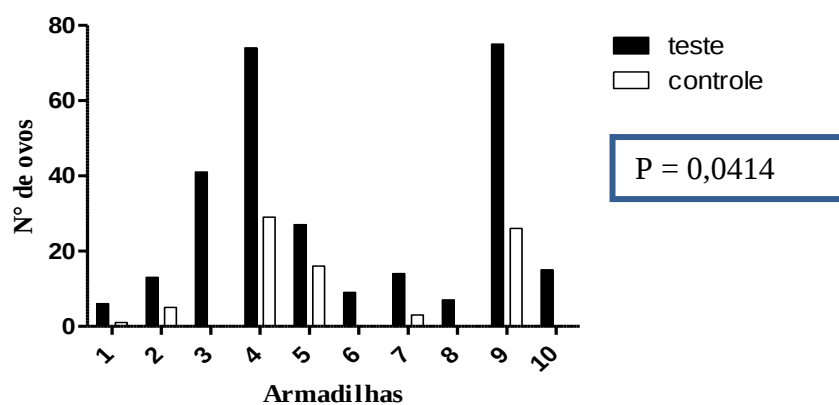
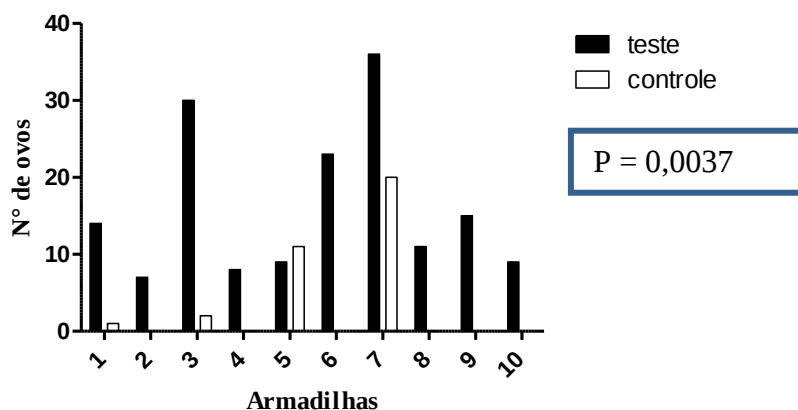


Tabela 8: Teste em campo da solução hexanólica 1 mg/L

Ponto	Teste	Controle
1	14	1
2	7	0
3	30	2
4	8	0
5	9	11
6	23	0
7	36	20
8	11	0
9	15	0
10	9	0
Total	162	34

Gráfico 6: Relação do número de ovos frente a solução 1 mg/L

Após a quantificação dos ovos obtidos, foram realizados novos testes estatísticos para confirmar a atração para oviposição das fêmeas em relação ao composto testado. Os valores de P observados indicam que houve atração, situando-se entre significativa $P < 0,05$ (solução 10 mg/L) e muito significativa $P < 0,01$ (soluções 100 e 1 mg/L). Assim, através da análise estatística realizada, ambos os testes confirmam a capacidade atrativa do ácido (9Z)-ácido octadecenoico a partir de sua exposição frente às fêmeas do *Ae. aegypti* grávidas. A partir disso, é possível fazer a utilização do composto para a construção de armadilhas de oviposição permitindo que seja feito o monitoramento e redução de indivíduos da espécie através do combate as fases imaturas do mosquito. Outra vantagem do uso de compostos naturais no controle dos vetores, é que esses preservam o meio ambiente, por não afetar os organismos existentes, pois o composto testado é produzido naturalmente por alguns animais e plantas.

6. CONCLUSÃO

Diferentemente, dos trabalhos realizados anteriormente, que utilizavam a água de criadouros *in natura*, o presente trabalho realizou um tratamento prévio na água com intuito de selecionar o material, biologicamente ativo, proveniente apenas da transição entre a pupa e a fase adulta.

Foram utilizados dois métodos para extração dos analitos presentes na amostra. O método de extração direta no qual a fibra SPME é introduzida, diretamente, na amostra e ainda o método de headspace, o qual visa à coleta dos voláteis liberados pela solução com um tempo de extração de 2 horas para ambas as técnicas.

A amostra foi analisada no GC-MS após a dessorção dos analitos retidos na fibra, foi utilizada uma coluna capilar para separação dos compostos e um detector quadrupolo para análise. O ácido (9Z)-octadecenóico, foi escolhido para a realização dos testes de oviposição após a realização do levantamento literário de sua atratividade perante as fêmeas grávidas. Através relação m/z (fragmentação) foi verificada a presença do composto mesmo fazendo uso de dois tipos de extração.

Após a realização da análise estatística (teste t student) do número de ovos obtidos, o composto apresentou resultados positivos quanto sua atratividade. Foram obtidos resultados significativos e muito significativos tanto nos testes realizados em laboratório quanto no campo. Todas as concentrações testadas tiveram resultados positivos, sendo que no laboratório o melhor resultado foi observado para a concentração de 10 mg/L e no campo para 1 mg/L. Desta forma, o composto poderia ser utilizado visando a construção de armadilhas de oviposição, seu uso poderia ser aplicado no monitoramento e combate ao vetor.

7. REFERÊNCIAS

- ALDRID, W. N. Insecticides, past, present and future: practice and understanding of mechanisms. **The Annals of Occupation and Hygiene**. v.22, p.407-09, 1979.
- ARDUINO, M. B.; ÁVILA, G. O. Aspectos físico-químicos da água de criadouros de *Aedes aegypti* em ambiente urbano e as implicações para o controle da dengue. **Revista Patologia Tropical**. v.44, n.1, p.89-100, 2015.
- BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**. v.1, n.2, p.62-73, 2005.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (spme) de piretróides em água. **Química Nova**. v.24, n.2, p.172-75, 2001.
- BENTLEY, M. D.; DAY, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Reviews Entomology**. v.34, p.401-21, 1989.
- BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1998.
- BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera:Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia**. v.99, n.3, p.281-85, 2009.
- BOS, R. New approaches to disease vector control in the context of sustainable development. **Cadernos de Saúde Pública**. v.8, p.240-48, 1992.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviço da Saúde**. v.16, n.2, p.279-93, 2007.
- BRAGA, I. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.33, n.4, p.347-53, 2000.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emergency Infections and Diseases**. v.4, n.4, p.605-13, 1998.
- CABRINI, I.; ANDRADE, C. F. S. 2006 - **Resposta de fêmeas de mosquitos ao hospedeiro - Busca por Alimentação**. Página na Internet: Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP. Disponível em: < http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm >. Acesso em 12 de junho de 2017.
- CAGLIOTTI, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiologica**. v.36, p.211-27, 2013.
- CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**. v.34, n.9, p.1604-17, 2011.

- CARNEIRO, V. M. T. **Síntese de piretróides e estudos de sua atividade de inseticida**. 2006. 208 p, Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fio Cruz, 1994.
- COSTA, L. H. **Avaliação de infoquímicos presentes em ovos e larvas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) como atraentes e/ou estimulantes de oviposição para grávidas co-específicas**. 2010. 129p. Tese (Mestrado em Parasitologia) - Departamento Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.
- DONATTI, J. E.; GOMES, A. C. Adultrap: Descrição de armadilha para adulto de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v.51, n.2, p.255-56, 2007.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on yap Island, Federation States of Micronesia. **New England Journal Medicine**. v.360, n.24, p.2536-43, 2009.
- EDMAN, J. D. Orientation of some Florida mosquitoes (Diptera: Culicidae) toward small vertebrates and carbon dioxide in the field. **Journal Medicine and Entomology**. v.15, p.292-96, 1979.
- EIRAS, A.E.; JEPSON, P.C. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. **Bulletin of Entomology Research**. v.81, p.151-60, 1991.
- EIRAS, A. E. & SANT'ANA, A. L. **Atraentes de oviposição de mosquitos**. Depósito de Patente no Brasil: PI0106701-0, 2001.
- EMDEN H. F.; SERVICE, M. W. **Pest and Vector Control**. Liverpool: Cambridge University Press, 2004.
- European Centre for Disease Prevention and Control. **Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome**. ECDC. Stockholm, 2015.
- FERNÁNDEZ-GRANDON G.M. et al. Heritability of Attractiveness to Mosquitoes. **PLoS ONE**. v.10, n.4, p.1-10, 2015.
- FIOCRUZ, A dengue. Reunião, análise e difusão da informação sobre a saúde. **Súmula**. n.87. p.1-16, 2002.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Editora da USP, v.2, 2002.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Controle de vetores: Procedimentos de segurança**. Brasília, 2001b.187p
- GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malária e Doenças Tropicais**. v.37, p.29-36, 1985.

- GANESAN, K. et al. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. **Australian Journal of Entomology**. v.45, p.75-80, 2006.
- GUYTON, K. et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**. v.16, n.5, p.490-91, 2015.
- JARDIM, I. C. F. S. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para a preparação de fases sólidas. **Sciencia Chromatographica**. v.2, n.1, p.13-25, 2010.
- KATAOKA, H.; LORD, H.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatographic**. v. 880, p.36-62, 2000.
- KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes Albopictus*. **eLIFE**. v.4, p.1-18, 2015.
- KLINE, D. L. Introduction to symposium on attractants for mosquito surveillance and control. **Journal of the American Mosquitoes Control Association**. v.10, n. 2, p.253-57, 1994.
- LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.
- LOZOVEI, A. L. Culicídeos (Mosquitos). In: Marcondes, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. 432p. p.59-103.
- LUNA, J. E. D. et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.6, p.842-43, 2004.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- MENDONÇA, F. A. et al. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**. v.21, n.3, p.257-69, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre de chikungunya: manejo clínico**. Disponível em: <http://bvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_chikungunya_manejo_clinico.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2017.
- NATAL, D. Bioecology of *Aedes aegypti*. **Biology**. v.64, n.2, p.205-7, 2002.
- OLEIVEIRA, W. H. **Zika vírus - informações sobre a doença e investigação da síndrome exantemática no nordeste**. Ministério da Saúde, 2015. 16p.
- PALCHICK, S. **Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996.
- PAWLISZYN, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. **Journal of Chromatography Science**. v.38, p.270-78, 2000.
- PICKETT, J. A. et al. Vertebrate pheromones and other semiochemicals: the potential for accommodating complexity in signalling by volatile compounds for vertebrate management. **Biochemical Society Transactions**. v.42, n.4, p.846-60, 2014.

- PORTAL DA SAÚDE. **Dengue**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 13 jun. 2017.
- QUEIROZ, M. E. C. Microextração em Fase Sólida Para Análise de Fármacos em Fluidos Biológicos. **Scientia Chromatographica**. v.1, n.3, p.11-19, 2009.
- RAWLINS, S. C.; MARTINEZ, R. S. W.; LEGALL, G. A comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. **Journal of the American Mosquitoes Control Association**. v.14, p.131-36, 1998.
- REY, J. R.; O'CONNELL, S. M. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. **Journal of Vector Ecology**. v.39, n.1, p.190-96, 2014.
- ROBERTS, L. Mosquitoes and disease. **Sciencia**. v.298, p.82-3, 2002.
- ROMANO, L. H. Zika Vírus, capacidade de infecção e evolução da doença. **Revista Saúde em Foco**. ed. 9, 2017.
- Sharma, K. R. et al. Oviposition responses of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to certain fatty acid esters. **Parasitology Research**. v.103, p.1065-73, 2008.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Chikungunya: Manejo Clínico**. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.77p
- SANTOS, D. H. S. **Estudo do Comportamento da Atividade de Oviposição da Fêmea do Mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (L.) frente à Água de Larvas**. 2013. 49p. TCC (Graduação em Química) - Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2013.
- SARTORATTO, A. **Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por micro-extração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME/GC)**. 2001. 101p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001.
- SEENIVASAGAN, T.; GUHA, L.; IQBAL, S. T. Behavioral and electrophysiological responses of *Culex quinquefasciatus* to certain fatty acid esters. **Acta Tropica**, v.128, p.606-12, 2013.
- SILVA, P. C. **Controle de vetores – procedimento de segurança**. Ministério da Saúde. Brasília, 2011, 187 p.
- SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.
- TAUIL, P. L. **Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil**. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública/Cadernos de saúde pública. Rio de Janeiro. v.18, n.3, p.867-71, 2002.

- TAYLOR, R. T; SCHOOOF, H. F. Experimental field treatments with larvicides for control of Anopheles, Aedes and Culex mosquitoes. **Journal of Economic Entomology**. v.64, p.1173-1176, 1971.
- VALDUGA, E. et al. Microextração em Fase Sólida (MEFS) de compostos voláteis produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.4, p.987-92, 2010.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração Por Fase Sólida. **Química Nova**, v.23, n.4, 2000.
- VIANNA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.16, n.2, p.240-56, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 13 jun. 2017.
- ZARA, A. L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão (artigo de revisão). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.25, n.2, p.391-404, 2016.