

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Daniel Silva Fortes

ESTUDO DE SEMIQUÍMICOS QUE MEDIAM A OVIPOSIÇÃO DOS CULICÍDEOS
Aedes aegypti, Aedes albopictus e Culex quinquefasciatus

Maceió – Al
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Daniel Silva Fortes

ESTUDO DE SEMIQUÍMICOS QUE MEDIAM A OVIPOSIÇÃO DOS CULICÍDEOS
Aedes aegypti, Aedes albopictus e Culex quinquefasciatus

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a M^a Cristina Caño de Andrade

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

F738e Fortes, Daniel Silva.
Estudo de semioquímicos que mediam a oviposição dos culicídeos
Aedes aegypti, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* /Daniel Silva
Fortes. – 2009.
88 f. : il., grafs., tabs.

Orientador: Maria Cristina Caño de Andrade.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 82-88.

1. Mosquito - Controle. 2. Oviposição. 3. Semioquímicos.
4. Compostos bioativos. 4. *Aedes aegypti*. 5. *Aedes albopictus*. 6. *Culex*
quinquefasciatus. I. Título.

CDU: 543.97



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-1384
Email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Daniel Silva Fortes intitulada: "Estudo de Semioquímicos que Mediam o Comportamento de Oviposição dos Mosquitos *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 4 de dezembro de 2009, às 14h na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Caño de Andrade
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

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

Prof.^o Dr.^o Johnnatan Duarte de Freitas
UFAL

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, fonte de vida e alegria, em quem a fé foi que mais me motivou a nunca desistir e sobrepor-me às adversidades encontradas durante toda a vida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Cristina Caño de Andrade, por vezes mestra, por vezes mãe. Na dureza das palavras ou no conforto do consolo, muitas vezes acreditou em mim até mais que eu mesmo. Agradeço ao incentivo contínuo, ao conhecimento transmitido e a paciência sobre-humana, que certamente levarei como exemplo a qualquer lugar que vá.

Aos professores Dr. Euzébio Sant'Ana, Dr^a. Marília Goulart, Dr^a Sônia Machado, Dr^a Márcia Pletsch, Dr. Gilberto Fontes, Dr^a Iracilda Lima, e em especial à Dr^a Maria Lúcia Conserva, pelos ensinamentos teóricos e morais, sem os quais seria impossível a conclusão desse trabalho.

Aos professores Dr. Euzébio Sant'Ana, Dr. Johnnatan Freitas, Dr^a Ruth Nascimento, Dr^a Margarida Humberto, Dr^a Êurica Nogueira, pela avaliação na qualificação e defesa deste trabalho, contribuindo para sua melhoria e maior valor científico.

À equipe do Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios: Valéria Batista, Sivaldo Paulino, Jademilson dos Santos, Kátia Helena, Rafael Ferreira, Rodrigo Pimentel, Regilene de Lima, Micaela, Chloe Stenkamp-Strahm e Olivia Shinski, companheiros de trabalho e grandes amigos.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, onde sempre fui bem acolhido por todas as vezes que precisei.

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

À minha esposa Íris e minha doce anjinha Isadora, que embora não tenham compartilhado contemporaneamente comigo este momento, é como se sempre estivessem junto a mim.

À minha mãe Silvaney, meu pai Julio (*in memoriam*), meus irmãos Rafael e Juliana, meus cunhados, sobrinhos, avós e tios que compartilharam dos melhores e piores momentos, mas sempre com palavra de incentivo e força.

Aos grandes amigos que trago comigo há tempo e aos novos que fiz durante este curso. A todos vocês o meu muito obrigado.

RESUMO

Doenças transmitidas por vetores consistem hoje em um grande problema para a saúde global, com aproximadamente 500 milhões de pessoas sendo infectadas por uma delas anualmente. Como agravante tem-se o fato de que muitos vetores têm demonstrado aumento de resistência aos inseticidas empregados nos programas de controle. Nós apresentamos neste trabalho resultados que mostram maior preferência de oviposição por mosquitos das espécies *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* para infusões orgânicas obtidas de matrizes vegetais e seus extratos etéricos. O desenvolvimento desta nova estratégia de controle visa à utilização racional de inseticidas, resultando em menor dano ao meio ambiente. Os extratos obtidos por extração líquido-líquido e extração por sorção em barra de agitação mostraram-se ativos em bioensaios de oviposição com as espécies de mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, possibilitando futuramente a identificação de substâncias presentes e determinação de suas atividades fisiológicas por eletroantenografia. Pela primeira vez realizamos uma extração ácido-base para o isolamento e identificação de semioquímicos presentes em *Aloe vera*. Dentre as frações obtidas a que conteve os compostos neutros e fenólicos foi a única que apresentou-se ativa para a oviposição de *Aedes aegypti*. Nesta fração sugerimos a estrutura de cinco compostos através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Os compostos Biciclo [5.3.0] decapentaeno (Azuleno), (E)-2-Decenal, Heptadecano, 2,6-dibutil-2,5-cicloexadieno-1,4-diona e 4-metil-2,6-ditert-butilfenol precisam ainda da comparação com seus padrões sintéticos para confirmação das estruturas através do tempo de retenção e fragmentação de massas, além de estudos eletrofisiológicos para determinação de suas atividades comportamentais nos insetos. Foram realizados também estudos preliminares do comportamento de oviposição do mosquito *C. quinquefasciatus* pela infusão aeróbica de cebolinha, com resultados promissores.

Palavras-chave: Culicídeos. Semioquímicos. Oviposição. Controle de mosquitos.

ABSTRACT

Vectors-borne diseases are actually a great problem to the global public health, with approximately 500 million people being annually infected. An aggravating factor is the fact that many vectors showed increasing resistance to insecticides used in control programs. We present in this study results that showed a higher preference for oviposition by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* to organic infusions obtained from its headquarters plant and ether extracts. The development of this new control strategy aims at the rational use of insecticides, resulting in less damage to the environment; the extracts obtained by liquid-liquid extraction and stir bar sorption extraction were active in oviposition bioassays with mosquitoes *A. aegypti* and *A. albopictus*, enabling future identification of substances and determining their physiological activity by electroantennograph. It was first performed an acid-base extraction for the isolation and identification of substances in *Aloe vera*. The fractions that contain the neutral and phenolic compounds were the only ones which presented to be active for *A. aegypti* oviposition. We suggest, by GC-MS technique five compounds: Bicyclo [5.3.0] decapentaene (Azulene), (E)-2-Decenal, Heptadecane, 2,6-dibutyl-2,5-ciclohexadiene-1,4-dione e 4-methyl-2,6-ditert-butylphenol, but to confirm it's necessary the comparison with their synthetic standards, and retention times and mass fragmentations besides electrophysiological studies of their relation to behavioral activities in insects. We also carried out preliminary studies of oviposition behavior of the mosquito *C. quinquefasciatus* by infusion aerobic chives, with promising results.

Key words: Culicids. Semiochemicals. Oviposition. Mosquitoes control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fêmea do mosquito <i>A. aegypti</i>	17
Figura 2: Fêmea do mosquito <i>A. albopictus</i>	18
Figura 3: Fêmea do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	20
Figura 4: Estrutura Química do DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano].....	23
Figura 5: Estrutura química do organofosforado Temefós	25
Figura 6: Estrutura química da cipermetrina	26
Figura 7: Estrutura química do ácido eritro-5,6-diidroxiexadecanóico	28
Figura 8: Estrutura química do p-cresol identificado em infusão de madeira por Bentley e colaboradores (1979).	29
Figura 9: Estruturas químicas dos compostos avaliados por Hwang e colaboradores (1980). ..	29
Figura 10: Estrutura química do eritro-6-acetoxi-5-hexadecanolida identificada por Laurence ; Pickett (1982).	30
Figura 11: Estruturas químicas das substâncias identificadas em infusão de grama bermuda por Millar e colaboradores (1992).	31
Figura 12: Estruturas químicas dos feromônios identificados em água de larvas de <i>Aedes aegypti</i> por Mendki e colaboradores (2000).	31
Figura 13: Estrutura química dos compostos presentes em extrato de plantas identificados por Torres-Estrada e colaboradores (2005).	32
Figura 14: Estrutura química dos compostos isolados por Ganesan e colaboradores (2006) a partir de extratos de ovos de <i>Aedes aegypti</i>	34
Figura 15: Estruturas químicas dos ésteres de ácido graxos estudados por Shama e colaboradores (2008) que influenciaram a atividade de oviposição de <i>A. aegypti</i>	35
Figura 16: Estrutura química dos compostos estimulantes de oviposição identificados por Ponnusamy e colaboradores (2008) em extrato metanólico de infusão de folhas de bambu. ..	36
Figura 17: Estrutura química de compostos especificamente atraentes para mosquitos do gênero <i>Culex</i> testadas em campo por Trexler et al. (2003).	37
Figura 18: Preparação da infusão aquosa de Aloe vera	45
Figura 19: Sequência de etapas usadas para fracionar a infusão de <i>A. vera</i>	46
Figura 20: Porcentagem de ovos depositados e seus respectivos EPM nos recipientes do bioensaio H ₂ O x H ₂ O	50
Figura 21: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV10% x H ₂ O	51
Figura 22: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2N x H ₂ O	53

Figura 23: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2A x H ₂ O	55
Figura 24: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2B x H ₂ O.....	56
Figura 25: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2A + AV-2B x H ₂ O	58
Figura 26: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição ICB x H ₂ O.....	61
Figura 27: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição ICB30% x H ₂ O.....	62
Figura 28: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição IFB x H ₂ O.....	63
Figura 29: Estrutura química das substâncias identificadas por Paulino (2008) presentes em extrato líquido-líquido de <i>A. vera</i>	65
Figura 30: Cromatograma obtido a partir da fração AV-2N submetida à análise por GC.....	66
Figura 31: Espectro de massa do Biciclo [5.3.0] decapenteno (azuleno) (TR: 14.775) presente na fração AV-2N.....	67
Figura 32: Espectro de massa do trans-2-decenal (TR: 16.183) presente na fração AV-2N. ...	68
Figura 33: Espectro de massa do heptadecano (TR: 18.692 min.) presente na fração AV-2N.	69
Figura 34: Espectro de massa do 2,6-dibutil-2,5-cicloexadieno-1,4-diona (TR: 19.992) presente na fração AV-2N.....	70
Figura 35: Espectro de massa do 4-metil-2,6-di-terc-butilfenol (TR: 20.708) presente na fração AV-2N.	71
Figura 36: Estrutura química dos possíveis compostos identificados na fração AV-2N.....	71
Figura 37: Porcentagem de ovos depositados por fêmeas de <i>A. albopictus</i> no tratamento e controle no bioensaio de oviposição IAV10% x H ₂ O.	73
Figura 38: Porcentagem de ovos depositados por fêmeas de <i>A. albopictus</i> no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AVSBSE x H ₂ O.....	75
Figura 39: Porcentagem de ovos depositados por fêmeas de <i>A. albopictus</i> no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AVLLE x H ₂ O.....	76
Figura 40: Número de jangadas de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição com fêmeas de <i>C. quinquefasciatus</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ovos depositados nos dois recipientes no bioensaio de oviposição H ₂ O x H ₂ O	49
Tabela 2: Ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV _{10%} x H ₂ O	50
Tabela 3: Ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2N x H ₂ O	53
Tabela 4: Bioensaio de oviposição AV-2A x H ₂ O	54
Tabela 5: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV-2B x H ₂ O destilada. .	56
Tabela 6: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV-2A + AV-2B x H ₂ O destilada.....	57
Tabela 7: Resposta oviposicional de fêmeas do <i>Aedes aegypti</i> para infusão e frações obtidas na extração ácido-base de <i>Aloe vera</i>	59
Tabela 8: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio ICB x H ₂ O	60
Tabela 9: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio ICB _{30%} x H ₂ O destilada. .	62
Tabela 10: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio IFB x H ₂ O destilada.	63
Tabela 11: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio IAV _{10%} x H ₂ O.....	73
Tabela 12: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV _{SBSE} x H ₂ O	74
Tabela 13: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV _{LLE} x H ₂ O.....	75
Tabela 14: Número de jangadas de ovos depositadas no tratamento e controle no bioensaio I _{Ceb} x H ₂ O.	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	<i>Aedes aegypti</i> – o principal vetor da dengue e da febre amarela	18
2.2	<i>Aedes albopictus</i> – o tigre asiático	19
2.3	<i>Culex quinquefasciatus</i> – o mosquito doméstico do Sul	20
2.4	Medidas de Controle Vetorial e Resistência a Inseticidas	22
2.4.1	Controle Físico	22
2.4.2	Controle Biológico	23
2.4.3	Controle Químico	24
2.4.3.a	Organoclorados	24
2.4.3.b	Organofosforados	25
2.4.3.c	Carbamatos	26
2.4.3.d	Piretróides	26
2.5	Comportamento e Seleção do Sítio de Oviposição	28
3	OBJETIVOS	39
3.1	Geral	39
3.2	Específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Formação de colônias do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	40
4.2	Formação de colônias do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	40

4.3	Formação de colônias do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	42
4.4	Bioensaios comportamentais de oviposição	42
4.5	Análise estatística	43
4.6	Escolha e preparo das infusões orgânicas utilizadas nos bioensaios	44
4.6.1	Obtenção e preparação de infusão de folhas de bambu (IFB) e infusão de caule de bambu (ICB)	44
4.6.2	Preparação da infusão de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i>)	45
4.6.3	Preparação da infusão de <i>Aloe vera</i>	45
4.6.4	Extração ácido-base a partir de infusão de <i>Aloe vera</i>	46
4.6.5	Extração líquido-líquido a partir de infusão de <i>Aloe vera</i>	47
4.6.6	Extração por Sorção em Barra de Agitação (SBSE) a partir de infusão de <i>Aloe vera</i>	47
4.7	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Bioensaios de oviposição realizados com fêmeas do mosquito <i>A. aegypti</i>	49
5.1.1	Validação do experimento: bioensaio de oviposição H ₂ O x H ₂ O	50
5.1.2	Bioensaio de oviposição com infusão de <i>Aloe vera</i>	51
5.1.3	Bioensaio de oviposição com os extratos obtidos com a Extração ácido-base da <i>Aloe vera</i>	53
5.1.3.a	Bioensaio de oviposição com extrato ácido-base de <i>Aloe vera</i> – Fração Neutra e Fenólica (AV-2N)	53
5.1.3.b	Bioensaio de oviposição com extrato ácido-base de <i>Aloe vera</i> – Fração Ácida (AV-2A)	55

5.1.3.c	Bioensaio de oviposição com extrato ácido-base de <i>Aloe vera</i> – Fração Básica (AV-2B)	57
5.1.3.d	Bioensaio de oviposição com extrato ácido-base de <i>Aloe vera</i> - recombinação fração ácida + fração básica (AV-2A + AV-2B)	58
5.1.4	Bioensaios de oviposição com infusão fermentada de caule e folhas de bambu (<i>Bambusa vulgaris</i>)	60
5.1.4.a	Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de <i>A. aegypti</i> utilizando Infusão de Caule de Bambu x Água Destilada	60
5.1.4.b	Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de <i>A. aegypti</i> utilizando Infusão de Caule de Bambu 30% x Água Destilada	62
5.1.5	Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de <i>A. aegypti</i> utilizando Infusão de Folhas de Bambu x Água Destilada	63
5.2	Identificação dos Compostos isolados através de GC-MS na fração AV-2N	65
5.3	Bioensaios de Oviposição realizados com fêmeas do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	72
5.3.1	Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de <i>A. albopictus</i> utilizando Infusão de <i>Aloe vera</i> 10% x Água Destilada	73
5.3.2	Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de <i>A. albopictus</i> utilizando Extrato SBSE de <i>Aloe vera</i> x Água Destilada	74
5.3.3	Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de <i>A. albopictus</i> utilizando extrato LLE de <i>Aloe vera</i> x Água Destilada	75
5.4	Bioensaio de oviposição realizado com fêmeas do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	77
5.4.1.	Bioensaio de oviposição de fêmeas grávidas de <i>C. quinquefasciatus</i> utilizando infusão de caule e folha de cebolinha (<i>Allium fistulosum</i>)	78

6	CONCLUSÕES	80
7	PERSPECTIVAS	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores ocorrem em mais de 100 países em todo o mundo, onde habita aproximadamente metade da população mundial. As doenças possuem alta prevalência com mais de 500 milhões de casos a cada ano (OMS, 2009). O termo vetor é aplicado para um organismo que transfere um patógeno de um hospedeiro para outro (ALLABY, 1998). Fatores como a invasão do homem em áreas silvestres e sua consequente introdução no ciclo zoonótico de microrganismos, e o grande tráfego populacional e mercantil decorrente da crescente globalização iniciada desde a expansão marítima no século XV, facilitaram a disseminação de vetores por todo o planeta (CONSOLI ; LOURENÇO-de-OLIVEIRA, 1994).

A chegada, estabelecimento e expansão de vetores em áreas exógenas estão historicamente relacionados a grandes epidemias de doenças humanas, tais como a malária, a febre amarela, o tifo e a peste (LOUNIBOS, 2002). As doenças que possuem mosquitos como vetores são em sua maioria endêmicas e milhões de pessoas em todo o mundo são infectadas anualmente por patógenos veiculados por mosquitos da família Culicidae (OMS, 2009).

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linneaus) é o principal vetor da dengue e da febre amarela urbana. A dengue coloca em risco a saúde de 2,5 a 3 bilhões de pessoas que habitam as regiões urbanas e suburbanas de países onde existe o mosquito (OMS, 2009).

O mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) é o vetor secundário do vírus da dengue e tem mantido a prevalência da doença nas regiões asiáticas, de onde recebe o nome de “Tigre Asiático”. Sua distribuição original incluía o sudeste do Continente Asiático, sendo considerado autóctone das regiões Oriental, Australásica, Oceania e Paleártica. Posteriormente disseminou-se para outras localidades, como as Américas, África, Europa Meridional e algumas ilhas do Pacífico e Havaí. (HUGHES ; PORTER, 1956).

A malária é causada por um protozoário distribuído em quatro espécies do gênero *Plasmodium*. Os microorganismos parasitam exclusivamente os eritrócitos humanos e são transmitidos por culicídeos do gênero *Anopheles*. A doença possui distribuição mundial, contudo apresentando maior incidência em países situados entre as latitudes 27°23’ Norte e Sul. Fazem exceção os países do Oriente Médio, particularmente o Afeganistão, o norte da Índia e algumas regiões do sul da China onde a incidência da malária é residual (CAMARGO, 2008).

Mosquitos do gênero *Culex* são os principais vetores de patógenos causadores de doenças distribuídas em todo o mundo, incluindo os nematóides *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*, agentes etiológico de filariose, além de arboviroses como a Encefalite de Saint Louis, Encefalite Japonesa, Encefalite Equina Venezuelana, Encefalite Equina Ocidental e Vírus do Nilo Ocidental (LEAL *et al.*, 2008). Estima-se que mais de um bilhão de pessoas estejam sob risco de contrair uma das filárias. Mais de 120 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, cerca de 50 mil delas no Brasil, e aproximadamente 40 milhões de indivíduos estão incapacitados ou deformados pelas elefantíases (CAMARGO, 2008).

O controle de doenças transmitidas por vetores necessita um entendimento detalhado dos fatores que envolvem sua transmissão, incluindo o estudo de seu habitat e as interações do inseto com o ambiente. A proliferação descontrolada das diferentes espécies de mosquitos nos grandes centros urbanos ocorre principalmente devido ao elevado número de criadouros aquáticos naturais e artificiais existentes no meio ambiente. Sinergicamente tem-se o desenvolvimento da resistência genética dos insetos aos inseticidas químicos e biológicos utilizados indiscriminadamente ao longo dos anos. É consenso entre pesquisadores, autoridades de saúde e gestores públicos a necessidade do desenvolvimento de programas de controle que utilizem tecnologias que limitam ou diminuem o uso de inseticidas. Torna-se então imprescindível o desenvolvimento de estratégias de controle eficientes, com adequado monitoramento dos vetores e medidas de combate racionalizadas para a necessidade de cada região.

A utilização de semioquímicos de oviposição tem se apresentado como uma ferramenta sustentável para o monitoramento e controle de Culicídeos, uma vez que a seleção de locais adequados pelas fêmeas de mosquito para depositarem seus ovos é um fator chave para a sobrevivência das formas imaturas (ovos e larvas). Informações químicas, visuais, olfativas e táteis influenciam na escolha dos sítios adequados para a oviposição e diversos pesquisadores vêm se esforçando no desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias que utilizam os semioquímicos tanto para a captura de insetos adultos, quanto para impedir o desenvolvimento das fases imaturas (NAVARRO-SILVA *et al.*, 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os membros da família Culicidae são taxonomicamente classificados como pertencentes ao FILO Arthropoda (pés articulados), CLASSE Insecta, ORDEM Diptera (duas asas), SUBORDEM Nematocera, FAMÍLIA Culicidae. Popularmente chamados de mosquitos ou pernilongos, reconhece-se a existência de cerca de 3.600 espécies, distribuídas por aproximadamente 40 gêneros, sendo 27% deles encontrados apenas na região Neotropical (FORATTINI, 1996). Possui distribuição mundial, desde o Ártico até os mais remotos oásis do deserto e podem ser encontrados entre altitudes de 5500m acima e 1250 abaixo do nível do mar, com ausência apenas na Antártida e em algumas ilhas (LOZOVEI, 2001).

Existem cerca de 500 espécies descritas no Brasil, com aproximadamente 20 sendo de importância médico-veterinária. O processo de urbanização descontrolado exerce grande influência sobre a domiciliação de insetos devido ao grande número de criadouros artificiais formados, tornando-se inevitável o surgimento e endemicidade de doenças nas regiões onde o inseto se adapta ao ambiente humano (TAIPE-LAGOS ; NATAL, 2003).

Os Culicidae são os principais insetos com importância na saúde pública devido principalmente ao seu hábito hematófago, tornando-os excelentes veiculadores de agentes etiológicos de graves enfermidades. Doenças de alta mortalidade e/ou morbidade como a malária, dengue, febre amarela, filariose linfática e diversas arboviroses são primariamente ou exclusivamente transmitidas por eles, tornando o combate aos insetos uma medida de Saúde Pública de extrema importância e urgência (MORSE, 1995).

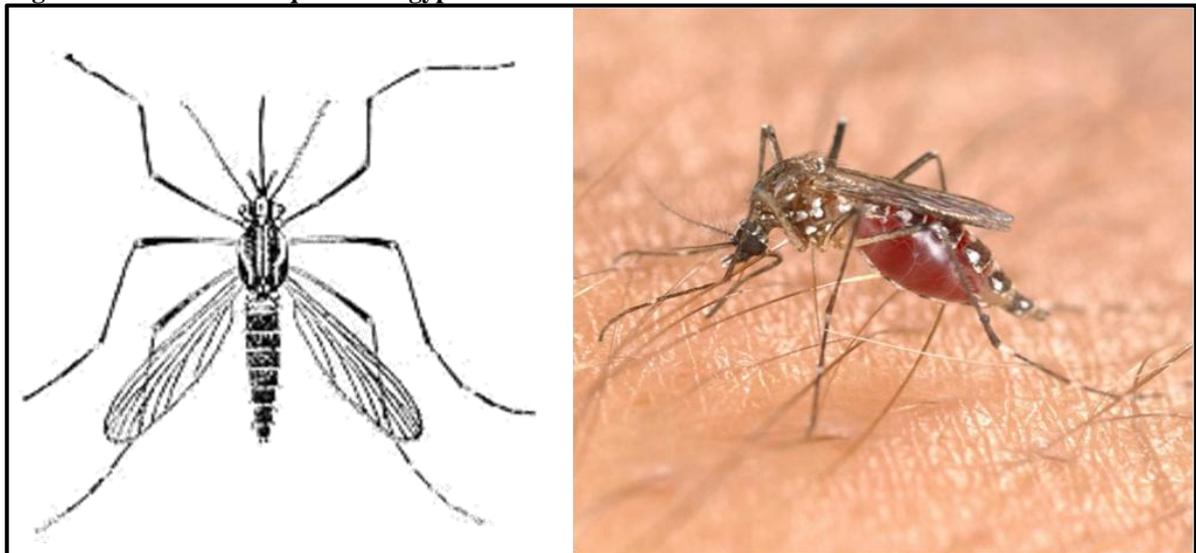
No Brasil destacam-se como vetores de doenças os mosquitos do gênero *Aedes*, representados principalmente pelo *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e *Culex*, onde se destaca o *Culex quinquefasciatus*, uma vez que a ocorrência de infecções de malária existe somente na região da Bacia Amazônica (SILVEIRA ; REZENDE, 2001).

2.1 *Aedes aegypti* – O Principal Vetor da Dengue e da Febre Amarela

Provavelmente oriundo da África, região da Etiópia, o *A. aegypti* foi introduzido no continente americano ainda no tempo da colonização, por meio das embarcações provenientes daquele continente. Distribuiu-se nas regiões tropicais e subtropicais a 45° de latitude Norte e 35° de latitude Sul, não se adaptando bem a grandes altitudes. A espécie é altamente antropofílica e domiciliada, encontrando no ambiente urbano um local ideal para manutenção do seu ciclo de vida. Possui hábitos alimentares diurnos e deposita seus ovos nas paredes de recipientes naturais e/ou artificiais no domicílio e peridomicílio. Fatores como a temperatura elevada e a precipitação pluviométrica abundante possuem influência importante na densidade populacional desse vetor (GADELHA ; TODA, 1985).

A forma adulta alada apresenta tórax enegrecido, freqüentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateada. A principal característica da espécie é uma nítida faixa curva, branco-prateada de cada lado do tórax (mesonoto) e outra mais fina, reta, longitudinal, central, as quais formam a figura de uma lira (Figura 1) (FORATINI, 1996; NEVES *et al.*, 2005).

Figura 1: Fêmea do mosquito *A. aegypti*.



Fonte: Rothamsted Research, 2009

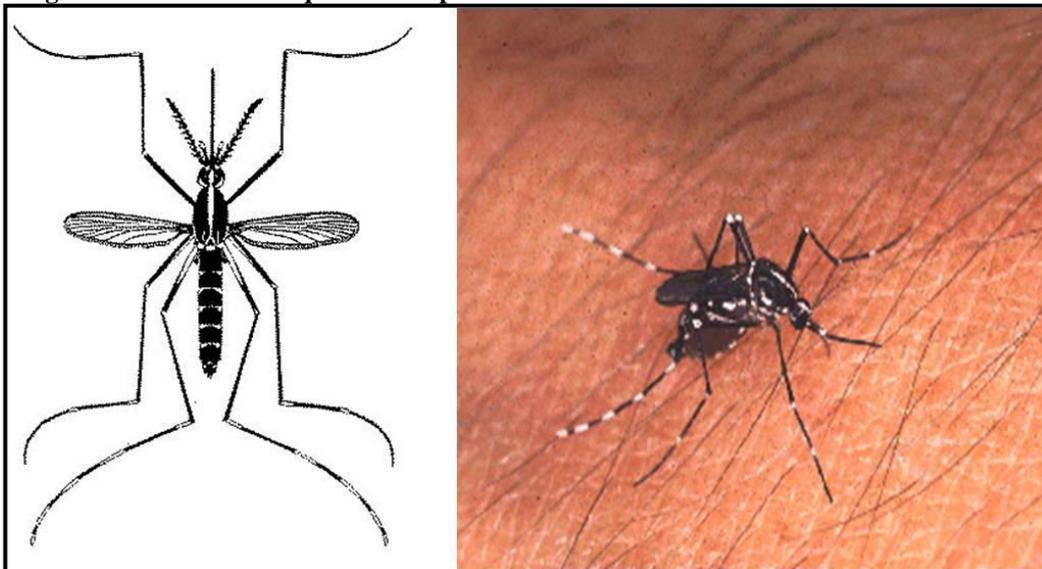
A fêmea do mosquito possui hábito alimentar contínuo, podendo realizar a hematofagia em diversos hospedeiros durante um único ciclo gonotrópico, período compreendido entre o primeiro repasto sanguíneo e a oviposição. A fêmea estará apta a iniciar um novo ciclo uma hora após ter completado o anterior (MACKENZIE, *et al.*, 2004).

Vários autores vêm estudando o comportamento do *A. aegypti* em laboratório a fim de definir seu padrão de oviposição e inferir o conhecimento obtido com a elucidação dos aspectos biológicos e ecológicos do vetor nos métodos de monitoramento e controle da espécie. Fatores exógenos como a chuva, umidade relativa do ar, temperatura e velocidade do vento influenciam no comportamento apresentado por fêmeas em criadouros naturais. A seleção do sítio de oviposição é feita através de uma combinação de estímulos químicos, representado pelos semioquímicos, e físicos, como o comprimento de onda e a intensidade de luz refletida na água ou superfície, absorção de água e aspereza da superfície (GOMES *et al.*, 2006).

2.2 *Aedes albopictus* – O Tigre Asiático

O *A. albopictus* (Figura 2) é considerado o responsável pela manutenção de epidemias de dengue e o principal vetor do arbovírus Chikungunya na região asiática. O mosquito é de origem asiática e foi descrito pela primeira vez na Índia, de onde dispersou-se para quase todos os países da região de áreas temperadas e tropicais (TOWNSON ; NATHAN, 2008).

Figura 2: Fêmea do mosquito *A.albopictus*.



Fonte: EcoAccess, disponível em: <http://www.ibiblio.org/ecoaccess/>

A espécie é morfologicamente semelhante ao *A. aegypti*, distinguindo-se deste por apresentar apenas uma linha longitudinal no tórax e geralmente coloração mais escura. Embora também seja encontrado em criadouros artificiais, o *A. albopictus* prefere o habitat silvestre, como buracos em árvores, axilas de folhas, internódios de bambus e cascas de coco. Em áreas urbanas é mais frequentemente encontrado no peridomicílio, como em jardins,

embora seja com menor frequência encontrado colonizando o domicílio em recipientes artificiais, como plástico e vidro (BRAGA ; VALLE, 2007).

Apesar da ocorrência de alguns casos alóctones, o primeiro registro que se tem do *A. albopictus* em habitat natural nas Américas data de agosto de 1985, no estado do Texas, Estados Unidos (SPRENGER ; WUTHIRANYAGOOOL, 1986). No Brasil foi assinalado pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro, em junho de 1986 (FORATTINI, 1986). Atualmente entre os estados brasileiros, apenas seis não notificaram em seu território a presença de *A. albopictus*: Amapá, Roraima, Acre, Tocantins, Piauí e Sergipe (MARTINS *et al.*, 2006).

A rápida dispersão dessa espécie, juntamente a fácil adaptação a novos habitats e hábitos alimentares envolvendo mamíferos, fez com que pesquisadores considerassem sobre a importância do mosquito na transmissão da dengue e da febre amarela nas Américas. Além disso, foi mostrado em laboratório que o *A. albopictus* possui competência vetora para transmitir outras 20 arboviroses, incluídos em três famílias diferentes, e filarias da espécie *Dirofilaria immitis* (MITCHELL, 1991; MOORE ; MITCHELL, 1997).

A capacidade de colonização deste mosquito em ambientes urbanos, rurais e silvestres, pode incluir o *A. albopictus* em um ciclo de transmissão que as espécies de mosquitos silvestres brasileiras não participavam, tornando-se uma ponte entre os ciclos urbanos e silvestres da febre amarela e outras arboviroses no Brasil (CONSOLI ; OLIVEIRA, 1994).

2.3 *Culex quinquefasciatus* – O Mosquito Doméstico do Sul

O mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) (Figura 3) é um dos principais mosquitos de importância na Saúde Pública e com considerável importância na sanidade animal. É vetor de diversas arboviroses como a Encefalite do Nilo Ocidental, Encefalite Equina Venezuelana, Encefalite Japonesa, Encefalite de Saint Louis, Encefalite Equina do Leste e orthobunyavirus Oropouche (FIGUEIREDO, 2007; LEAL *et al.*, 2008). No Brasil é o principal vetor da Filariose Bancroftiana, doença que no país tem como agente etiológico o nematóide *Wuchereria bancrofti*, parasita que infecta os vasos linfáticos do hospedeiro. Atualmente a doença apresenta distribuição geográfica focal, atingindo a periferia de núcleos urbanos situados em regiões úmidas e quentes, como Maceió-AL, Recife-PE e Belém-PA (BRASIL, 2004; NEVES *et al.*, 2005).

Figura 3: Fêmea do mosquito *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: CDC, disponível em: <http://www.cdc.gov/>

O mosquito é holometábolo, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva (quatro estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e mosquito adulto. Os ovos possuem contorno oval ou elíptico e são simétricos dando origem as larvas em um período de dois a quatro dias. Após cinco a sete dias a larva de quarto estágio (L4) se transforma em pupa e em aproximadamente três dias ocorre à transição para a fase alada adulta. O adulto voa então até um abrigo, tais como buracos, troncos de árvores, pontes e esgotos. Inicialmente o inseto alimenta-se de açúcares e néctares de plantas e somente após a fecundação é que as fêmeas realizam o hematofagismo. Vive de um a dois meses no verão e até seis meses no inverno em diapausa, podendo essa sobrevivência ser diminuída quando o mosquito encontra-se infectado por alguma filaria. (FORATTINI, 1993; NEVES, 2005).

A presença maciça do mosquito em regiões com precário ou nenhum saneamento básico também afeta a vida social da população. O incômodo causado pelos ruídos do mosquito *C. quinquefasciatus* e suas picadas à noite, que podem causar reações alérgicas, associados à abundância populacional do inseto, dificultam a vida das populações atingidas, constituindo-se em causa de diminuição da qualidade de vida, desvalorização econômica de imóveis situados em regiões com alta densidade do inseto, prejuízos à criação de animais, bem como redução na eficiência do trabalho (CONSOLI ; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

O controle do mosquito poderia ser dado através da eliminação dos locais de criação, com o melhoramento das instalações sanitárias, uma vez que o sítio predileto de oviposição do mosquito são águas poluídas, ricas em materiais orgânicos. A precariedade no saneamento

básico e infra-estrutura nas habitações faz com que o método mais utilizado seja o controle químico, onde são utilizados diversos inseticidas sintéticos como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. O uso indiscriminado desses produtos tem provocado o aparecimento de resistências a vários grupos desses compostos por parte dos mosquitos, além de contaminação ambiental (CAMPOS ; ANDRADE, 2003).

2.4 Medidas de Controle Vetorial e Resistência a Inseticidas

Há registros de práticas de controle de insetos há mais de 2.000 anos na China, onde consistiam basicamente em medidas de controle biológico direcionadas ao combate de pragas agrícolas. No fim do século XIX, com a descoberta da transmissão de doenças através de insetos e outros artrópodes e a inexistência de vacinas ou medicamentos efetivos contra elas, o controle dos vetores consistia na principal medida para evitar as infecções. Atualmente muitas doenças possuem vacinas eficazes, como a febre amarela, ou com medicamentos geralmente eficientes, no caso da malária. Entretanto o controle do vetor ainda é imprescindível para a prevenção de diversas doenças, entre as quais a dengue é o melhor exemplo (BRAGA ; VALLE, 2007).

O controle de vetores em Saúde Pública tem como objetivo principal prevenir a infecção mediante o bloqueio ou a redução da transmissão do patógeno através do manejo dos problemas existentes e sua prevenção, como surtos, epidemias, alta mortalidade e alta morbidade e redução dos fatores de risco ambiental da transmissão. O gerenciamento ambiental abriga as mais efetivas medidas de controle de vetores, como planejamento, organização, realização e monitoramento das atividades que visam modificar ou manipular os fatores de risco ambiental. A participação da população é imprescindível neste processo, uma vez que será ela quem irá atuar diretamente na diminuição do número de criadouros e consequente diminuição de insetos adultos no ambiente (BRAGA ; VALLE, 2007).

2.4.1 Controle Físico

Os programas de controle de vetores preconizam a utilização de repelentes e mosquiteiros como medidas de controle físico para evitar o contato dos vetores com o ser humano, já que o indivíduo fica mais suscetível à picada durante o sono. A aplicação de óleos ou película monomolecular que cobrem a superfície da água, sufocando as larvas, é um dos métodos de controle, mas por serem materiais biodegradáveis necessitam de repetidas aplicações, tornando-se uma medida que utiliza uma grande mão-de-obra. *C. quinquefasciatus*

mostraram-se suscetíveis a contas de poliestireno capazes de evitar que o mosquito deposite os ovos onde são aplicados e possui como vantagem não ser biodegradável (MBOERA, 1999). A utilização de água quente em possíveis criadouros também se apresenta como alternativa para *A. aegypti*, já que 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).

2.4.2 Controle Biológico

O controle biológico de mosquitos utiliza métodos que introduzem organismos que se alimentam, parasitam, competem com ou reduzem o número de larvas e pupas nos criadouros dos mosquitos. Peixes do gênero *Gambusia sp.* apresentaram-se bastante eficazes e são os mais recomendados por sua fácil obtenção e manutenção, especialmente para bebedouros de grandes animais, fossos de elevador de obras, espelhos d'água/fontes ornamentais, piscinas abandonadas e depósitos de água não potável (DONALÍSIO ; GLASSER, 2002).

Patógenos como os fungos *Langenedium giganteum* e *Metharizium anisopliae* e parasitas como os nematódeos *Romanomermis culicivorax* e *Romanomermis iyengari* também são empregados. Bactérias como *Bacillus thuringiensis* H-14 (BTI) e *Bacillus sphaericus* são específicos para o controle de larvas de culicídeos, sendo o BTI mais eficaz contra *A. aegypti*. Sua ação tóxica é causada por uma toxina presente no corpo paraesporal do bacilo. Esse biocida vem sendo utilizado no Brasil em substituição ao Temephós em regiões onde foi detectada a resistência desse mosquito ao organofosforado (FUNASA, 2001; LACEY ; UNDEEN, 1986).

Hormônios miméticos (reguladores de crescimento “sintéticos”) têm mostrado bons resultados para controle de larvas de culicídeos. Atualmente, estão disponíveis no mercado formulações de metopreno, diflubenzurona, piripropixifeno e triflumuron, sendo que para o *A. aegypti*, o primeiro é o mais utilizado. A incorporação do seu uso em programas de controle desse vetor exige adequação na metodologia de vigilância entomológica para estimar indicadores de densidade larvária (OMS, 1997¹).

Esse tipo de controle possui como vantagem não contaminar o ambiente com compostos químicos, especificidade contra os organismos alvos e a dispersão de alguns agentes dentro de locais que não seriam facilmente tratados com outras medidas. As desvantagens do controle biológico incluem as elevadas despesas com a obtenção dos organismos, dificuldade na sua aplicação e utilidade limitada a ambientes aquáticos onde a

temperatura, pH e poluição orgânica não possa exceder a atividade dos agentes, além de que são efetivos apenas contra as formas imaturas do mosquito (OMS, 1997²).

2.4.3 Controle químico

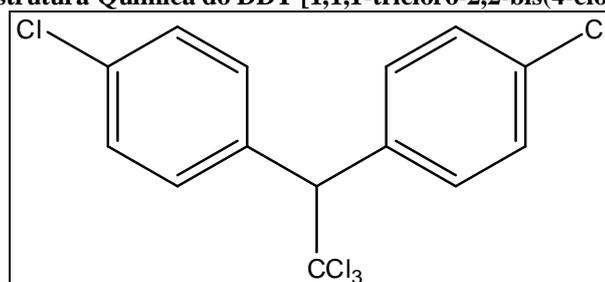
A metodologia mais empregada no controle de vetores em saúde pública é a utilização de inseticidas tanto de origem orgânica, quanto de origem inorgânica. Uma das grandes conquistas no combate a doenças transmitidas por vetores no século XX foi o desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por um longo tempo, os chamados de ação residual (ROSE, 2001). Dentre estes inseticidas, os principais compostos utilizados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores pertencem, principalmente, aos grupos dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, todos eles atuando sobre o sistema nervoso central dos insetos (RATHBURN Jr., 1985).

2.4.3.a Organoclorados

O primeiro inseticida deste tipo empregado foi o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) (Figura 4), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial. O composto quando aplicado nas paredes e tetos das casas permanecia ativo contra os insetos por vários meses (ROZENDAAL, 1997). O DDT foi primeiramente sintetizado pelo sueco Paul Herman Müller, em 1939, sendo adotado no Brasil em 1947 para o combate do *A. aegypti*, tornando-se posteriormente o principal método nos programas de erradicação desta espécie nas Américas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999; SOLOMONS ; FRYHLE, 2008).

O DDT atua nos canais de sódio, impedindo a transmissão normal de impulsos nervosos através dos axônios de insetos e mamíferos. Seu efeito é inversamente proporcional a temperatura, sendo mais tóxico aos insetos em temperaturas mais frias (BRAGA ; VALLE, 2007).

Figura 4: Estrutura Química do DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano]



Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro organoclorado utilizado no combate a vetores em saúde pública é o Benzenoexacloro (BHC), pertencente ao grupo dos hexaclorocicloexanos (HCH), comercializado com o nome de lindano, agindo de forma semelhante ao DDT (WARE ; WHITACRE, 2004).

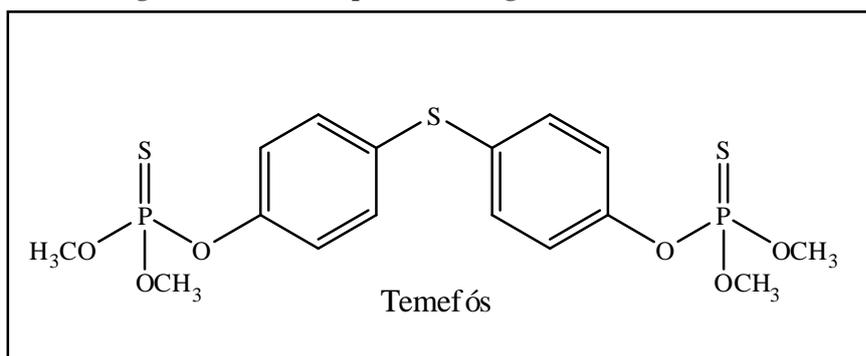
Embora tenham sido empregados largamente nos programas de controle da malária, os organoclorados tiveram seu uso interrompido no combate a pragas agrícolas, chegando a ser proibido em diversos países devido a sua persistência no ambiente e ao acúmulo em tecido de humanos e animais. O DDT continua indicado pela OMS para o combate de vetores em Saúde Pública, sendo utilizado principalmente em países que não dispõem de recursos para comprar outros inseticidas mais caros. (BRAGA ; VALLE, 2007).

2.4.3.b Organofosforados

Classificam-se como organofosforado todos os inseticidas que contém fósforo em suas moléculas. Descobertos posteriormente aos organoclorados são divididos em três subgrupos: Os alifáticos (malation, vapon, vidrin, etc.); os derivados de fenil (etil e metil paration, fenitrothion, etc.); e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil, etc.). por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos, seus usos são mais recomendados em saúde pública do que os organoclorados. No entanto devido as suas instabilidades químicas são necessárias renovações periódicas de suas aplicações e são mais tóxicas para os vertebrados, mesmo em doses relativamente baixas (WARE ; WHITACRE, 2004).

Os organofosforados atuam inibindo irreversivelmente a Acetilcolinesterase, enzima responsável pela retirada da acetilcolina nas sinapses neuronais. Conseqüentemente, o acúmulo desse neurotransmissor impede a interrupção da propagação do impulso elétrico. Este processo resulta na paralisia e morte do inseto (BRAGA ; VALLE, 2007).

No Brasil o principal larvicida empregado no combate ao *A. aegypti* é um organofosforado, o Temefós (Abate®) (Figura 5). Sua formulação é composta de 1% do princípio ativo adsorvido em grãos de areia, utilizando na concentração de 1 ppm do produto, o qual pode ser aplicado em água para o consumo humano. No entanto, a resistência do mosquito *A. aegypti* ao Temefós já foi documentada por pesquisadores em alguns municípios dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (LIMA *et al.*, 2006).

Figura 5: Estrutura química do organofosforado Temefós

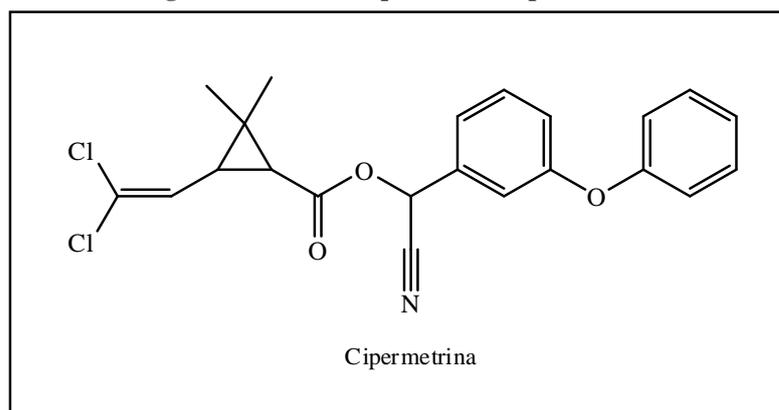
Fonte: Elaborado pelo autor.

2.4.3.c Carbamatos

Inseticidas derivados do ácido carbâmico, os carbamatos tiveram sua comercialização iniciada por volta dos anos 1960, sendo o mais utilizado o carbaril. Age nos insetos também inibindo a Acetilcolinesterase, mas nesse caso a reação envolvida é a carbamilação e é reversível. Apesar de ter ação letal rápida nos insetos, apresenta curto poder residual (WARE; WHITACRE, 2004).

2.4.3.d Piretróides

Inseticidas à base de piretróides são utilizados no Brasil através da técnica de aplicação denominada “ultra-baixo volume”, popularmente conhecido como fumacê. Apesar da eficiência deste método estar condicionada às condições climáticas, devido ao aceleração operacional e diminuição dos custos ainda é amplamente utilizado. O principal composto dessa classe empregado é a cipermetrina na concentração final de 0,3% de princípio ativo (Figura 6) (FORATTINI, 2002). Populações de *C. quinquefasciatus* do Oeste da África apresentam resistência a piretróides (CHANDRE et al., 1998).

Figura 6: Estrutura química da cipermetrina

Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora esteja mais do que claro que o melhoramento das condições sanitárias, e consequente eliminação dos criadouros de mosquitos seja método ideal para o combate de doenças como a filariose, dengue, febre amarela e outras arboviroses, o uso de inseticidas ainda consiste em um método muito importante no combate aos mosquitos vetores.

No entanto faz-se necessário o uso racional desses compostos uma vez que as populações de mosquitos que são expostas ao tratamento com inseticidas químicos, inevitavelmente desenvolvem um mecanismo de resistência, resultante do efeito seletivo em que indivíduos suscetíveis são eliminados, enquanto os resistentes sobrevivem e transferem essa capacidade a seus descendentes. Esses mecanismos de resistência podem ser genético ou comportamental, este segundo quando o processo de seleção se dá entre os indivíduos que possuem aptidão para evitar total ou parcialmente o contato com doses letais (OMS, 1992).

Mesmo a utilização de inseticidas orgânicos vem mostrando o desenvolvimento de resistência após anos de uso contínuo. Como consequência as atividades de controle necessitam da utilização de novos inseticidas ou sua substituição por métodos físicos e/ou biológicos por maior período de tempo possível.

Atualmente dois grupos de medidas são utilizados para reduzir o impacto dos inseticidas na indução de resistência pelos mosquitos: a implementação de estratégias de controle integrado que restringe o máximo possível o uso de métodos químicos de controle vetorial; e o planejamento do componente de controle químico da estratégia empregando metodologias que retardam o processo de resistência, como o uso de métodos sinergistas, aplicação de inseticida em mosaico e o uso de misturas ou rotações de inseticidas (DONALÍSIO ; GLASSER, 2002).

2.5 Comportamento e Seleção do Sítio de Oviposição

Entre as novas tecnologias, o uso de atraentes naturais e feromônios têm ganhado destaque devido às vantagens de sua aplicação nos programas de controle e de vigilância de mosquitos. Essa expectativa tornou-se mais animadora com o sucesso ocorrido no Zimbábue com a mosca tse-tsé, vetor da doença-do-sono. Até meados dos anos 80 o combate era efetuado através da pulverização de endosulfan ou deltametrina no ar ou aplicação do DDT no solo. Em 1991 o controle foi alcançado com a utilização de atraentes em conjunto com inseticidas (KLINE, 1994).

Os semioquímicos são substâncias que influenciam a atividade de oviposição em mosquitos e vêm ganhando destaque devido à importância crucial da seleção dos sítios de oviposição para a sobrevivência e dinâmica populacional das espécies, com inúmeros pesquisadores voltando trabalhos para a identificação da estrutura molecular e elucidação da ação dessas substâncias no comportamento dos insetos (McCALL ; CAMERON, 1995). Na categoria dos semioquímicos incluem-se os infoquímicos, toxinas e nutrientes. Os Infoquímicos são substâncias que levam informações ou sugestões químicas para uma determinada interação entre organismos, ativando uma resposta comportamental ou fisiológica no indivíduo receptor. Os infoquímicos são subdivididos em aleloquímicos, quando consiste em comunicação interespecífica, e feromônios, quando ocorre uma comunicação intraespecífica (VILELA ; DELLA LUCIA, 2001).

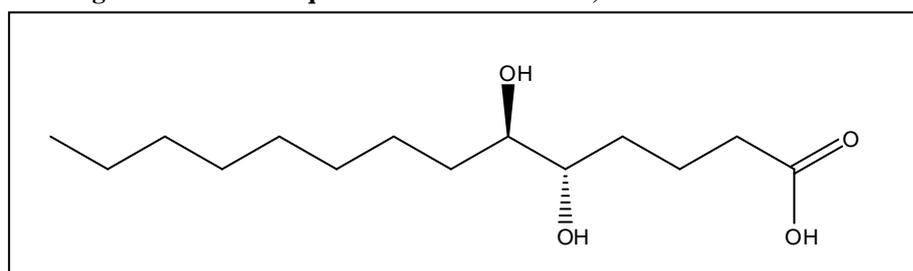
Os semioquímicos encontram-se dissolvidos em águas de criadouros naturais e artificiais. Uma vez que a fêmea normalmente necessita realizar ao menos um repasto sanguíneo para adquirir o patógeno e para que ocorra a transmissão das doenças deve realizar um ciclo de oviposição, o uso de armadilhas de oviposição contendo semioquímicos atraentes, particularmente os envolvidos na mediação de oviposição de fêmeas, é uma poderosa ferramenta para o controle e monitoramento de mosquitos hematófagos vetores de doenças tropicais (BENTLEY ; DAY, 1989).

A seleção do sítio de oviposição consiste em uma etapa essencial do ciclo de vida de todas as espécies de mosquitos e inicia-se com a recepção de estímulos ambientais (visual, táteis e olfatórios) que podem atrair ou repelir, limitando as possibilidades de encontrar um local adequado para a oviposição (BENTLEY ; DAY, 1989). O comportamento de oviposição é influenciado por uma série de interações entre fatores físicos, fisiológicos e químicos.

A percepção destes elementos ocorre devido ao complexo sistema sensorial dos insetos composto por quimiorreceptores, mecanorreceptores, higrorreceptores e termorreceptores. Este sistema tem a capacidade de detectar uma larga variedade de compostos voláteis liberados no ambiente que informam os aspectos qualitativos, tais como fonte de alimento, presença de parceiros sexuais ou sítios de oviposição adequados (MORDUE, 2003)

Os primeiros cientistas a levantarem a hipótese onde um feromônio poderia estimular a oviposição em mosquitos foram Hudson e McIntock (1967). Posteriormente, Osgood (1971) estudou o comportamento de fêmeas grávidas de *Culex tarsalis* Coquillet que apresentou uma maior predileção para depositar seus ovos em água contendo larvas da mesma espécie quando comparada com água destilada. Starrat e Osgood, (1972) detectaram a presença de uma mistura de 1,3-digliceraldeídos utilizando cromatografia gás-líquida em extrato de ovos de *C. tarsalis*. A metanólise da mistura, catalisada por ácido, produziu ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo o ácido *eritro-5,6-diidroxixadecanóico* o que apresentou maior atividade (Figura 7) (NAVARRO-SILVA *et al.*, 2009).

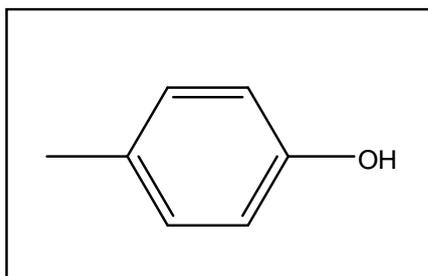
Figura 7: Estrutura química do ácido eritro-5,6-diidroxixadecanóico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Kalpage e Brust (1973) mostraram em bioensaios de laboratório que *Aedes atropalpus* apresentavam preferência para ovipor em água utilizada como criadouro de larvas e pupas da mesma espécie. Bentley e colaboradores (1979) identificaram através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) o *p*-cresol presente em infusão de madeira atraente para fêmeas de *Aedes triseratus* (Say) (Figura 8).

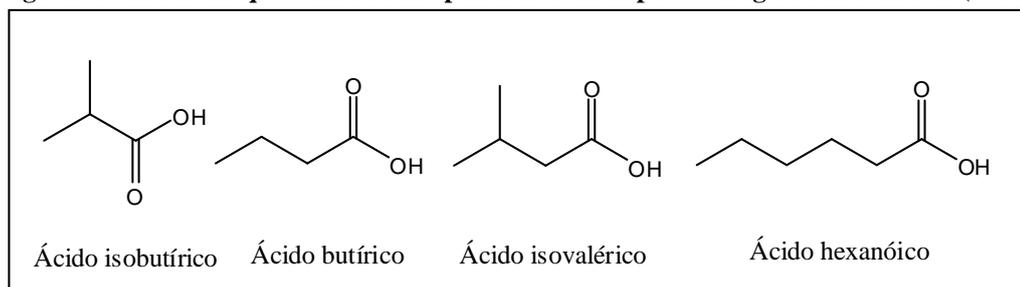
Figura 8: Estrutura química do p-cresol identificado em infusão de madeira por Bentley e colaboradores (1979).



Fonte: Elaborado pelo autor.

HWANG et al. (1980) provaram o efeito repelente dos ácidos carboxílicos isobutírico, butírico, isovalérico e hexanóico na oviposição de *C. quinquefasciatus* (Figura 9). Hwang *et al.* (1982) avaliaram as ações repelentes e atrativas de uma série de ácidos carboxílicos, de ácido pentanóico ao ácido tridecanóico, em diversas concentrações para mosquitos das espécies *C. quinquefasciatus* e *Culex. tarsalis* (Coquillet) e *A. aegypti*.

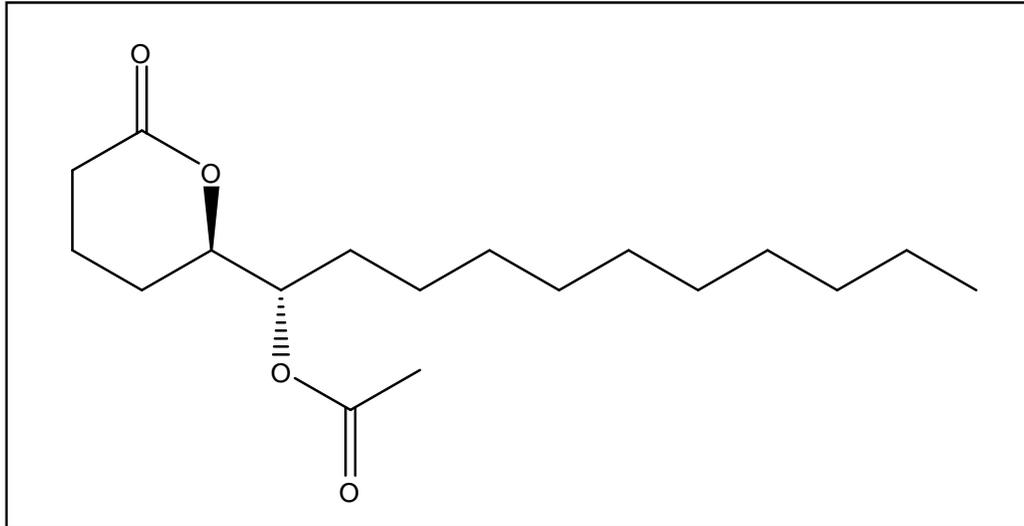
Figura 9: Estruturas químicas dos compostos avaliados por Hwang e colaboradores (1980).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Laurence ; Pickett (1982) com a dedução de que a atração de mosquitos do gênero *Culex* poderia ocorrer devido a gotículas presentes no ápice de ovos, identificaram por GC-MS o composto *eritro-6-acetoxi-5-hexadecanolida* (Figura 10) reforçando a idéia da existência de feromônio de oviposição de mosquitos.

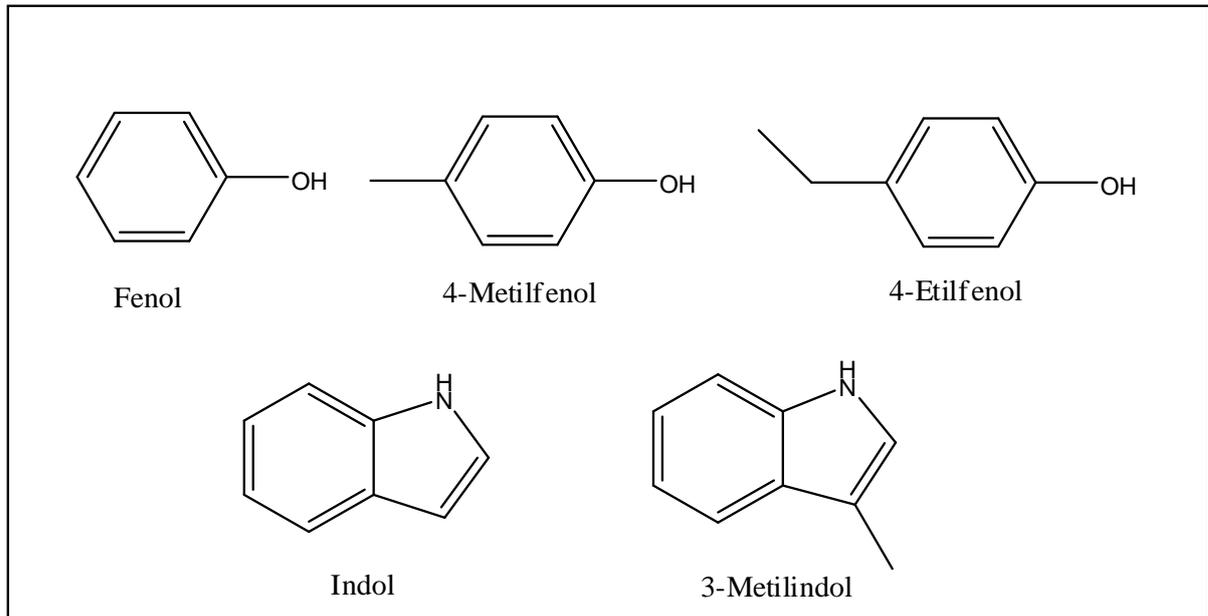
Figura 10: Estrutura química do eritro-6-acetoxi-5-hexadecanolida identificada por Laurence ; Pickett (1982).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Millar et al. (1992) identificaram os compostos: fenol, 4-metilfenol, 4-etilfenol, indol e 3-metilindol (Figura 11) em infusão de grama bermuda (*Cynodon dactylon*) atraente para *C. quinquefasciatus*. Dentre essas substâncias o 3-metilindol foi o único a apresentar atividade de oviposição satisfatória nas concentrações testadas (1 e 10 mg/L). A combinação das cinco substâncias foi a que apresentou o melhor resultado, sugerindo a ocorrência de um sinergismo entre elas.

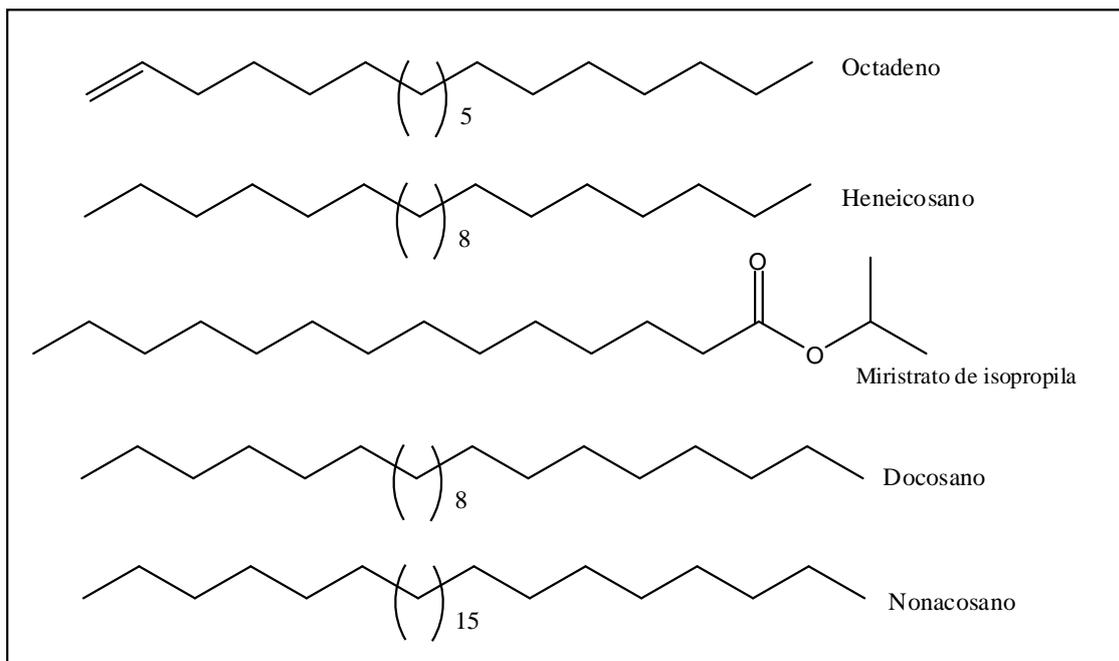
Figura 11: Estruturas químicas das substâncias identificadas em infusão de grama bermuda por Millar e colaboradores (1992).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Mendki e colaboradores (2000) identificaram cinco compostos como atraentes de oviposição de *A. aegypti* presente em água de larvas da espécie. Esses compostos foram o octadeno, miristrato de isopropila, heneicosano, docosano e nonacosano, sendo o heneicosano o que mostrou maior atratividade entre eles (Figura 12).

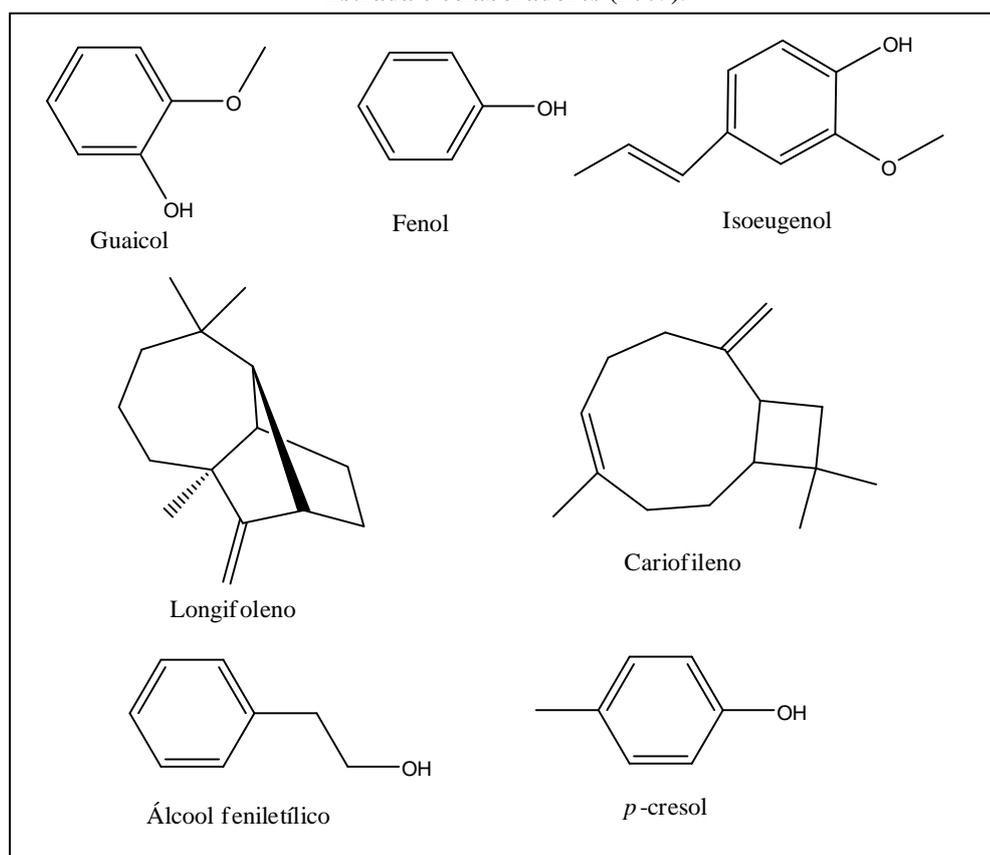
Figura 12: Estruturas químicas dos feromônios identificados em água de larvas de *Aedes aegypti* por Mendki e colaboradores (2000).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Torres-Estrada e colaboradores (2005) observaram o papel de algumas plantas no comportamento de oviposição de *Anopheles albimanus* Wiedemman, tais como *Cynodonton dactylon*, *Jouvea straminea*, *Fimbristylis spadicea*, *Ceratophyllum demersum* e *Brachiaria mutica*. Não houve diferença estatística significativa na atratividade de oviposição dos mosquitos quando realizado bioensaios com os extratos das plantas e houve efeito repelente com extratos em alta concentração. Os autores identificaram as substâncias presentes nos extratos como guaicol, fenol, isoeugenol, longifoleno, cariofileno, álcool feniletílico e *p*-cresol, entretanto não foram determinadas suas atividades biológicas separadamente (Figura 13).

Figura 13: Estrutura química dos compostos presentes em extrato de plantas identificados por Torres-Estrada e colaboradores (2005).



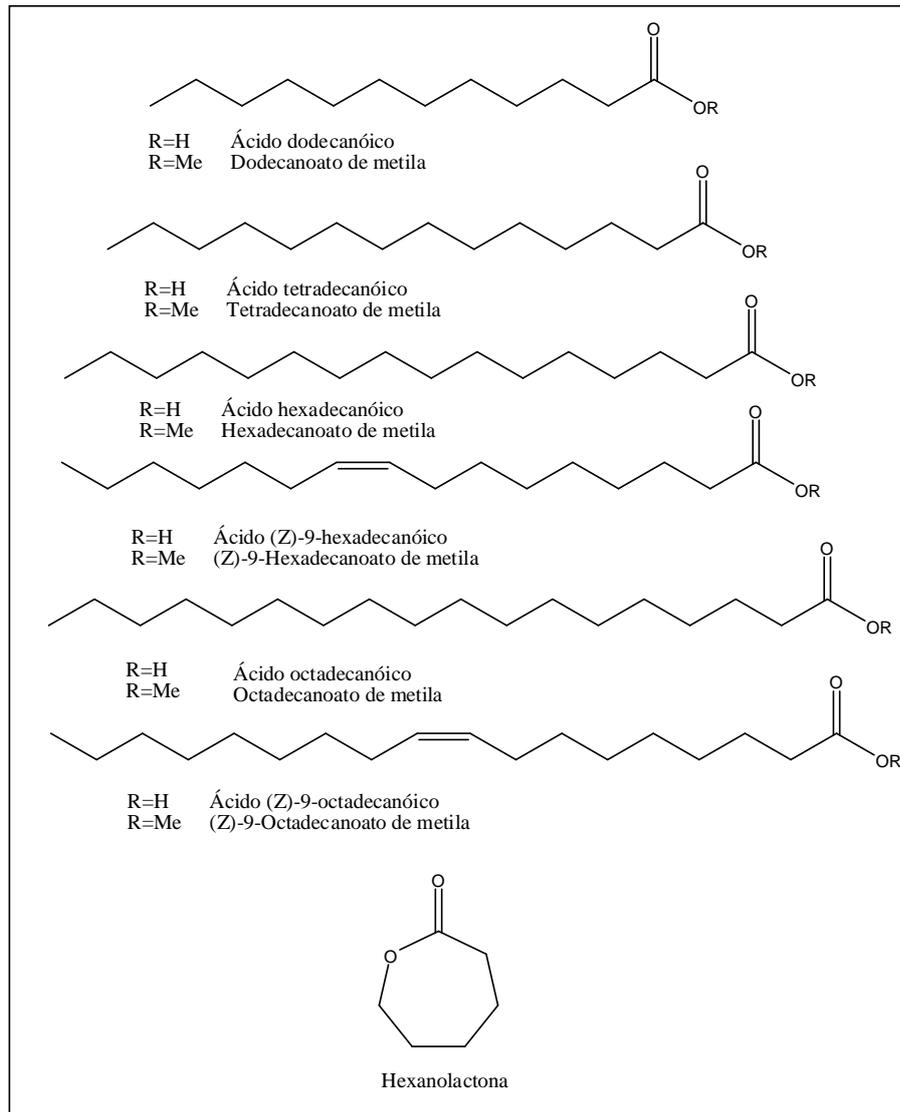
Fonte: Elaborado pelo autor.

Puri e colaboradores (2006) estudaram as respostas comportamentais de oviposição e as respostas eletrofisiológicas da fêmea do mosquito *C. quinquefasciatus* em relação a algumas substâncias exaladas pela pele humana. Três grupos destas substâncias que proporcionam um meio de orientar os mosquitos durante o hematofagismo foram testados separadamente: ácidos carboxílicos, aldeídos e álcoois em três doses diferentes. Os resultados

das respostas eletrofisiológicas testadas nas dosagens de 0,01; 0,1 e 1,0 μ g indicaram que todos os ácidos carboxílicos, exceto o ácido tetradecanóico (C₁₄) e o ácido octadecanóico (C₁₈) foram ativos. Etilenoglicol e álcool benzílico foram ativos eletrofisiologicamente e nos bioensaios comportamentais. Entre todos os aldeídos testados, nonanal exibiu as melhores respostas eletrofisiológicas e comportamentais.

Ganesan e colaboradores (2006) relataram atividades de oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* para semioquímicos oriundo de ovos de mosquitos da mesma espécie. Através da análise por GC-MS foram identificados os ácidos dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico, (Z)-9-octadecanóico, octadecanóico e (Z)-9-octadecenóico e seus ésteres metílicos, além da 6-hexanolactona (Figura 14). Dentre os compostos identificados e testados, o *A. aegypti* mostrou resposta de oviposição atrativa/estimulante para os ácidos dodecanóico e (Z)-9-hexadecanóico nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm, ao passo em que todos os ésteres apresentaram efeito de oviposição inibitório/repelente.

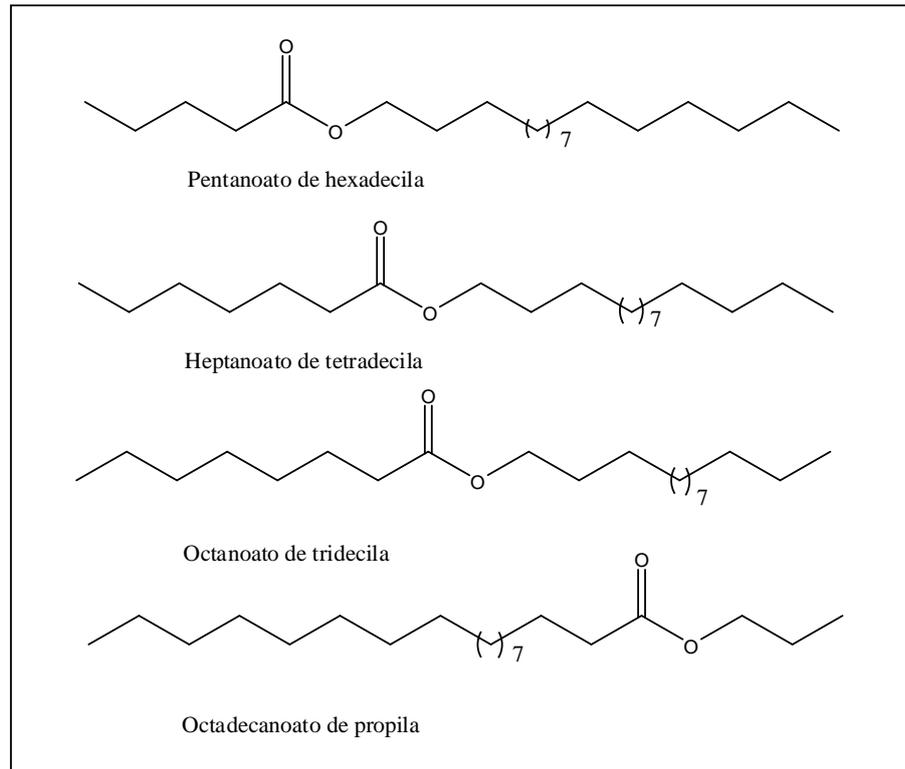
Figura 14: Estrutura química dos compostos isolados por Ganesan e colaboradores (2006) a partir de extratos de ovos de *Aedes aegypti*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sharma e colaboradores (2008) estudaram a resposta de oviposição de *A. aegypti* e *A. albopictus* para diversos ésteres de ácidos graxos de cadeias com 21 átomos de carbono. Eles observaram que o pentanoato de hexadecila, heptanoato de tetradecila e octanoato de tridecila apresentaram atividade repelente de oviposição nas duas espécies de mosquito, enquanto o octadecanoato de propila mostrou-se atrativo para *A. aegypti* (Figura 15).

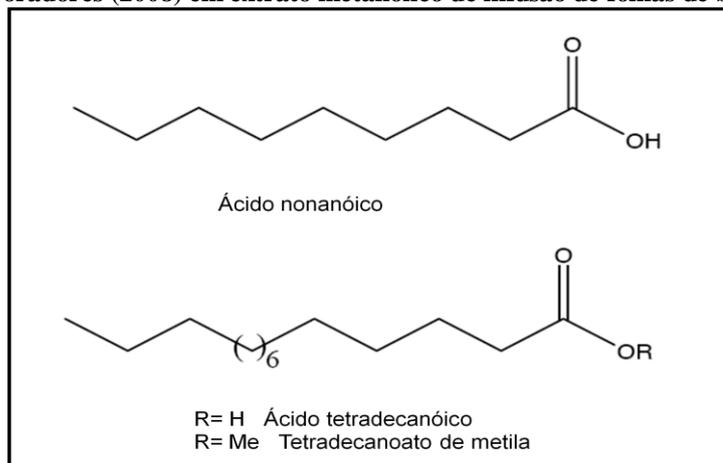
Figura 15: Estruturas químicas dos ésteres de ácido graxos estudados por Shama e colaboradores (2008) que influenciaram a atividade de oviposição de *A. aegypti*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ponnusamy e colaboradores (2008) mostraram que fêmeas de *A. aegypti* apresentavam maior oviposição em infusão de folhas de bambu devido a cairomônios estimulantes de oviposição produzidos por microorganismos. O extrato metanólico obtido de bactérias liofilizadas revelou a presença de uma mistura de ácidos carboxílicos de cadeia C₉ à C₁₈ e seus ésteres metílicos. A maioria dos ácidos graxos e dos ésteres foram inativos, contudo o ácido nonanóico, o ácido tetradecanóico e o tetradecanoato de metila induziram alta deposição de ovos, mas em uma taxa de concentração extremamente estreita.

Figura 16: Estrutura química dos compostos estimulantes de oviposição identificados por Ponnusamy e colaboradores (2008) em extrato metanólico de infusão de folhas de bambu.



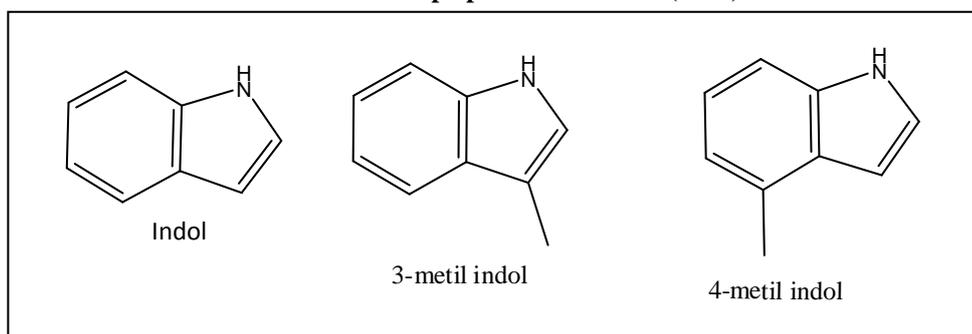
Fonte: Elaborado pelo autor.

Recentemente, Sharma e colaboradores (2009) realizaram um estudo semelhante com os ésteres de ácidos graxos de cadeia C_{21} e notaram que alguns destes compostos apresentavam atividade atrativa/estimulante na oviposição de fêmeas de *Anopheles stephensi*. As respostas dos bioensaios de oviposição com nonanoato de dodecila, undecanoato de decila, dodecanoato de nonila, hexadecanoato de pentila e octadecanoato de pentila foram dependentes da concentração, sendo o undecanoato de decila atrativo nas três concentrações testadas (0,1, 1 e 10 ppm). Em contrapartida, neste mesmo estudo os ésteres propanoato de octadecila, butanoato de heptadecila, pentanoato de hexadecila e heptanoato de tetradecila influenciaram negativamente na atividade de oviposição dos mosquitos em alguma(s) das concentrações testadas (0,1, 1 e 10 ppm).

As atividades observadas em condições de laboratório permitiram o avanço posterior em trabalhos de campo. Beehler e colaboradores (1994) foram os primeiros a realizar estudos de semioquímicos em condições reais de campo na Califórnia, EUA. Estes estudos comprovaram a eficiência do 3-metil indol como atraente para fêmeas de *C. quinquefasciatus*, *C. stigmatosoma* Dyar e *C. tarsalis*. Mboera e colaboradores (1999) também avaliaram o tempo de atividade residual do 3-metil indol para *C. quinquefasciatus*, *C. tigripes* Grandpré ; de Chamosy e *C. cinereus* Theobald. Neste estudo determinaram que o feromônio é ativo por um período de 9 dias, com conseqüente diminuição de atividade. Logo após Mboera et al. (2000a) avaliaram o comportamento de oviposição de mosquitos do gênero *Culex* usando o 3-metil indol e o feromônio sintético de oviposição (SOP) (5R,6S)-6-acetoxi-5-hexadecanolida em condições de campo na Tanzânia, concluindo que ambos intervêm na seleção de sítios de

oviposição em condições naturais. Mboera et al. (2000b) utilizou o SOP em armadilhas para capturar mosquitos adultos, confirmando assim a efetividade do feromônio e seu potencial para monitorá-los. Posteriormente, foi demonstrado por Trexler et al. (2003) que os feromônios sintéticos indol, 3-metil indol e 4-metil indol identificados como atraentes para mosquitos do gênero *Culex* não foram estatisticamente significantes quando testadas com mosquitos de outros gêneros, sugerindo que a atividade atrativa das substâncias são específicas a este gênero.

Figura 17: Estrutura química de compostos especificamente atraentes para mosquitos do gênero *Culex* testadas em campo por Trexler et al. (2003).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A utilização de armadilhas de oviposição contendo semioquímicos atraentes, além de diminuir a incidência do mosquito na região em que é utilizada, ajuda na identificação e quantificação dos insetos presentes na área, possibilitando a utilização das medidas de combate ao vetor mais adequadas. Alguns municípios brasileiros já empregam uma nova tecnologia que utiliza da combinação dessa metodologia com recursos informatizados, permitindo um monitoramento contínuo a distância da população de mosquitos onde as armadilhas são implantadas, atualização de dados de infestação imediata, como índices entomológicos e densidade populacional do vetor na área. Essas medidas reduzem gastos com mão-de-obra e deslocamento de equipes de saúde para as áreas afetadas (M.I.DENGUE, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo geral desse trabalho foi identificar possíveis atraentes de oviposição para culicídeos das espécies *A. aegypti*, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus*, vetores de arboviroses e parasitas que infectam o homem, bem como estabelecer diretrizes que auxiliem o desenvolvimento de novas estratégias tecnológicas para os programas de vigilância e controle entomológico no país.

3.2 Específicos

- Localizar sítios de oviposição artificiais específicos para as três espécies de mosquito.
- Realizar bioensaios de oviposição em laboratório com a utilização de matrizes aquosas oriundas dos sítios de oviposição naturais e artificiais.
- Isolar os atraentes e/ou estimulantes de oviposição com o uso de LLE (extração líquido-líquido), SBSE (extração por sorção com magneto de agitação) e SPE (extração em fase sólida) e realizar novos ensaios comportamentais em laboratório com os extratos obtidos.
- Identificar os atraentes e/ou estimulantes de oviposição através da utilização de equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.
- Desenvolver metodologias mais específicas de ensaios laboratoriais, bem como discutir os métodos de análises estatísticas utilizadas nesse tipo de experimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Formação de colônias do mosquito *Aedes aegypti*

Os mosquitos *A. aegypti* foram obtidos através de ovos provenientes de criadouros naturais e artificiais de diversos bairros do município de Maceió e gentilmente cedidos pela equipe do Núcleo de Entomologia de Alagoas, pertencente à FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Foram mantidos no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios ao abrigo da umidade e predadores, sendo armazenados a temperatura de 23-32°C, umidade relativa do ar de 65-75% e fotoperíodo de 12L:12E horas. A cada seis meses os ovos foram renovados, a partir de outra geração parental visando garantir a manutenção de insetos saudáveis.

Quando se iniciava uma colônia os ovos eram submergidos em uma bacia branca retangular (40 x 26 x 8,5 cm) contendo 2 litros de água destilada por aproximadamente 4 horas, período onde se assegura ter ocorrido a eclosão de praticamente todos eles. As larvas foram mantidas em água a temperatura de $\pm 27^{\circ}\text{C}$ e alimentadas com ração para gatos (LeRoy Mix). Por volta do 7º dia surgiam as primeiras pupas, na literatura identificada como machos, possuindo tamanho menor. No dia seguinte começavam a aparecer as pupas maiores (fêmeas). Estas eram separadas utilizando uma pipeta de plástico em copos descartáveis contendo água destilada em grupos de 25 fêmeas e 5 machos. As pupas não se alimentam e 2 dias depois eclodem na forma alada.

Os insetos alados foram mantidos em gaiolas de madeira teladas com nylon (30 x 30 x 30 cm) e alimentados com solução de sacarose 10% ou solução melífera 5% embebidos em algodão e trocados diariamente. O repasto sanguíneo é realizado de 3-4 dias após a emergência. Utilizaram-se pombos da espécie *Columba livia*. Durante o processo deixa-se uma parte do corpo do pássaro depenado em contato com a tela da gaiola durante 2 horas e no escuro. Anteriormente ao repasto sanguíneo a sacarose ou solução melífera deve ser removida. Os bioensaios foram realizados sempre 3 dias após o repasto sanguíneo, período onde as fêmeas grávidas iniciam a oviposição.

4.2 Formação de colônias do mosquito *Aedes albopictus*

Durante a realização desse trabalho, iniciamos no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios pesquisas estudando o comportamento de oviposição do mosquito *A. albopictus*. Esta espécie apresentou-se com um grande desafio, uma vez que a metodologia utilizada para estudos com o *A. aegypti* não se apresentou reprodutível quando aplicada a ela.

Sendo assim, foi necessário adequar a metodologia de formação das colônias ao ciclo biológico do *A. albopictus* para que pudéssemos reproduzi-lo em laboratório em uma escala que possibilitasse a realização de nossos bioensaios comportamentais de oviposição.

A formação de colônias dos mosquitos *A. albopictus* foram iniciadas através de ovos provenientes de criadouros naturais do município de Maceió, gentilmente cedidos pela equipe do Núcleo de Entomologia de Alagoas, pertencente à FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Foram mantidos no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios ao abrigo da umidade e predadores, sendo armazenados a temperatura de 23-32°C, umidade relativa do ar de 65-75% e fotoperíodo de 12L:12E.

A primeira metodologia para o início das colônias foi a mesma utilizada para o *A. aegypti*. Os ovos foram submergidos em uma bacia branca retangular (40 x 26 x 8,5 cm) contendo 2 litros de água destilada por aproximadamente 4 horas. As larvas foram mantidas em água a temperatura de $\pm 27^{\circ}\text{C}$ e alimentadas com ração para gatos (LeRoy Mix). A primeira adversidade foi o baixo número de larvas que atingiram o estágio pupal e com a maioria das larvas morrendo durante o 2º e 3º estágio. Os mosquitos que alcançaram a fase adulta mostraram-se bem mais sensíveis às variações das condições físicas de temperatura e umidade do laboratório. Este fato pode estar ligado ao nicho em que habita esta espécie de mosquito, normalmente áreas arborizadas, com umidade do ar elevada e temperaturas mais frias, especialmente à noite.

Como alternativa para contornar esse problema, tentamos adaptar nossa colônia reproduzindo um ambiente aquático mais natural, e ao invés de utilizarmos ração para gato como alimentação, procuramos utilizar a infusão de babosa para manter o criadouro, com as larvas alimentando-se dos próprios constituintes orgânicos e microbiológicos presentes. Desta forma obtivemos melhores resultados que seguindo a metodologia anterior. Como peculiaridade do *A. albopictus* o desenvolvimento da fase larval foi diferente da qual estávamos habituados a trabalhar. Como característica específica, o *A. albopictus* nesta fase desenvolve-se variando o estágio de larvas que eclodiram no mesmo dia. Enquanto algumas larvas em 7-9 dias já se desenvolviam em pupas, muitas outras se encontravam ainda no 2º e 3º estágio. Isso dificultou na formação de colônias com a mesma idade na fase alada, forçando-nos a alterar a metodologia adotada para o *A. aegypti*.

As primeiras pupas (machos) foram coletadas a partir do 7º dia desde a submersão dos ovos em água. A primeira gaiola com 25 fêmeas e 5 machos foi obtida no 9º dia e as outras

gaiolas foram completadas no 10° e 11° dia. Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas de madeira teladas com nylon (30 x 30 x 30 cm) e alimentados com solução de sacarose 10% ou solução melífera 5%. Cinco dias após observar o aparecimento das formas aladas em cada gaiola foi realizado o primeiro repasto sanguíneo. Foi utilizados pombos da espécie *Columbia livia* seguindo a mesma metodologia para o *A. aegypti*.

Três dias após o bioensaio foram colocadas as soluções a serem testadas, para observar se o período de oviposição do *A. albopictus* iniciava-se igualmente ao do *A. aegypti*. Pudemos constatar a oviposição dos primeiros ovos a partir do 4° dia, mas estes em baixa quantidade. A oviposição foi efetivamente realizada no 6° dia após o repasto sanguíneo, então adotamos o 5° dia como o efetivo para colocarmos as soluções a serem testadas nos bioensaios.

4.3 Formação de Colônia do mosquito *Culex quinquefasciatus*

Os ovos de *C. quinquefasciatus* foram obtidos através da captura de fêmeas encontradas no Campus da Universidade Federal de Alagoas, área urbana do município de Maceió – AL. Os insetos capturados foram colocados em uma gaiola de madeira e dentro dela foi colocado um recipiente contendo água de poço. Após a postura das jangadas de ovos pelas fêmeas, estes foram transferidos para uma bacia branca, idêntica às utilizadas na formação das colônias de *A. aegypti* e *A. albopictus*. As larvas foram alimentadas com ração para gatos (LeRoy Mix) e, após 6 a 8 dias quando alcançaram a fase pupal, separadas em gaiolas de madeira. Cada gaiola foi ocupada com 20 fêmeas e 5 machos. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10%.

As condições de laboratório foram mantidas em 12L : 12 E horas, temperatura variando entre 26° C a 33° C e umidade do ar entre 65-75%. Diferentemente dos mosquitos do gênero *Aedes*, o *C. quinquefasciatus* possui hábito alimentar noturno, conseqüentemente o repasto sanguíneo foi realizado utilizando pombos da espécie *C. livia*, no período entre 20h00 e 22h30min, a partir do 5° dia do aparecimento das primeiras formas aladas e novamente realizado nos dois dias subseqüentes. Quatro dias após o repasto sanguíneo iniciamos os bioensaios. As jangadas de ovos foram contadas três dias após a inclusão das soluções teste e controle.

4.4 Bioensaios comportamentais de oviposição

Os bioensaios laboratoriais de oviposição foram realizados utilizando as colônias previamente colocadas dentro das gaiolas de madeira teladas de dimensão 30 x 30 x 30 cm.

Esse procedimento evita o stress às fêmeas provocado pela transferência de um local para outro, o que diminuiria o número de ovos depositados pelo mosquito, como foi previamente estudado em nosso laboratório.

Foram realizados testes de dupla-escolha entre as soluções teste e controle. As duas soluções foram dispostas diagonal e randomicamente nos cantos das gaiolas. Tanto na solução teste, quanto no controle, foram utilizados os suportes flutuantes de isopor e papel filtro como superfície para oviposição, metodologia também desenvolvida em nosso laboratório. Sempre que houve utilização de solventes nos tratamentos, este também foi colocado na solução controle, a fim de garantir as mesmas condições no teste da hipótese nula.

4.5 Análise Estatística

Para medir quantitativa e qualitativamente a resposta de oviposição foram contabilizadas as quantidades de ovos depositados nas soluções controle e nos tratamentos. A partir desses valores foram calculados os **Índices de Atividade de Oviposição (IAO)** segundo a equação abaixo, como descrito por Kramer ; Mulla (1979).

$$IAO = \frac{Nt - Ns}{Nt + Ns}$$

Onde Nt corresponde a média do número de ovos depositados no tratamento e Ns corresponde a média do número de ovos depositados no controle. Os valores do índice encontram-se em um intervalo de -1 a $+1$. Um valor positivo indica que mais ovos estiveram presentes no tratamento, enquanto que um valor negativo significa mais ovos presentes no controle. Como sugerido por Kramer ; Mulla soluções que apresentem $IAO > + 0,30$ são consideradas atraentes de oviposição e àquelas que apresentem $IAO < - 0,30$ são consideradas como repelentes.

A análise estatística foi realizada convertendo os dados (número de ovos no tratamento e controle de cada gaiola) para porcentagens e analisando-os através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que não seguiram uma distribuição normal. Para tal foi utilizado o programa **GraphPad Prism 5** e estabelecemos um intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram definidos como atraentes ou não, sendo medido qualitativamente pelo valor

de P e classificados como (*) quando $P < 0,05$, (**) quando $P < 0,01$ e (***) quando $P < 0,001$.

4.6 Escolha e Preparo das Infusões orgânicas utilizadas nos Bioensaios

Bioensaios realizados no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios anteriormente já apontavam a *Aloe vera* como uma promissora fonte natural de semioquímicos atraentes de oviposição para *A. aegypti*. Parte do nosso trabalho então consistiu em tentar extrair e identificar os compostos químicos responsáveis por tal atividade. Para isso procuramos realizar diversos tipos de extrações encontradas na literatura empregadas para tal finalidade. Em todas elas o solvente utilizado foi o éter etílico (P.A). O bambu despertou o interesse uma vez que é considerado um criadouro natural em potencial e possuir importância considerável como sítio de oviposição no domicílio e peridomicílio.

Os processos de extração são essenciais para a análise cromatográfica, principalmente quando os compostos em estudo estão em pequenas concentrações nas matrizes orgânicas, sendo normalmente empregada em análises de alimentos, medicamentos, fragrâncias, matrizes aquosas ambientais e matrizes biológicas. Atualmente os métodos de preparação de amostras a partir de matrizes complexas mais utilizados são: extração em fase sólida (SPE), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), micro-extração em fase sólida (SPME), extração por sorção com barras de agitação (SBSE) e extração líquido-líquido (LLE) (BARKER, 2007).

Em nossos estudos foram empregadas as técnicas de LLE e SBSE, além da Extração Ácido-Base, processo onde se utiliza coeficientes de partição entre solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis com água (éter, CHCl_3 , AcOEt) (MACIEL, PINTO ; VEIGA Jr., 2002). A escolha desse método de extração foi baseada em resultados positivos obtidos por Millar *et al.*. (1992) em estudos com infusão de grama bermuda para identificação de semioquímicos estimulantes/atrativos de oviposição em mosquitos da espécie *C. quinquefasciatus*.

4.6.1 Obtenção e preparação de infusão de folhas de bambu (IFB) e infusão de caule de bambu (ICB)

O bambu foi obtido no Instituto do Bambu localizado no campus da Universidade Federal de Alagoas. O caule foi cortado na base da planta e dividido em colmos de 16-32 cm de comprimento, cada um com abertura em uma das extremidades e um disco de madeira

natural da planta na outra. As folhas foram coletadas imediatamente após o corte do caule e armazenadas em um recipiente plástico até o preparo da infusão.

A infusão de folhas foi preparada no Laboratório um dia após a coleta. Foram pesados aproximadamente 50 g de folhas e submergidas em 2 litros de água destilada e deixada em fermentação aeróbica por 10 dias. Após esse tempo a solução foi transferida para uma garrafa plástica e mantida em temperatura ambiente até sua utilização nos bioensaios.

A infusão do caule foi preparada cortando os colmos 3 centímetros abaixo do internódio (junção de cada colmo). Cada colmo foi preenchido com água destilada até próximo à borda e mantido em fermentação aeróbica por 15 dias para extração dos constituintes químicos. A cada 1-2 dias o volume de água era completado para suprir o que houvesse evaporado. No 16º dia a infusão foi removida dos colmos e usada em bioensaio. O volume que não foi imediatamente utilizado foi armazenado em freezer a -18°C.

4.6.2 Preparação da Infusão de Cebolinha (*Allium fistulosum*)

A hortaliça utilizada para preparação da infusão foi obtida comercialmente em um supermercado de Maceió. A infusão de cebolinha foi preparada a partir das folhas e caule, pesando 144 g e imergidas em 2 litros de água destilada e deixada em fermentação anaeróbica por 7 dias. A solução de cor amarelada foi armazenada em recipiente plástico e mantida sob refrigeração a - 18° C até sua utilização no bioensaio de oviposição.

4.6.3 Preparação da infusão de *Aloe vera*

As infusões de *A. vera* foram preparadas a partir de folhas da planta coletadas no jardim de uma residência localizada no bairro de Guaxuma, no município de Maceió-AL. Em um béquer de capacidade 4 litros foram colocados 1.620 g de folhas inteiras de babosa recentemente cortadas. As folhas foram deixadas em sentido vertical e em seguida foram adicionados 2 litros de água destilada ou água de poço não clorada (Figura 18). O béquer foi então tampado com tecido tule e a infusão foi deixada em fermentação aeróbica durante 7 dias. As folhas foram então retiradas e a solução de cor vinho transferida para um recipiente plástico com capacidade de 5 litros. O recipiente foi tampado com tecido tule e foi então armazenado à temperatura ambiente.

Figura 18: Preparação da infusão aquosa de Aloe vera

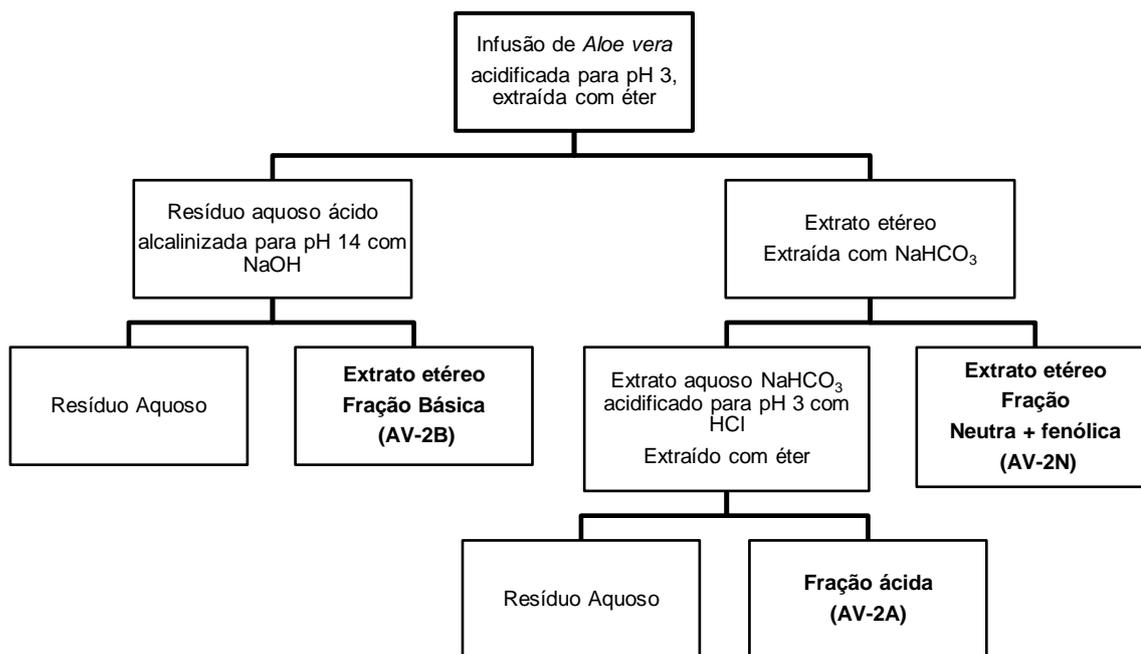


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.4 Extração ácido-base a partir de infusão de *A. vera*

Separou-se 1.140 mL de infusão de *A. vera* preparada e acrescentou-se um volume de 11 mL de ácido clorídrico (HCL) 1M a fim de obter uma solução com pH 3,0. Realizou-se então uma extração líquido-líquido com 700 mL de éter etílico (PA). O resíduo aquoso ácido foi basificado com hidróxido de sódio (NaOH) para pH 14 e em seguida novamente realizou-se uma extração líquido-líquido com 300 mL de éter etílico. A fração orgânica dessa 2ª extração, denominada AV-2B (*Aloe vera*, 2ª extração, fração básica) foi secada em fluxo de nitrogênio e mantida a temperatura de -18°C até sua utilização no bioensaio de oviposição. A fração etérea da 1ª extração foi “lavada” com 400 mL de Bicarbonato de Sódio 5% (NaHCO₃). A fração aquosa obtida foi acidificada com 280 mL de HCL 1M para pH 3,0 e realizou-se uma nova extração com 300 mL de éter etílico. A fração orgânica dessa extração, denominada AV-2A (*Aloe vera*, 2ª extração, fração ácida) foi concentrada em Fluxo de Nitrogênio e mantida sob refrigeração a -18°C. A fração orgânica obtida após a lavagem com NaHCO₃ contendo uma solução de compostos neutros e fenólicos denominada AV-2N (*Aloe vera*, 2ª extração, fração neutra) foi concentrada em fluxo de Nitrogênio e mantida a -18°C (Figura 19).

Figura 19: Sequência de etapas usadas para fracionar a infusão de *A. vera*



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.5 Extração líquido-líquido a partir de infusão de *A. vera*

A extração líquido-líquido foi realizada a partir de 100 mL de infusão previamente preparada, seguida da adição de 30 mL de éter etílico em um funil de separação de capacidade 250 mL. Após agitação e separação da mistura em duas fases, estas foram coletadas em erlenmeyers distintos e a fração aquosa foi novamente introduzida no funil de separação, repetindo o procedimento de extração mais duas vezes, utilizando sempre o mesmo volume de éter etílico (30 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com 30 mL de água destilada e transferidas para um frasco de vidro e em seguida concentradas através de um fluxo de nitrogênio gasoso até remoção total do solvente. O frasco foi armazenado em freezer a temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização em bioensaio.

4.6.6 Extração por Sorção em Barras de Agitação (SBSE) a partir de infusão de *A. vera*.

Em 4 erlenmeyers de capacidade 250 mL foram adicionadas 100 mL de infusão de *Aloe vera*. Em seguida as barras de agitação da SBSE foram suavemente colocadas dentro dos erlenmeyers com o auxílio de uma pinça. Os erlenmeyers foram tampados com papel alumínio e deixados sob placas de agitação magnética a 1200 rpm por 4 horas. As barras de agitação foram retiradas das soluções com o auxílio de uma pinça, colocadas em superfície de papel toalha e em seguida lavadas com um pequeno jato de água destilada para remoção de

açúcares que possam ter ficado adsorvidos. As barras de agitação foram então suavemente secadas com o papel toalha e depois transferidas para dentro de uma pipeta de Pasteur. A pipeta foi então colocada dentro de recipiente de vidro pequeno (capacidade 4 mL) e as barras puderam então ser rinçadas com 2 mL de éter etílico cada. O extrato etérico foi então concentrado através de um fluxo de nitrogênio gasoso até remoção total do solvente. O frasco foi armazenado em freezer a temperatura de -18 °C até sua utilização em bioensaio.

4.7 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)

Os procedimentos de GC-MS foram realizados em aparelho Hewlett-Packard 5890 contendo coluna capilar apolar de polidimetilsiloxano (HP1) (50 m x 0,32 mm ID: 0,32 µm), utilizando o Hélio como fase móvel. Impacto eletrônico a 70 eV, 250°C. A temperatura do forno foi de 30°C durante cinco minutos com aumento gradativo de 5°C/min e temperatura máxima de 250°C. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais (LPqPN), na UFAL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios de Oviposição realizados com fêmeas do mosquito *A. aegypti*

O *A. aegypti* tem sido objeto de vários estudos comportamentais de oviposição. Devido a sua capacidade vetora na transmissão de diversas arboviroses, principalmente a dengue, hábitos alimentares altamente antropofílicos e fácil domiciliação a ambientes urbanos é hoje a principal espécie de artrópodes vetores de doenças e alvo do maior número de programas de controles de vetores. Mesmo com o entendimento do comportamento ambiental desse mosquito esclarecido, seu controle tem se mostrado muito difícil, uma vez que a oviposição ocorre em quase todos os tipos de ambientes aquáticos, naturais ou artificiais.

Os estudos com o *A. aegypti* no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios ocorre há cinco anos e são consideráveis os avanços técnicos obtidos no que se diz a bioensaios de oviposição. Como exemplo nós podemos citar o desenvolvimento de um suporte de oviposição que estimula maior oviposição quando comparada ao tradicional suporte em formato de cone largamente utilizado nos experimentos desse tipo. Outros estudos realizados com águas provenientes de diversos criadouros artificiais típicos para o mosquito mostraram resultados negativos, onde não foi constatado preferência de oviposição nestas águas quando comparadas à água destilada. Esse comportamento mostra que mesmo tendo o comportamento de oviposição influenciados por semioquímicos, o *A. aegypti* ovipõe normalmente em águas destituídas desses compostos (PAULINO, 2008).

No entanto o objeto de maior estudo atualmente no laboratório vem sendo as infusões aquosas preparadas a partir de folhas de *Aloe vera* (Liliaceae). Descoberta ocasionalmente durante trabalhos de campo no quintal de uma residência localizada no bairro Vergel do Lago, Maceió – AL, a infusão mostrou-se bastante atrativa para a oviposição de fêmeas do *A. aegypti* (NASCIMENTO, 2006). Várias infusões a partir da *A. vera* foram preparadas em laboratório e mesmo com o conhecimento da variação na composição das substâncias orgânicas dissolvidas e do material orgânico que está sendo fermentado, além do efeito da temperatura, tempo de fermentação, e outros fatores (MILLAR *et al.*, 1992), conseguimos obter resultados de oviposição semelhantes com todas as infusões.

Aloe vera L. (babosa), nome dado por Carl Von Linne em 1720, sendo posteriormente referida como *Aloe barbadensis* Miller, é uma planta pertencente à família Liliaceae que tem origem na região noroeste africana e ocorrência em regiões subtropicais e tropicais. Trata-se

de uma planta medicinal com registros de sua utilização, pelos povos do Mediterrâneo, remotas ao ano de 400 a.C. (DEBIASI *et al.*, 2007).

Largamente estudada pela indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, fitoterápica e de ornamentação, apresenta no interior de suas folhas um gel de consistência viscosa rico em polissacarídeos, no qual se encontram seus princípios ativos como enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos (BACH ; LOPES, 2007). Mediante os resultados obtidos em nossos estudos, a utilização da babosa na ornamentação deve ter cuidados especiais. Embora naturalmente cresça em ambientes áridos e necessite de pouca irrigação, quando colocadas em vasos contendo água produz uma solução de cor escura, altamente atrativa para a oviposição do *A. aegypti* e de difícil visualização de larvas e pupas, constituindo em um criadouro em potencial.

Para nossos trabalhos de laboratório uma nova infusão aquosa de *A. vera* foi preparada segundo metodologia descrita anteriormente e foram realizados bioensaios comportamentais para avaliação de sua atratividade de oviposição em fêmeas grávida de *A. aegypti*.

5.1.1 Validação do experimento: bioensaio de oviposição H₂O x H₂O

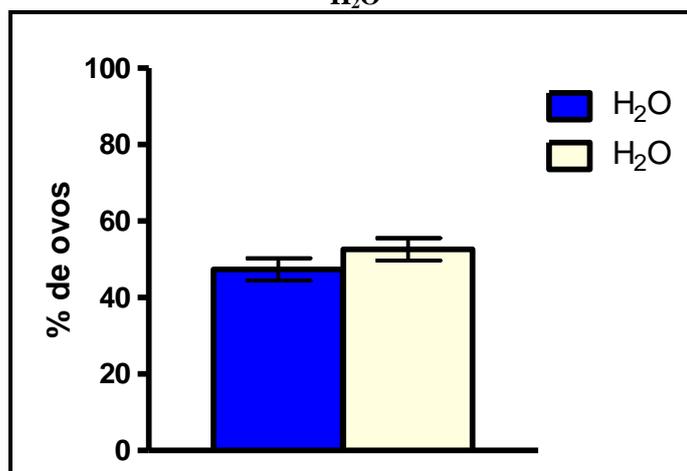
No início de nosso trabalho a primeira preocupação foi garantir a validade de nossos trabalhos realizando um bioensaio de oviposição controle x controle, para que pudéssemos confirmar que ambos os recipientes estariam sujeitos a oviposição igualmente. Foram então colocados em cada gaiola dois recipientes iguais, ambos contendo água destilada. Três dias depois foi realizada a contagem dos ovos (Tabela 1).

Tabela 1: Ovos depositados nos dois recipientes no bioensaio de oviposição H₂O x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6	7
Tratamento	317	994	515	457	667	615	243
Controle	371	667	667	773	616	887	226

Os números de ovos depositados em cada recipiente foram transformados para porcentagem de ovos depositados no recipiente para cada gaiola. A figura 20 ilustra a média dessas porcentagens, com seus respectivos erros padrão da média (EPM).

Figura 20: Porcentagem de ovos depositados e seus respectivos EPM nos recipientes do bioensaio H₂O x H₂O



Fonte: Elaborado pelo autor

Os parâmetros estatísticos foram calculados. O IAO foi de 0,05, mostrando que as atratividades foram consideradas iguais para cada recipiente. Quando submetidos a análise pelo teste de Mann-Whitney o valor de P foi de 0,2593, mostrando que, como esperado, não houve diferença estatística na quantidade de ovos depositados em cada recipiente.

5.1.2 Bioensaio de Oviposição com Infusão de *A. vera*.

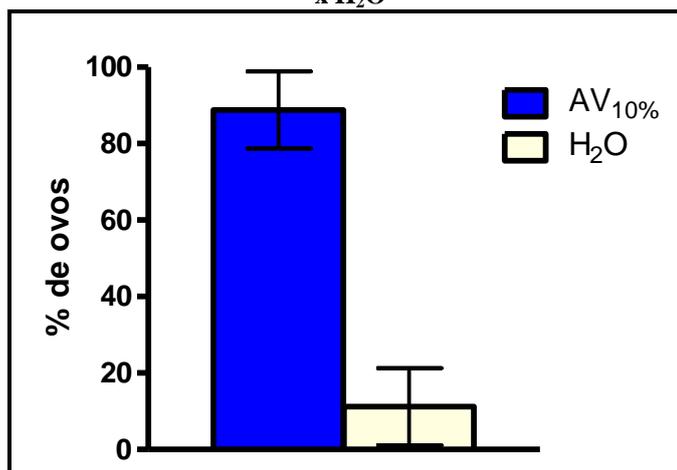
Em todos os bioensaios realizados até então no Laboratório de Síntese e Isolamento de Feromônios com infusões fermentadas de *A. vera* os resultados apontaram na influência delas como atraentes de oviposição para fêmeas do mosquito *A. aegypti*. Apesar desta informação foi necessária a realização de um novo bioensaio de oviposição para que pudéssemos avaliar a atividade da infusão preparada para a extração ácido-base. Então a partir dessa infusão iniciamos nossos estudos e realizamos um bioensaio oviposicional com ela diluída a 10%. A contagem dos ovos deste bioensaio está mostrada na tabela 2.

Tabela 2: Ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV_{10%} x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	48	316	401	129	188	228
Controle	51	01	11	00	03	9

O valor do IAO deste bioensaio foi igual a 0,8850, mostrando que houve grande seletividade para oviposição das fêmeas do *A. aegypti* na infusão teste. O número de ovos foi então transformado para porcentagens e submetido à análise pelo teste de comparação de médias de Mann-Whitney, quando os dados não seguem uma distribuição gaussiana. A figura 21 ilustra o gráfico da porcentagem de ovos na Infusão AV_{10%} e na solução controle.

Figura 21: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV10% x H₂O



Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de P obtido na análise estatística foi igual a 0,0043, confirmando através dos dois parâmetros utilizados que houve significância estatística no bioensaio realizados (**). Podemos então concluir que a infusão AV_{10%} preparada possui a atividade positiva no comportamento de oviposição das fêmeas do *A.aegypti* em relação ao controle (água destilada). Com os resultados obtidos pudemos então dar continuidade aos processos de extração para complementação de nossos trabalhos.

5.1.3 Bioensaios de oviposição com os extratos obtidos com a Extração Ácido-Base de *Aloe vera*.

Uma vez confirmada a atividade da infusão preparada, iniciamos com ela uma tentativa de isolar e identificar os compostos orgânicos presentes que poderiam estar atuando como semiquímicos de oviposição para as fêmeas do *A. aegypti*. Uma vez que já havíamos realizados diversos tipos de extração, tais como a LLE, SBSE e SPE, escolhemos realizar um procedimento até então inédito em nosso laboratório com a infusão de *A. vera*. Foi feita uma extração ácido-base na tentativa de obtermos três frações diferentes, a primeira contendo os compostos orgânicos ácidos, a segunda contendo os compostos básicos e a terceira contendo os compostos neutros e fenólicos, utilizando o método empregado. Para isto seguimos a

metodologia adotada por Millar e colaboradores (1992) que realizaram essa extração em infusão fermentada de grama Bermuda para fêmeas do mosquito *C. quinquefasciatus*. Das três frações obtidas por eles, apenas a fração contendo os compostos neutros e fenólicos apresentou resposta positiva em bioensaios comportamentais de oviposição. Eles testaram ainda uma mistura das frações ácidas e básicas, mas esta também não apresentou resposta significativa. A fração com os compostos neutros e fenólicos foi então fracionada por cromatografia flash utilizando pentano, mistura de éter etílico e pentano (com éter a 5, 10, 25, 50 e 100%) e acetona. Entre elas apenas a fração obtida com a mistura éter/pentano 25:75 mostrou atividade oviposicional quando testadas isoladamente. Nesta fração foram identificados cinco compostos: fenol, 4-metilfenol, 4-etilfenol, indol e 3-metilindol. Dentre essas substâncias apenas o 3-metilindol apresentou atividade oviposicional estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas. Bioensaios com misturas dos compostos indicaram haver sinergismo entre as substâncias no efeito atrativo/estimulante (MILLAR *et al.*, 1992).

Com a extração ácido-base de *A. vera* obtivemos três frações de cores distintas. A fração contendo os compostos ácidos (AV-2A) apresentou cor laranja, enquanto a fração com os compostos neutros (AV-2N) apresentou cor amarela e a fração contendo os compostos básicos (AV-2B) apresentou cor branco-translúcida. Foram então realizados bioensaios comportamentais de oviposição envolvendo as três frações obtidas.

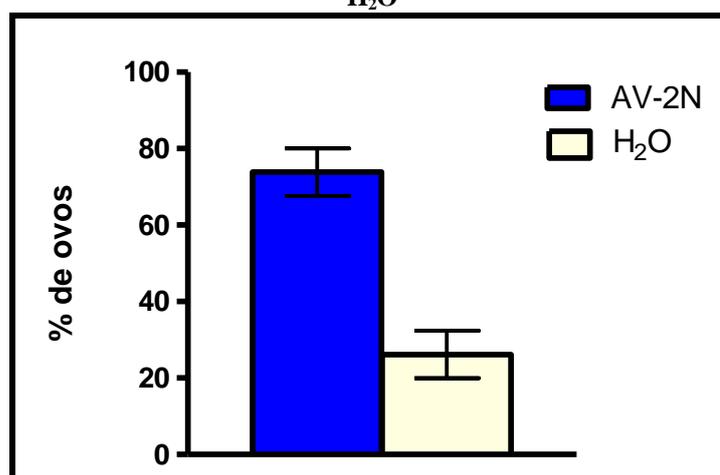
5.1.3.a Bioensaio de Oviposição com extrato ácido-base de *Aloe vera* – Fração Neutra e Fenólica (AV-2N)

O bioensaio utilizando a fração AV-2N foi o primeiro a ser realizado em nosso laboratório. Após a retirada do frasco contendo o extrato seco desta fração, adicionamos aproximadamente 3 mL de éter etílico (o mesmo utilizado na extração) e com o auxílio de uma seringa 0,5 mL do extrato foram espalhados sobre o papel filtro circular do suporte flutuante de cada tratamento. No experimento controle foram adicionados 0,5 mL do solvente no papel filtro circular. Três dias após foram contabilizados os ovos depositados no tratamento e no controle (Tabela 3).

Tabela 3: Ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2N x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	644	185	361	178	425	127
Controle	181	35	257	65	24	105

Os números de ovos depositados no tratamento e controle em cada gaiola foram então transformados para porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle de cada gaiola. A figura 22 ilustra a média dessas porcentagens, com seus respectivos erros padrão da média.

Figura 22: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2N x H₂O

Fonte: Elaborado pelo autor.

Estes resultados do bioensaio de oviposição mostraram que houve grande preferência pelas fêmeas do *A. aegypti* para depositarem os ovos na solução teste. Em todas as gaiolas houve maior quantidade de ovos depositados no tratamento, havendo uma em que o número de ovos foi quase 20 vezes maior na solução teste que no controle (425:24). Quando submetidos à análise estatística a fração AV-2N apresentou atratividade de oviposição significativa quando analisadas de acordo com o Índice de Atividade de Oviposição (IAO = +0,48) e quando os dados foram submetidos ao teste de comparação de médias de Mann-Whitney (**) ($P < 0,05$), comprovando a atividade positiva atrativa/estimulante para fêmeas do mosquito dessa fração em relação à solução controle de água destilada.

5.1.3.b Bioensaio de Oviposição com extrato ácido-base de *Aloe vera* – Fração Ácida (AV-2A).

Hwang *et al.* (1980) estudaram o comportamento de oviposição de *C. quinquefasciatus* para ácidos alifáticos de cadeia curta, como os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e capríco, onde foi constatada atividade repelente. Posteriormente foi avaliada a atividade de oviposição da série homóloga de ácidos graxos de C₅ à C₁₃ em *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* e *Culex tarsalis*. Embora todas as espécies tenham se mostrado sensíveis a esses compostos, foi observada maior atividade repelente nos ácidos de cadeia C₈ à C₁₀, com o ácido graxo de cadeia C₉ mostrando resposta repelente significativa em *A. aegypti* (Hwang *et al.*, 1982).

Millar *et al.* (1992) também não conseguiram estabelecer atividade atrativa na fração contendo os compostos ácidos em estudo com infusão de grama de Bermuda em bioensaios com *C. quinquefasciatus*, mas não constataram a atividade repelente citada por Hwang e colaboradores (1982) nos dois estudos citados anteriormente. Tal fato foi justificado provavelmente pela concentração dez vezes menor dos compostos neste último estudo em relação aos primeiros.

Ganesan *et al.* (2006) mostraram atividade atrativa nos ácidos graxos dodecanóico e (Z)-9-hexadecanóico nas concentrações de 10 e 100ppm, além dos ácidos graxos C14 e C16 nas concentrações de 1 e 10ppm, embora estes dois últimos tenha mostrado atividade repelente na concentração de 100ppm.

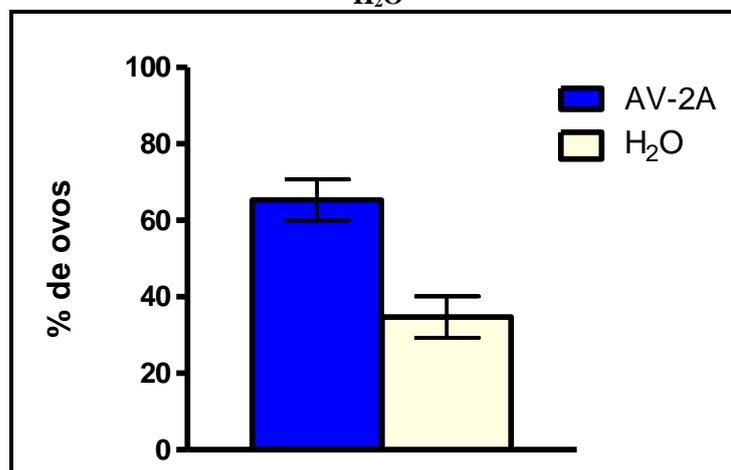
A fração ácida (AV-2A) foi submetida a um bioensaio de oviposição para que pudessemos estabelecer a presença de ácidos orgânicos com atividade de oviposição no extrato. O resultado da contagem de ovos está disposto na tabela 4.

Tabela 4: Bioensaio de oviposição AV-2A x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamento	128	283	326	520	897	364	172	251
Controle	55	103	333	678	81	147	138	120

Os dados foram então transformados para porcentagens e submetidos à análise estatística. A figura 23 mostra a porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição.

Figura 23: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2A x H₂O



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em nossos testes foram obtidos resultados de uma gaiola para outra com diferença máxima na solução teste de dez vezes mais ovos que no experimento controle (897:89) e uma diferença máxima na solução controle de duas vezes mais ovos que na solução teste (120:251). Nossos resultados não se mostraram estatisticamente significantes quando analisados pelo IAO (= +0,28) ou pelo teste de Mann-Whitney ($P > 0,05$) podendo-se concluir que a fração na concentração testada não apresentou atividade de oviposição para as fêmeas do mosquito. Como a literatura descreve tanto atividades repelentes, quanto atrativas para variados ácidos orgânicos, torna-se necessária uma inspeção mais profunda para elucidar o verdadeiro papel dos compostos presentes nessa fração em relação ao comportamento de oviposição do *A. aegypti*.

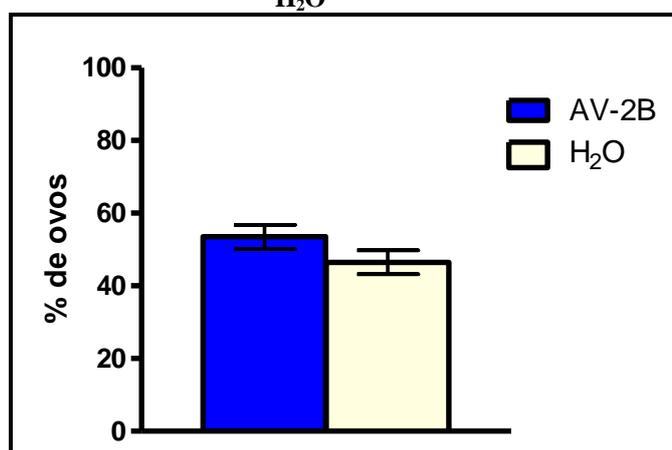
5.1.3.c Bioensaio de Oviposição com extrato ácido-base de *Aloe vera* – Fração Básica (AV-2B).

A outra fração obtida com a extração Ácido-Base, denominada AV-2B, também foi avaliada a fim de se estabelecer sua influência na resposta de oviposição do *A. aegypti*. Realizamos então um bioensaio comportamental de dupla escolha e o resultado das contagens de ovos mostrou que não houve diferença acentuada na comparação entre o tratamento e o controle, como mostra a tabela 5.

Tabela 5: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV-2B x H₂O destilada.

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	256	312	78	181	438	227
Controle	312	386	67	105	267	209

Os dados foram então transformados para porcentagem e o gráfico de comparação das médias percentuais e o Erro Padrão da Média estão mostrados na Figura 24. Quando submetidos à análise estatística, o resultado foi avaliado quanto ao IAO e o Teste de Mann-Whitney. O valor do IAO foi igual a 0,05 mostrando que houve praticamente a mesma oviposição nos dois recipientes. A comparação das médias também não se mostrou estatisticamente significativa e o valor de $P > 0,05$ permite-nos concluir pelos dois parâmetros analisados que a fração AV-2B não influenciou a atividade de oviposição do mosquito *A. aegypti*.

Figura 24: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2B x H₂O

Fonte: Elaborado pelo autor.

No estudo de Millar *et al.* (1992), no qual seguimos o modelo de nossa extração, também não houve atividade atrativa ou repelente de oviposição do mosquito *C. quinquefasciatus* pela fração correspondente. Não encontramos na literatura estudos de oviposição envolvendo bases orgânicas, no entanto ainda assim seria interessante a realização

de novos estudos envolvendo compostos básicos para que possamos identificar as substâncias presentes nessa fração e futuramente relacionar a atividade deles isoladamente ou em conjunto com outras substâncias identificadas durante esta extração e investigar possíveis relações sinérgicas entre elas.

5.1.3.d Bioensaio de Oviposição com extrato ácido-base de *Aloe vera* – Recombinação Fração Ácida + Fração Básica (AV-2A + AV-2B).

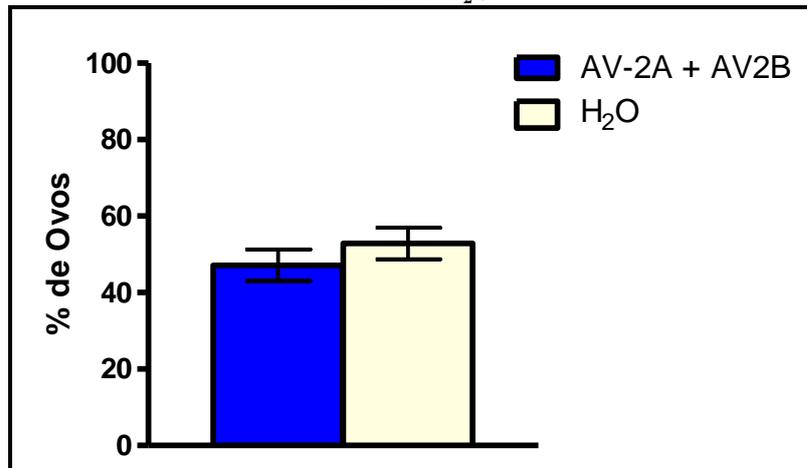
Uma vez que não obtivemos resultados positivos com as frações AV-2A e AV-2B isoladamente em nossos bioensaios de oviposição, resolvemos analisar se uma recombinação das duas frações poderia estimular a oviposição do *A. aegypti* ou se realmente os compostos responsáveis pela atratividade de oviposição da *A. vera* estavam presentes apenas na fração neutra e fenólica. Realizamos então novo bioensaio de oviposição com uma mistura das duas frações. O resultado da contagem de ovos pode ser conferido na Tabela 6.

Tabela 6: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV-2A + AV-2B x H₂O destilada.

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	517	253	290	44	178	369
Controle	638	356	191	87	130	454

A recombinação das duas frações não mostrou diferença considerável na quantidade de ovos depositados no tratamento e controle no final do bioensaio de oviposição, com ligeira maior quantidade de ovos depositados na solução controle (água destilada). Os dados foram então avaliados de acordo com o IAO e o valor dele foi de -0,06, confirmando que por este parâmetro não houve seletividade por nenhum dos dois recipientes. Os dados foram então transformados para porcentagens e submetidos ao teste de Mann-Whitney. O gráfico com a média percentual dos ovos depositados na fração recombinada e no controle e seus respectivos EPM é mostrado na figura 25.

Figura 25: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV-2A + AV-2B x H₂O



Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise pelo teste de Mann-Whitney acompanhou o resultado do IAO e também não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Sendo assim podemos concluir que não houve atividade atrativa de oviposição para as fêmeas do *A. aegypti* pela recombinação da fração AV-2A + AV-2B. Um resultado igual de não-atratividade também havia sido obtido por Millar e colaboradores (1992), concluindo que em nossos experimentos também não se pôde constatar atividade sinérgica entre os compostos das duas frações. A Tabela 7 mostra a resposta oviposicional da IAV_{10%} e das frações AV-2N, AV-2A e AV-2B obtidas com a extração ácido-base.

Tabela 7: Resposta oviposicional de fêmeas do *Aedes aegypti* para infusão e frações obtidas na extração ácido-base de *Aloe vera*

Fração utilizada no teste	Média do número de ovos		IAO	Valor de P	Significância
	Controle	Tratamento			
<i>Aloe vera</i> 10%	13.20 ± 9.65	216.4 ± 63.56	0,88	< 0,001	***
Fração Neutra (AV-2N)	111.2 ± 37.3	320.0 ± 80.3	0,48	< 0,05	**
Fração Ácida (AV-2A)	206.9 ± 73.61	367.6 ± 86.77	0,28	> 0,05	Não
Fração Básica (AV-2B)	248.7 ± 49.69	224.3 ± 49.96	0,05	> 0,05	Não
Fração Ácida + Básica	309.3 ± 86.93	275.2 ± 66.05	-0,06	> 0,05	Não

Dentre as frações analisadas, apenas a fração contendo os compostos neutros e fenólicos estimulou positivamente a oviposição das fêmeas do mosquito *A. aegypti*. A recobinação da fração ácida (AV-2A) e básica (AV-2B) também não influenciou o comportamento de oviposição dos mosquitos. Houve perda de atividade quando comparamos a infusão diluída (IAV_{10%}) com a fração AV-2N. Esta diminuição de atividade pode ser decorrente de relações sinérgicas entre compostos da fração ácida e/ou da fração básica, sendo necessários novos bioensaios que considerem essa possibilidade. No entanto, como o objetivo deste trabalho foi identificar as substâncias presentes na fração ativa, nos detivemos apenas na identificação dos compostos presentes na fração AV-2N.

5.1.4 Bioensaios de Oviposição com infusão fermentada de caule e folhas de bambu (*Bambusa vulgaris*)

Bambusa vulgaris é uma espécie de bambu originária da China, encontrando-se hoje distribuída em muitos países por todo o mundo e sendo a espécie que apresenta maior área de

plântio no Brasil. A Região Nordeste tem a maior área plantada do mundo, com plântios distribuídos nos estados do Maranhão, da Paraíba e de Pernambuco, sendo a planta usada no país como matéria prima industrial para a produção de papel e energia (BRITTO, TOMAZELLO ; SALGADO, 1997).

Notoriamente conhecido como um criadouro natural de diversas espécies de mosquitos e muito presente em áreas urbanizadas, onde é encontrado em jardins, parques, estradas, etc., o bambu preocupa a comunidade acadêmica como um possível responsável pela manutenção de focos de mosquitos, principalmente do gênero *Aedes*, mesmo onde as medidas de controle sejam eficazes.

Diante dessas premissas resolvemos avaliar a resposta de oviposição do mosquito *A. aegypti* a infusões aquosas fermentadas preparadas a partir do caule e das folhas de bambu, da espécie *B. vulgaris* coletados no campus da UFAL e tentar estabelecer a real importância dessa espécie no que se refere à seleção do sítio de oviposição desses vetores.

5.1.4.a Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* utilizando Infusão de Caule de Bambu x Água Destilada

O primeiro bioensaio foi realizado para comparar a atratividade de oviposição da infusão de caule de bambu comparada ao controle (água destilada). Os bioensaios foram realizados segundo metodologia desenvolvida no laboratório e previamente descrita neste trabalho. As soluções foram mantidas nas gaiolas durante três dias e em seguida foram retiradas para a contagem dos ovos. A contagem foi feita manualmente com o auxílio de uma lupa eletrônica. O resultado da contagem de ovos é mostrado na Tabela 8.

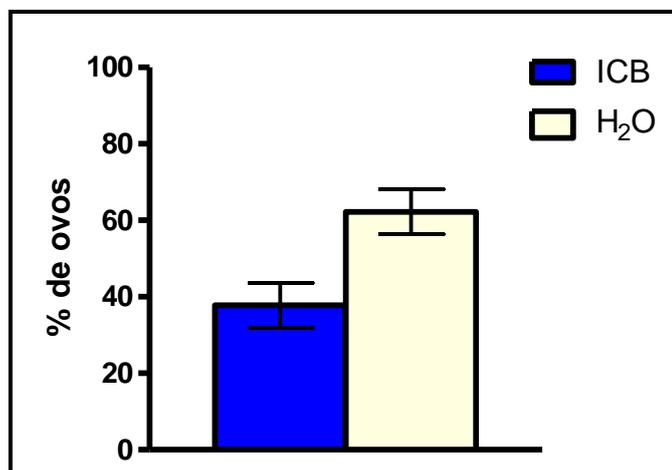
Tabela 8: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio ICB x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamento	55	421	334	25	347	183	512	214
Controle	148	593	511	173	501	570	254	220

O resultado do bioensaio mostrou que não houve grande diferença na quantidade de ovos depositados no tratamento e controle, havendo no entanto maior quantidade de ovos na água destilada, com o cálculo do IAO foi igual a – 0,15. O resultado negativo, contudo aponta

para um caráter repelente da infusão. Os dados foram então transformados para porcentagem e submetidos à análise pelo teste de Mann-Whitney. A figura 26 mostra as médias percentuais e os respectivos EPM.

Figura 26: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição ICB x H₂O



Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de P no teste de comparação de médias foi maior que 0,05, mostrando também não haver diferença estatisticamente significativa entre as médias das porcentagens de ovos depositados no controle e no tratamento. De acordo com os dois parâmetros analisados, podemos concluir que a infusão preparada em laboratório não afetou o comportamento de oviposição do *A. aegypti*.

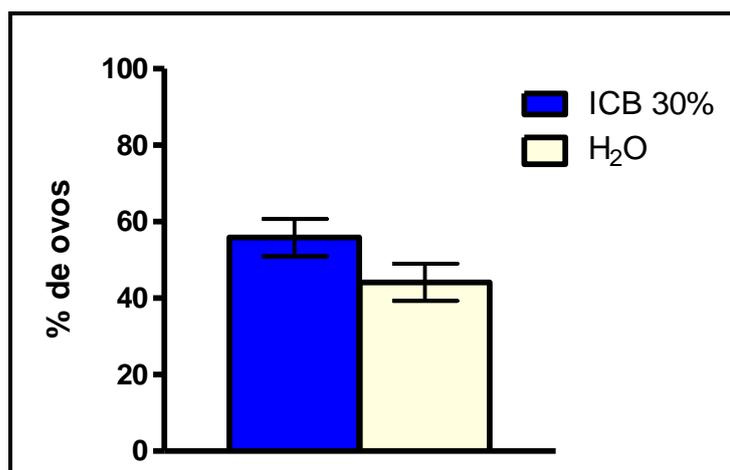
5.1.4.b Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* utilizando Infusão de Caule de Bambu 30% x Água Destilada

Vários fatores podem ter influenciado nos resultados obtidos e uma vez que não houve seletividade pela Infusão de Bambu pura, resolvemos diluir a infusão testada para observar se o efeito repelente poderia estar relacionado com a concentração dos analitos presentes. A solução foi então diluída a 30% utilizando água destilada. Realizamos um novo bioensaio de oviposição com fêmeas grávidas de *A. aegypti* seguindo os mesmos procedimentos utilizados no bioensaio com a infusão pura. Três dias após colocar as soluções teste e controle os ovos foram contados e os resultados são expressos na Tabela 9.

Tabela 9: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio ICB_{30%} x H₂O destilada.

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tratamento	327	73	708	311	309	667	253	381	492	363
Controle	763	53	217	614	327	784	837	534	500	690

Os resultados obtidos foram estatisticamente semelhantes ao da infusão pura, no entanto percebemos que houve grande diferença entre a quantidade de ovos depositados tanto nos tratamentos, como nos controles de uma gaiola para outra. Como já discutido anteriormente, a metodologia do laboratório permite esse viés e uma vez que nossos testes tem objetivos de obter resultados qualitativos. Mais uma vez os resultados não foram significativos, mostrando novamente um caráter repelente quando analisados através do Índice de Atividade de Oviposição (IAO = - 0,15). Quando submetido ao teste de Mann-Whitney os dados foram transformados em porcentagens e constatou-se que não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os ovos depositados na Solução da Infusão de Caule de Bambu 30% e os depositados na água destilada. A Figura 27 mostra o gráfico das médias percentuais com seus respectivos EPM no bioensaio ICB_{30%} x Água destilada.

Figura 27: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição ICB30% x H₂O.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.5 Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de *A. aegypti* utilizando Infusão de Folhas de Bambu x Água Destilada

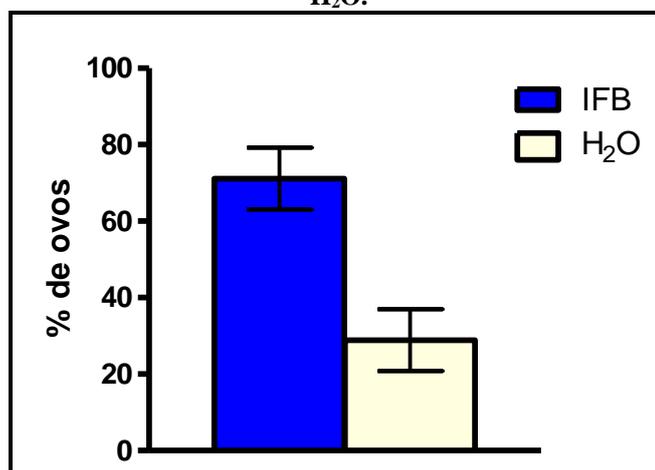
Como não obtivemos resultados satisfatórios com a Infusão de Caule de Bambu realizamos uma nova tentativa preparando uma infusão com as folhas coletadas. Os resultados obtidos foram bastante diferentes quando observados cada repetição. Houve gaiola onde observamos seletividade pelo tratamento de uma magnitude de 10:1 (1383:157), enquanto outras mostraram uma ligeira maior quantidade de ovos na solução controle (Tabela 10). O IAO = 0,48 revela que por este parâmetro a infusão foi considerada atraente.

Tabela 10: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio IFB x H₂O destilada.

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	1383	1156	455	156	1212	523
Controle	157	517	52	169	243	595

O resultado da análise estatística pelo teste de Mann-whitney também foi considerado estatisticamente significativo um valor de P como significativo (*). A Figura 28 ilustra o gráfico das médias percentuais das duas soluções, com seus respectivos EPM.

Figura 28: Porcentagem de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição IFB x H₂O.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora o valor do IAO tenha sido considerado elevado, o teste de comparação de médias não acompanhou quantitativamente. Esse fato decorre de duas das gaiolas terem apresentado maior quantidade de ovos no controle. Enquanto o IAO pode compensar esse valor na grande quantidade de ovos depositados nos outros tratamentos, o teste de Mann-

Whitney considera a oviposição em cada repetição para calcular o desvio e erro padrão dos dados, alertando-nos da importância da interpretação correta dos dados e resultados estatísticos.

Ponnusamy *et al.* (2008) demonstraram a atratividade de infusão de folhas de bambu da espécie *Arundinaria gigantea* com uma semana de preparo para fêmeas grávidas de *A. aegypti* quando comparada à água destilada. No entanto em experimentos complementares atribuiu a atividade atrativa/estimulante a caimônios produzidos por microorganismos presentes durante a fermentação. Quando filtradas a fim de remover os microorganismos presentes, essas infusões mantiveram a atratividade, no entanto perdendo a capacidade estimulante de oviposição. Constataram então que os caimônios atrativos de oviposição mantiveram-se dissolvidos na solução, não podendo ser removidos apenas por filtração. Nesse estudo os ácidos nonanóico e tetradecanóico, além do éster tetradecanoato de metila foram bastante efetivos na indução de oviposição, mas a atratividade foi dependente de concentração com taxas de variação muito estreitas.

Nossos experimentos com infusão preparada do caule da espécie *Bambusa vulgaris* não se mostraram atrativo/estimulantes de oviposição para as fêmeas de *A. aegypti*. Apesar de já ter sido identificado como um criadouro natural de várias espécies de mosquitos, em laboratório a infusão obtida em colmos de bambu nas concentrações testadas não influenciaram o comportamento de oviposição do inseto. A escolha desses criadouros na natureza pode ser dar a fatores que não foram estudados no laboratório, podendo a forma, altura e a localização dos troncos dos bambus influenciarem na seleção desses sítios. Outro fator que deve ser ponderado é a concentração dos compostos químicos e a natureza dos microorganismos presentes no habitat silvestre. É de conhecimento que as plantas produzem substâncias diferentes e em concentração variada de região para região e dependendo da época do ano. Os caules de bambus normalmente quebram-se (e conseqüentemente propiciam o surgimento de criadouros) em estações com ventos e chuvas fortes, e este fator pode estar relacionado indiretamente com a viabilidade do criadouro. Uma vez que a água que preenche esses reservatórios é proveniente da chuva, esta também pode influenciar na escolha do bambu como sítio de oviposição.

Novos bioensaios com diferentes concentrações da infusão preparadas nos colmos devem ser realizados para observar se há ganho na atividade atrativa/estimulante. Experimentos de campo podem também ser realizados para verificar a influência dos

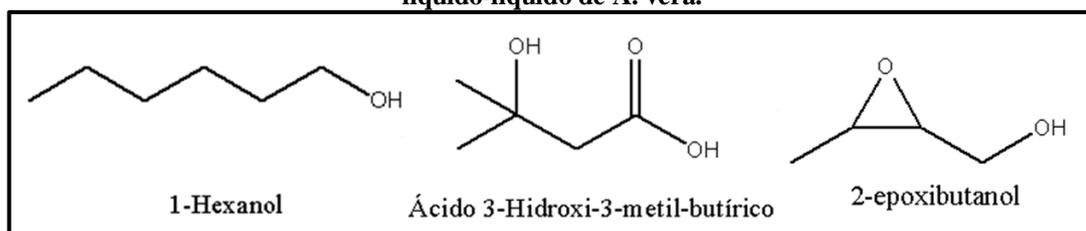
estímulos físicos na seleção desse tipo de criadouro. É de fundamental importância o reconhecimento desses tipos de reservatório como atraente para mosquitos vetores de doenças, uma vez que eles se encontram em regiões de peridomicílio e são de difícil controle, tanto por sua localização, quanto pela dificuldade em identificá-los e/ou alcançá-los.

Já o bioensaio com a Infusão de Folhas de Bambu (IFB) mostrou-se atrativo. Como determinado por Ponnusamy e colaboradores é necessário realizar uma inspeção química e microbiológica para determinar a origem dos semioquímicos. Tal como realizado com a *Aloe vera*, vários métodos de extração podem e devem ser realizados a fim de identificar essas substâncias. A adoção de metodologias para a identificação dos microorganismos presentes deve ser estudada, uma vez que processos utilizando bactérias já vêm sendo empregados na produção de biolarvicidas e semelhantemente poderiam ser utilizados como bioatraentes de oviposição.

5.2 Identificação dos Compostos isolados através de GC-MS na fração AV-2N

PAULINO (2008) em estudos com extrato líquido-líquido de *A. vera* conseguiu sugerir a presença de três substâncias presentes no extrato, o 1-hexanol, o ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico e o 2-epoxibutanol (Figura 29). Estas substâncias ainda não tiveram suas respostas eletrofisiológicas elucidadas e também não foram realizadas as confirmações através da co-injeção de compostos sintéticos.

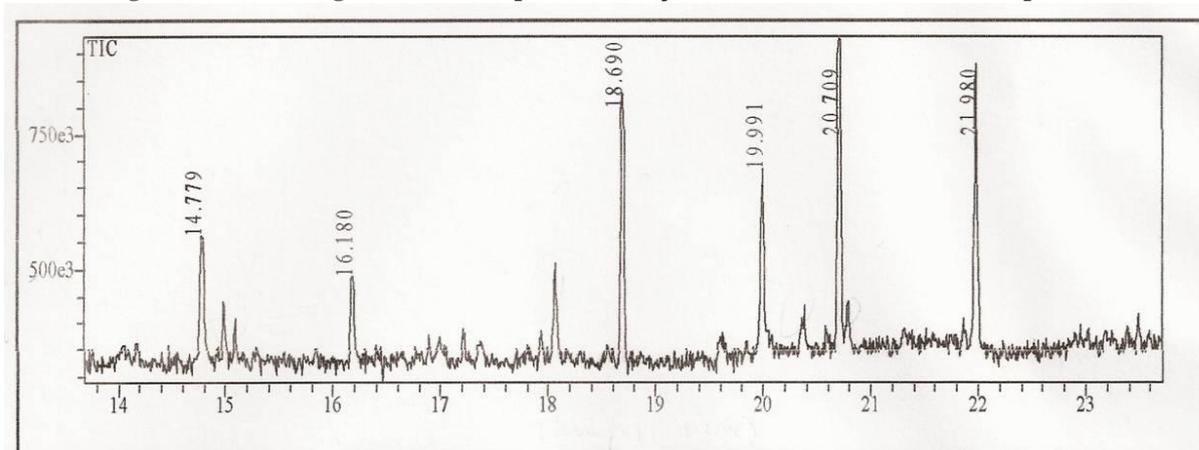
Figura 29: Estrutura química das substâncias identificadas por Paulino (2008) presentes em extrato líquido-líquido de *A. vera*.



Fonte: PAULINO, 2008.

A fração AV-2N foi submetida à análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) e obtivemos o cromatograma que mostra seis picos de compostos com possível interesse (Figura 30). A partir desta análise, concentramos nossos esforços para propor as possíveis estruturas destes compostos.

Figura 30: Cromatograma obtido a partir da fração AV-2N submetida à análise por GC

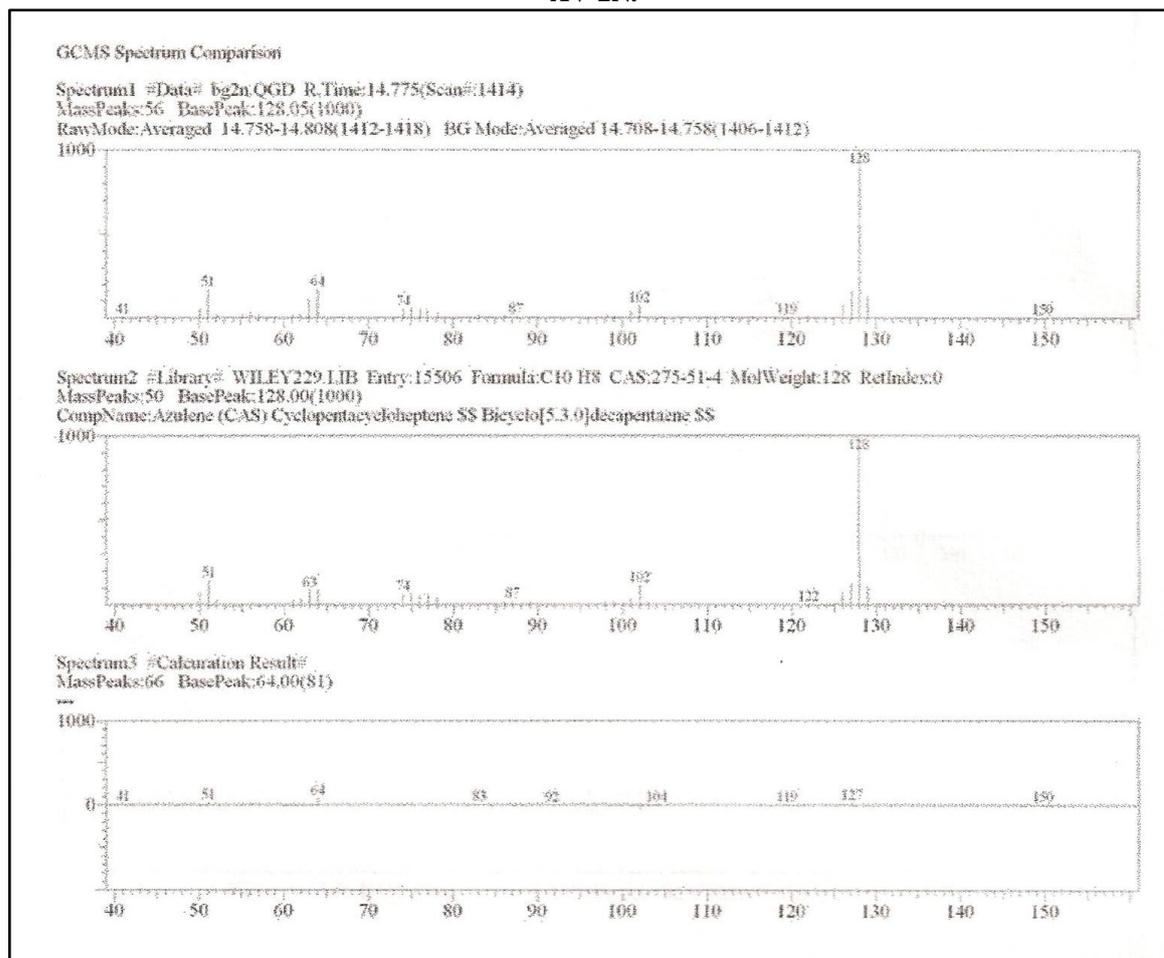


Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez obtidos os tempos de retenção e fragmentação de massas dos compostos (Figuras 31, 32, 33, 34 e 35) comparou-se estes resultados com os disponíveis na biblioteca de dados e sugeriu-se a estrutura de cinco compostos de interesse presentes na fração: o Biciclo [5.3.0] decapentaeno (Azuleno) (TR: 14.775), o *trans*-2-Decenal (TR: 16.183), Heptadecano (TR: 18.692), o 2,6-dibutil-2,5-cicloexadieno-1,4-diona (TR: 19.992) e o 4-Metil-2,6-di-*tert*-butilfenol (TR: 20.708) (Figura 36). Os compostos com tempo de retenção superior a 20.708 foram identificados como ftalatos, sendo prováveis contaminantes dos frascos de armazenamento e/ou do próprio GC/MS.

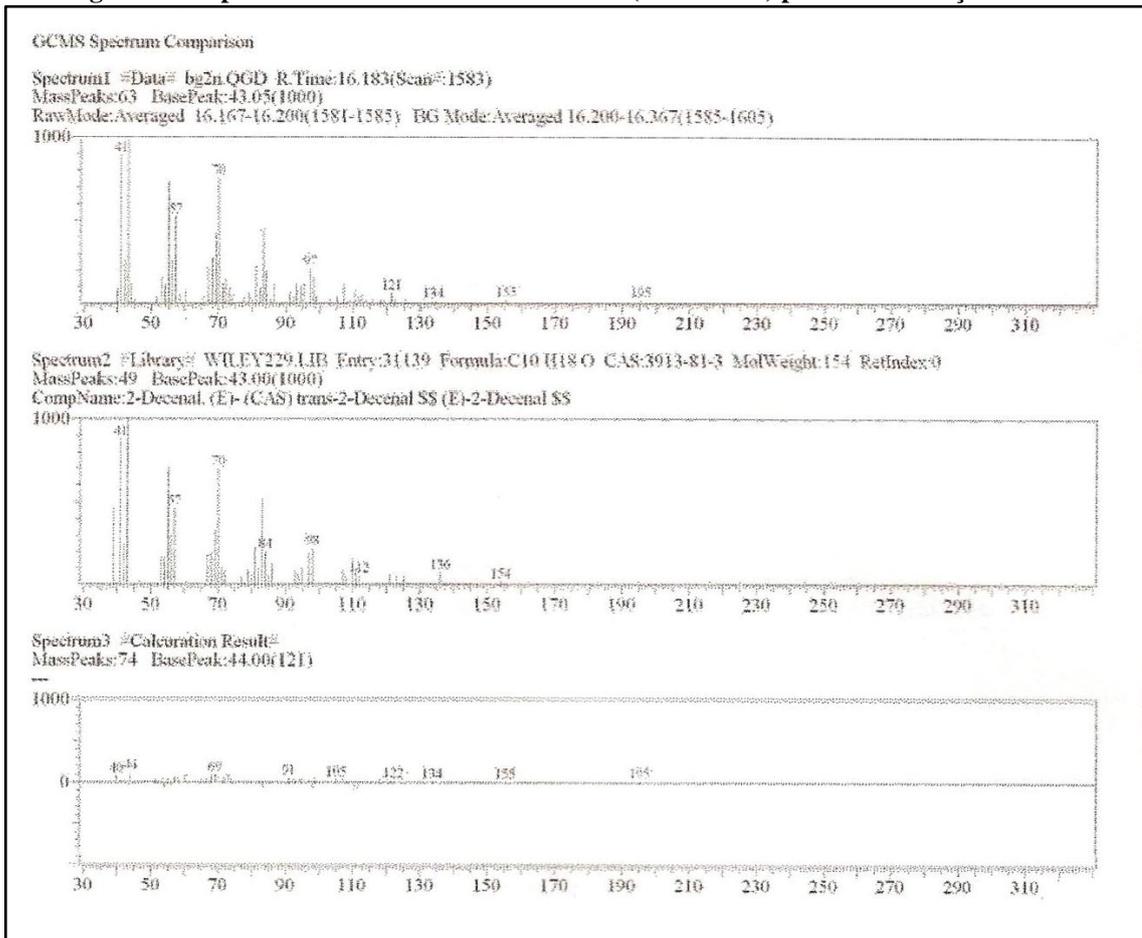
Ainda devem ser realizadas as co-injeções de padrões no GC-MS para que possamos confirmar através da comparação do tempo de retenção e da fragmentação de massa as substâncias presentes no extrato. Ainda assim, a presença dessas substâncias não confirmam necessariamente que alguma(s) delas seja(m) a(s) responsável(is) pela atividade atrativa/estimulante positiva da fração. Fazem-se necessários estudos posteriores utilizando o padrão sintético dessas substâncias em novos bioensaios de oviposição e testes eletroantagráficos, para verificação da resposta do inseto a cada um destes compostos e de combinações entre eles.

Figura 31: Espectro de massa do Biciclo [5.3.0] decapenteno (azuleno) (TR: 14.775) presente na fração AV-2N.



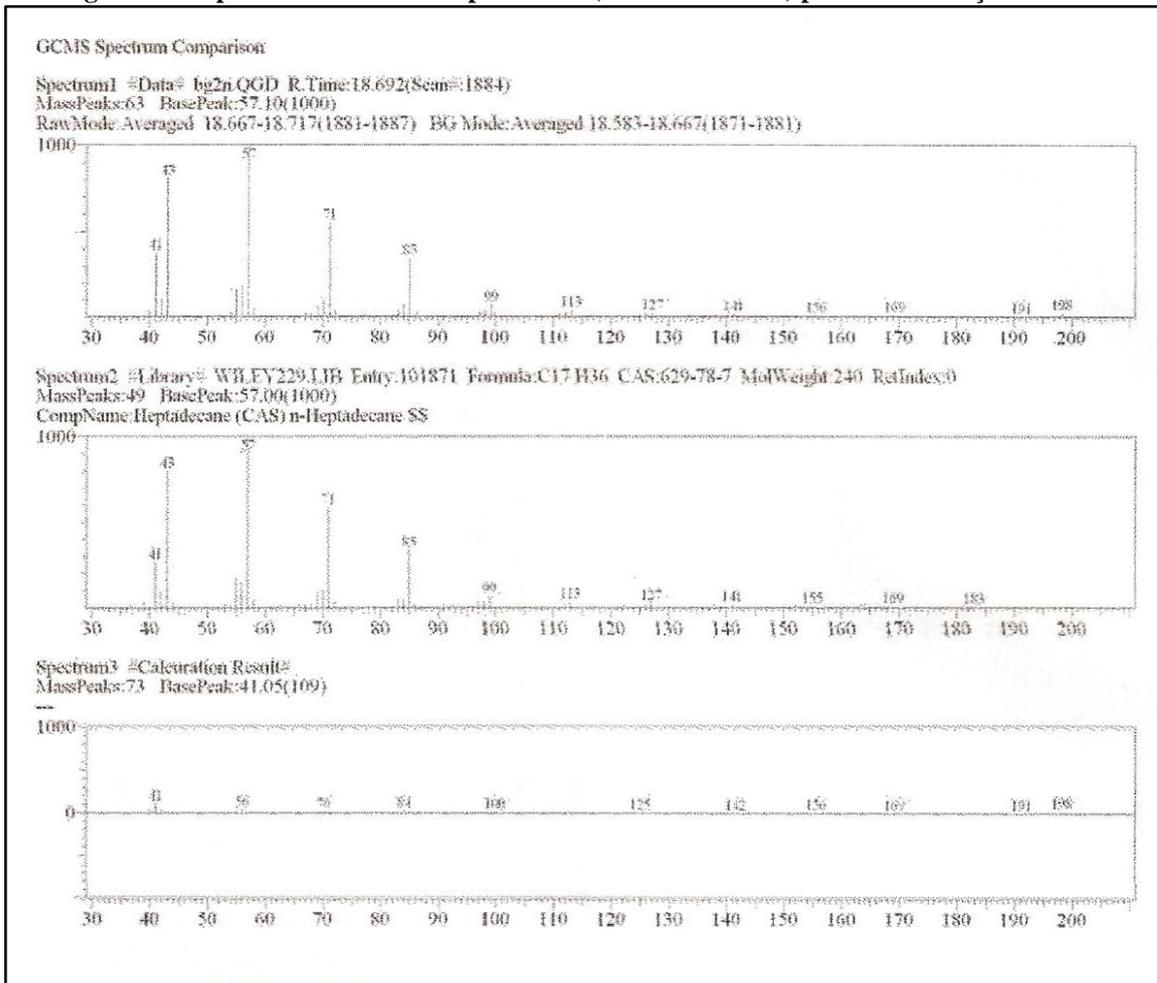
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32: Espectro de massa do trans-2-decenal (TR: 16.183) presente na fração AV-2N.



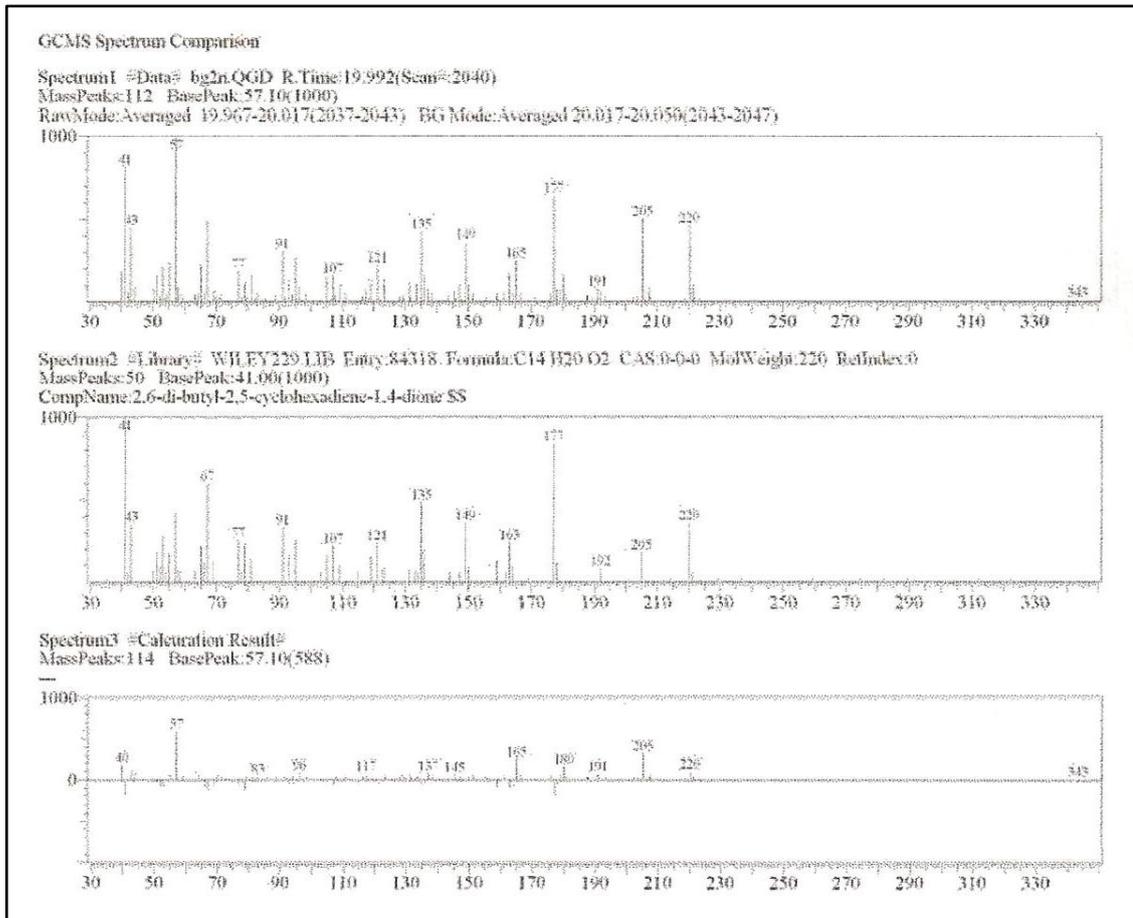
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33: Espectro de massa do heptadecano (TR: 18.692 min.) presente na fração AV-2N.



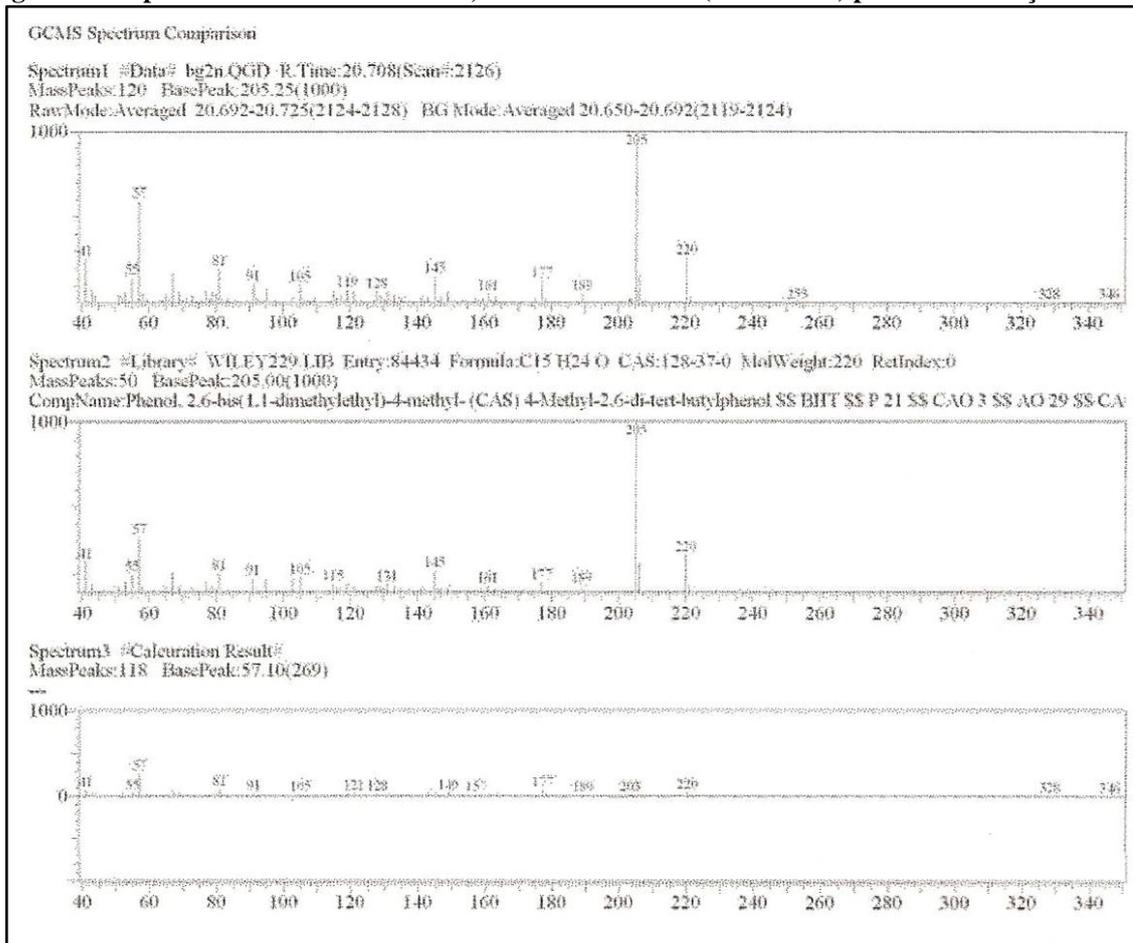
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34: Espectro de massa do 2,6-dibutil-2,5-cicloexadieno-1,4-diona (TR: 19.992) presente na fração AV-2N.



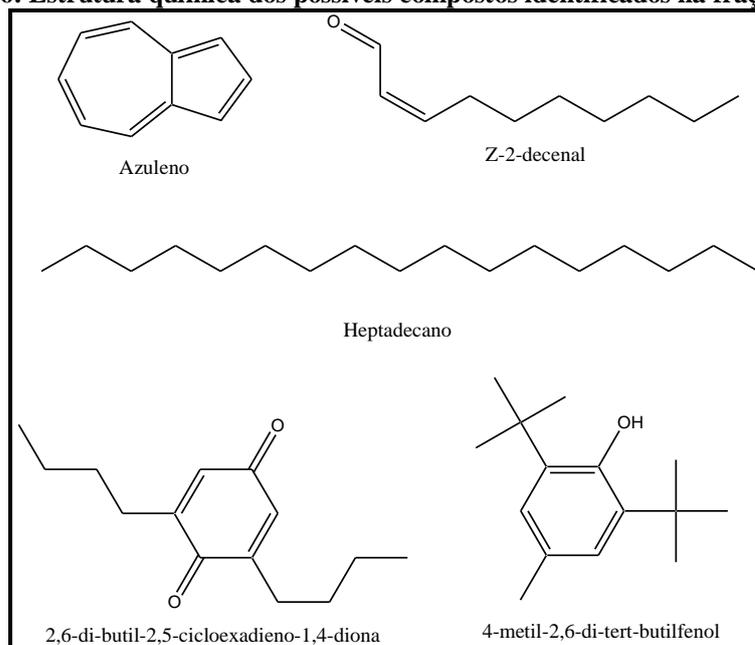
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35: Espectro de massa do 4-metil-2,6-di-terc-butilfenol (TR: 20.708) presente na fração AV-2N.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36: Estrutura química dos possíveis compostos identificados na fração AV-2N



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Bioensaios de Oviposição realizados com fêmeas do mosquito *Aedes albopictus*

Vários autores têm estudado o comportamento de oviposição do *A. aegypti* e *A. albopictus* simultaneamente. Uma vez que somente o *A. aegypti* tem sido comprovado como vetor da dengue nas Américas, ainda não existem medidas de controle específicas para o *A. albopictus*. No entanto como já foi demonstrado em condições de laboratório, populações do vetor coletados no Brasil pode transmitir verticalmente os sorotipos 1 e 4 do vírus da dengue (MITCHELL ; MILLER, 1990). Também já foi mostrado a existência de larvas coletadas na natureza infectadas com o sorotipo 1 do vírus (SERUFO *et al.*, 1993).

Considerando a importância epidemiológica que o *A. albopictus* pode ter na transmissão da dengue e outras arboviroses, procuramos também estudar seu comportamento de oviposição em laboratório. A primeira etapa foi estudar o desenvolvimento das formas evolutivas do mosquito, que obedecem a um padrão diferente ao do *A. aegypti*. Uma vez conseguindo formar colônias em laboratório, iniciamos nossos estudos de oviposição utilizando a infusão que melhor tem influenciado a oviposição de *A. aegypti* em nossos estudos, analisando a atratividade da infusão de *A. vera* frente ao comportamento de oviposição do *A. albopictus*.

5.3.1 Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de *A. albopictus* utilizando Infusão de *Aloe vera* 10% x Água Destilada

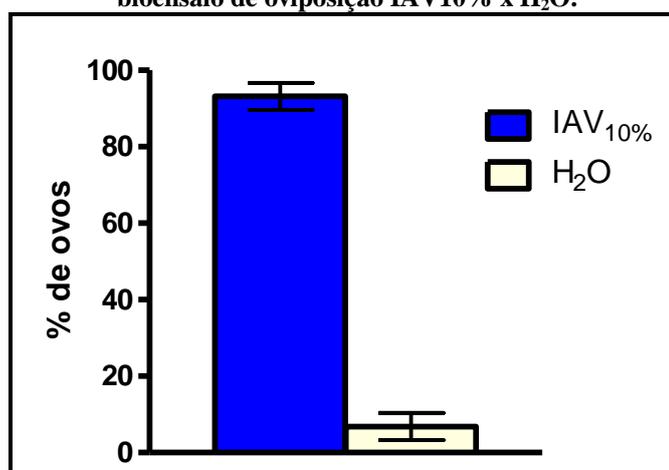
Tendo estabelecido a metodologia, iniciamos nossos estudos comportamentais utilizando como tratamento a infusão diluída a 10% em água destilada de *Aloe vera* (IAV_{10%}) e utilizando a água destilada como controle. A infusão foi preparada segundo metodologia citada anteriormente e armazenada a temperatura ambiente, sendo diluída no momento do bioensaio. Este foi realizado seguindo o método de dupla escolha, utilizando o suporte flutuante adotado nos experimentos realizados em nosso laboratório. Os copos foram dispostos diagonalmente um ao outro em cada gaiola e de forma aleatória quanto à posição de uma gaiola para a outra. Os ovos foram contados com o auxílio de uma lupa eletrônica (Tabela 11) e submetidos ao cálculo do IAO.

Tabela 11: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio IAV_{10%} x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamento	1226	868	622	699	235	320	498	367
Controle	10	86	63	01	00	00	30	154

Em seguida foram transformados para porcentagens e submetidos ao teste de Mann-Whitney para comparação de médias. A Figura 37 mostra o gráfico das médias percentuais das duas soluções, com seus respectivos EPM.

O IAO = + 0,87 mostrou que a IAV_{10%} foi altamente atrativa/estimulante para a oviposição de fêmeas de *A. albopictus* proporcionando um resultado fantástico, com a maior atratividade entre todos os tratamentos nas três espécies estudadas neste trabalho. A avaliação comparativa entre a média de ovos depositados na IAV 10% e na H₂O também se apresentou como extremamente significativa $P < 0,001$, afirmando que realmente houve predileção para oviposição no tratamento.

Figura 37: Porcentagem de ovos depositados por fêmeas de *A. albopictus* no tratamento e controle no bioensaio de oviposição IAV10% x H₂O.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de *A. albopictus* utilizando Extrato SBSE de *Aloe vera* x Água Destilada

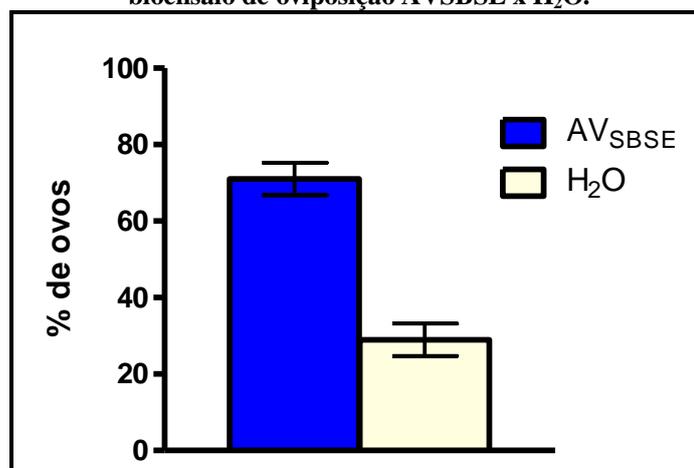
Com os resultados obtidos buscamos realizar um procedimento de extração para que fosse possível a identificação dos constituintes presentes. O primeiro método realizado foi a extração por sorção em barra de agitação (SBSE). Foram separados 400 mL da mesma infusão testada no bioensaio anterior em 4 erlenmeyers e utilizando a barra de PDMS extraiu-se os constituintes orgânicos. A dessorção foi realizada utilizando Éter etílico/HPLC. Em seguida a amostra foi concentrada em fluxo de nitrogênio e mantida a -18°C até o uso. Em cada repetição foi utilizado 500 μL do extrato etérico (AV_{SBSE}), aplicados no suporte flutuante. A mesma quantidade do solvente foi aplicada no controle. Os ovos foram contados no dia seguinte como mostra a Tabela 12.

Tabela 12: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio $AV_{\text{SBSE}} \times \text{H}_2\text{O}$

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	840	505	555	100	258	319
Controle	545	92	370	52	65	104

O resultado obtido mostrou o $\text{IAO} = +0,35$, classificando o extrato como atraente e/ou estimulante de oviposição. Quando os dados foram transformados em porcentagem e analisados pelo de Mann-Whotney o valor de P foi menor que 0,01 (**), mostrando que há diferença entre as médias percentuais. A Figura 38 mostra o gráfico das médias percentuais com os respectivos EPM obtidos no bioensaio.

Figura 38: Porcentagem de ovos depositados por fêmeas de *A. albopictus* no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AVSBSE x H₂O.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Bioensaio de Oviposição de fêmeas grávidas de *A. albopictus* utilizando extrato LLE de *Aloe vera* x Água Destilada

O resultado da extração utilizando a técnica SBSE considerou-a atrativa, no entanto tentamos outra técnica mais convencional para ver se conseguíamos obter resultados mais próximos aos conseguidos com a Infusão a 10%. Realizamos então uma Extração Líquido-líquido a partir da matriz aquosa. Partindo de 250 mL da Infusão de *A. vera* extraímos com 90 mL de Éter etílico/HPLC e em seguida concentrando o extrato em fluxo de Nitrogênio e mantendo a -18°C até o uso. No bioensaio foi utilizado 500 µL do extrato líquido-líquido de *A. vera* (AV_{LLE}) como tratamento em cada repetição, depositados no suporte flutuante. A mesma quantidade do solvente foi adicionada ao suporte do controle. A contagem de ovos foi realizada utilizando uma lupa eletrônica e os resultados estão mostrados na Tabela 13.

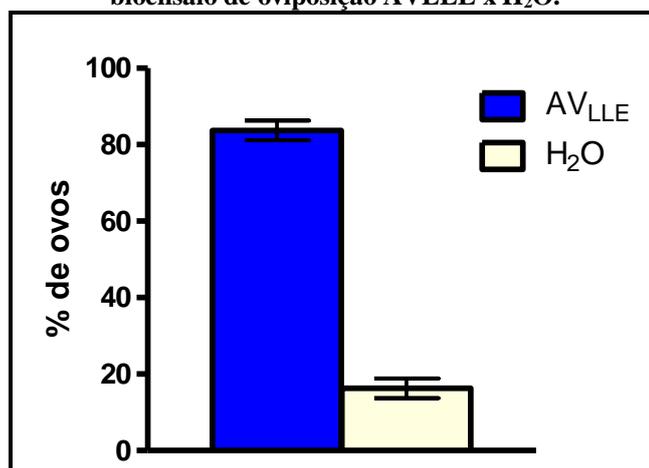
Tabela 13: ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio AV_{LLE} x H₂O

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5	6
Tratamento	671	662	551	405	490	895
Controle	147	195	127	108	60	62

O IAO com este extrato foi igual a +0,68, apontando que o extrato foi atrativo e/ou estimulante de oviposição para as fêmeas do *A. albopictus*. Os dados transformados para suas

respectivas porcentagens quando foram submetidos ao teste de Mann-Whitney apresentou o valor de $P < 0,01$ (**), mostrando que as médias entre os ovos depositados no tratamento e no controle foram diferentes, com maior oviposição na solução teste AV_{LLE} . A Figura 39 mostra o gráfico das médias percentuais com os respectivos EPM obtidos no bioensaio.

Figura 39: Porcentagem de ovos depositados por fêmeas de *A. albopictus* no tratamento e controle no bioensaio de oviposição AV_{LLE} x H_2O .



Fonte: Elaborado pelo autor.

O EAV_{LLE} apresentou melhores resultados que o EAV_{SBSE} , mas como ambos foram estatisticamente considerados significantes, os dois extratos submetidos à análise de GC-MS e estão em processos de identificação e confirmação dos compostos químicos e análise eletroanteno fisiológica, trabalho este realizado pelo grupo colaborador de Rotamsted Research.

A dificuldade na obtenção de ovos do *A. albopictus*, junto às características de desenvolvimento das formas imaturas da espécie, consistiu em obstáculos para a continuidade dos nossos estudos com o mosquito. Como é de natureza silvestre, os locais onde ocorrem os criadouros situam-se em zonas de difícil acesso e na maioria das vezes negligenciados pelas equipes de vigilância e controle de vetores. Sendo assim não dispomos de ovos para iniciar novas colônias e desenvolver melhor nossas metodologias ou aprofundarmos no estudo do comportamento de oviposição.

5.4 Bioensaio de oviposição realizado com fêmeas do mosquito *Culex quinquefasciatus*.

O comportamento de oviposição de fêmeas da espécie *C. quinquefasciatus* tem sido o mais estudado por pesquisadores, uma vez que os locais onde se localizam os grandes centros

de pesquisa possuem esta espécie como principal vetor de diversas arboviroses (MEYER, HARDY ; PRESSER, 1983; ZINZER, RAMBERG ; WILLOTT, 2004).

Du e Millar (1999) mostraram que uma mistura de 10 compostos identificados em infusão de grama bermuda (fenol, *p*-cresol, 4-etilfenol, indol, 3-metilindol, nonanal, 2-undecanona, 2-tridecanona, naftaleno e dimetiltrisulfeto) foi consideravelmente mais atraente para a oviposição de fêmeas de *C. quinquefasciatus* que estes compostos quando analisados individualmente, com a mistura apresentando média de oviposição três vezes maior. A concentração dos compostos nos testes também influenciou na atividade estimulante.

Laurence e Pickett (1982) foram os primeiros a identificar através de GC-MS o atraente de oviposição *eritro*-6-acetoxi-5-hexadecanolida, presente nas gotículas apicais dos ovos de *C. tarsalis*. O composto mostrou-se ativo na atratividade de oviposição de várias espécies de *Culex*, e ainda hoje é considerado o principal feromônio de oviposição para o gênero (BARBOSA *et al.*, 2007).

Entre as substâncias identificadas como atraentes para as espécies de *Culex*, encontram-se os compostos de origem co-específica, vegetal, bacteriana, entre outras fontes. O LaSIF realizou há alguns anos bioensaios de oviposição com extratos de águas provenientes de criadouros naturais e artificiais de *C. quinquefasciatus* e neste estudo foi identificado tanto o feromônio do mosquito (5R,6S)-6-acetoxi-5-hexadecanolida (Figura 40a), quanto seu precursor biossintético, o ácido (Z)-5-hexadecenóico (Figura 40b), este último pela primeira vez identificado em extratos de ovos do mosquito *C. quinquefasciatus*.

5.4.1 Bioensaio de oviposição de fêmeas grávidas de *C. quinquefasciatus* utilizando infusão de caule e folha de cebolinha (*Allium fistulosum*)

Em nossos estudos com esta espécie de mosquito utilizamos uma infusão preparada a partir das folhas e caule de cebolinha comum. A planta é originária da Sibéria e é largamente empregada na culinária brasileira. Apresenta folha cilíndrica e fistulosa, com 30-50 cm de altura, podendo ser cultivada a qualquer época do ano (EMBRATER, 1980). As folhas da cebolinha são comumente utilizadas na preparação de chá (PEREIRA, OLIVEIRA ; LEMOS, 2004), e seu uso tem sido empregado em diversos ramos da agricultura e horticultura (HASSE, MAY-DE-MIO ; LIMA NETO, 2007).

A sugestão do potencial atrativo da infusão de cebolinha para o *C. quinquefasciatus* ocorreu ao acaso, observando a oviposição de ovos em um recipiente contendo chá de folhas da planta, deixado em ambiente situado em área de baixa infestação do inseto, no município de Maceió. Realizou-se então bioensaios controlados em laboratório para verificar essa hipótese.

Os bioensaios foram realizados utilizando a mesma metodologia empregada para os estudos envolvendo as espécies do gênero *Aedes*, diferindo na quantificação dos dados a serem analisados (contagem de ovos). Nos bioensaios com o *C. quinquefasciatus* foram contadas a quantidade de jangadas depositadas nos recipientes do tratamento e controle. A análise estatística foi realizada através do IAO e teste *t* não-pareado. O resultado está demonstrado na tabela 14.

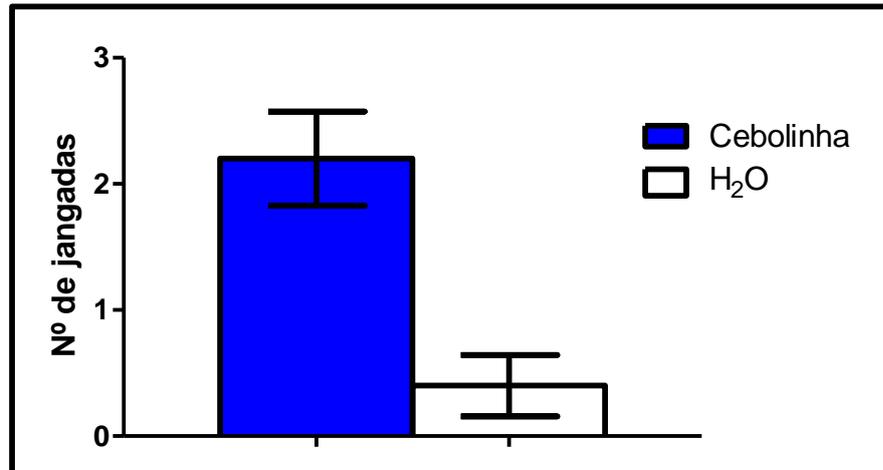
Tabela 14: Número de jangadas de ovos depositadas no tratamento e controle no bioensaio I_{Ceb} x H₂O.

Número de repetições (n)	1	2	3	4	5
Tratamento	3	2	3	1	2
Controle	0	0	1	1	0

As jangadas de ovos foram contadas e a média juntamente com o EPM são mostrados no gráfico abaixo (Figura 40).

O IAO obtido no bioensaio foi igual a 0,69, classificando a infusão de cebolinha como atraente para a oviposição de fêmeas da espécie. Como os dados seguiram uma distribuição próxima à gaussiana (normal), foram analisados pelo teste *t*, obtendo-se um valor de P menor que 0,01 (**), classificando-o como muito significativo por este parâmetro.

Figura 40: Número de jangadas de ovos depositados no tratamento e controle no bioensaio de oviposição com fêmeas de *C. quinquefasciatus*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estes estudos foram preliminares e faz-se necessário a realização de novos bioensaios com maior número de repetições, bem como a avaliação da concentração em que a infusão deve ser preparada para que possamos ter maiores informações sobre o papel de água de cebolinha mediando o comportamento de oviposição dessa espécie de mosquito. O resultado desse teste inicial aponta os estudos com esta infusão como promissores, uma vez que já se notou um potencial na atratividade de oviposição. Diferentes técnicas de preparação de amostras poderão ser aplicadas para a extração e separação dos constituintes da cebolinha.

A continuidade dos estudos com essa espécie de mosquito proverá um meio alternativo para auxiliar no controle populacional do inseto, contribuindo para a saúde pública, bem como no bem-estar de grande parte da população que habita regiões com alto índice de infestação.

6 CONCLUSÕES

- Foram realizados bioensaios de oviposição com fêmeas grávidas do mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* para observar a resposta de oviposição destas espécies frente a infusões e extratos oriundos de *Aloe vera* e determinar a capacidade estimulante e/ou atraente de oviposição. Obtivemos resultados bastante conclusivos, principalmente com a Infusão de *A. vera* e a fração AV-2N, obtida por extração ácido-base dessa infusão com as fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* e com a infusão de *A. vera* e o extrato LLE com as fêmeas do mosquito *Aedes albopictus*;
- Foi desenvolvida uma nova metodologia para formação de colônias do mosquito *Aedes albopictus*;
- Foram realizados bioensaios de oviposição com o mosquito *A. aegypti* utilizando infusões preparadas a partir do caule e folhas de bambu e constatamos que houve grande potencial atrativo/estimulante para o bioensaio realizado com a infusão de folhas, enquanto não houve seletividade nos bioensaios utilizando água proveniente do caule;
- Foi realizado bioensaio de oviposição com o mosquito *C. quinquefasciatus* utilizando infusão preparada a partir da cebolinha, onde obtivemos resultados promissores e que a partir de técnicas de preparação de amostras mais específicas, poderão ser de grande interesse no futuro.
- Foi realizada a análise de GC-MS da amostra AV-2N e a partir dela foi possível a sugestão da estrutura de cinco compostos: o Bicyclo [5.3.0] decapenteno (azuleno), o *trans*-2-decenal, o heptadecano, o 2,6-dibutil-2,5-cicloexadieno-1,4-diona e o 4-metil-2,6-di-terc-butilfenol.

7 PERSPECTIVAS

O trabalho de identificação de substâncias biologicamente ativas presentes nos extratos obtidos a partir de infusão de *Aloe vera* ainda está em desenvolvimento. As análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS), assim como estudos eletroantegráficos possibilitarão propor algumas estruturas com potencial de atividade biológica estimulante do comportamento de oviposição das fêmeas dos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*.

As substâncias Biciclo [5.3.0] decapentaeno (Azuleno), (Z)-2-Decenal, Heptadecano, 2,6-dibutil-2,5-cicloexadieno-1,4-diona e 4-Metil-2,6-di-tert-butilfenol, sugeridas durante a realização deste trabalho, bem como outras ainda em fase de identificação, deverão ser posteriormente submetidas a estudos eletrofisiológicos e seus padrões sintéticos submetidos a injeções para a comparação dos tempos de retenção e fragmentações de massa. Posteriormente deverão ser realizados novos bioensaios de oviposição em laboratório, e possivelmente de campo.

Espera-se com os resultados deste trabalho contribuir para o desenvolvimento de novos produtos que tenham por finalidade controlar as populações dos mosquitos estudados em ambientes urbanos, bem como o desenvolvimento de novas metodologias de controle vetorial para o combate à dengue. É de fundamental importância que os órgãos públicos responsáveis pelo controle desta doença, atuem em parceria com a Universidade, a fim de intensificar as medidas de controle dos mosquitos de uma forma mais racional e eficiente. O controle da dengue apenas será possível quando atuarem de forma sinérgica a tríade Governo – Universidade – População.

Os resultados deste trabalho de dissertação deverão ser submetidos sob a forma de artigo a um periódico indexado de veiculação internacional.

REFERÊNCIAS

- AGELOPOULOS, N.; BIRKETT, M. A.; HICKA, A. J.; HOOPER, A. M.; PICKETT, J. A. POW, E. .M; SMART, L. E.; SMILEY, D. W. M.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Exploiting Semiochemicals in insect control. **Pesticide Science**. v.55, p.225-235. 1999.
- ALLABY, M. **Oxford Dictionary of Ecology**. 2ª ed. Nova Iorque, 440p. 1998.
- 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.
- BARBOSA, R. M. R.; SOUTO, A.; EIRAS, A. E.; REGIS, L. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memorial do Insituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 523-529. 2007.
- 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 of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p. 151-162, 2007.
- BENTLEY, M. D.; DAY, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review Entomology**, v.34, p.401-421. 1989.
- BENTLEY, M. D.; McDANIEL, I. N.; MITSUYOSHI, Y.; LEE, H. MAYNARD, R. p-Cresol: an oviposition attractant of *Aedes triseriatus*. **Environmental Entology**, v.8, n.2, p.206-209. 1979.
- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO JR, F. P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) ao organofosforado Temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, v.34, n.2, p303-307. 2007.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.16, n.4, p.279-293. 2007.
- BRASIL. Dengue – Instruções para o pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. Brasília: **Ministério da Saúde**. 2001.
- _____. Disponível em <http://www.saude.gov.br>, acessado em 23 de agosto de 2009. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. Brasília, MS, 1999, 58p.
- _____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. 3ªEd, 236p. Brasília / DF, 2004.
- BRITTO, J. O.; TOMAZELLO FILHO, M.; SALGADO, A. L. B. Produção e caracterizaçãodo carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. **Instituto de Pesquisas Florestais**. n. 36, p. 13-17, 1997.
- CAMARGO, E.P. Doenças Tropicais. **Estudos Avançados**. v.22, n.64, p.95-110, 2008.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Suscetibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**. v.37, n.4, p.523-527. 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL - CDC. Information on *Aedes albopictus*. **Atlanta: CDC**. 2003. Disponível em: [http://www.cdc.gov/information on *Aedes albopictus*.html](http://www.cdc.gov/information%20on%20Aedes%20albopictus.html)

CHANDRE, F.; DARRIET, F.; DARDER, M.; CUANY, A.; DOANNIO, J.M.C.; PASTEUR, N.; GUILLET, P. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 359-366, 1998.

CONGRESSO DOS ESTADOS UNIDOS, Escritório de Avaliação Tecnológica. **Status of Biomedical Research and Related Technology for Tropical Diseases**. Washington, 294p. Setembro 1985.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 228p. 1994.

DEBIASI, C.; SILVA, C. G.; PESCADOR, R. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.9, n.1, p.36-43. 2007.

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.

DOS SANTOS, J. C. **Estudo do feromônio e de novos atraentes de oviposição da fêmea do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae), principal vetor da filariose linfática**. Maceió, 2008. 78p. Monografia (Bacharelado em Farmácia) Universidade Federal de Alagoas.

DU, Y. J.; MILLAR, J. G. Electroantennogram and oviposition bioassay responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to chemicals in odors from Bermuda grass infusions. **Journal of Medical Entomology**. v.36. n.2, p.158-166. 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Manual técnico de olericultura**. Rio de Janeiro-Brasília, 1980. 98p.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent Arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.2, p.224-229. 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. v.1, 2ªed. EDUSP, São Paulo, 1996.

_____. Identificação de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.20, n.3, p.244-245. 1986.

GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e Comportamento do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. v.37, p.29-36. 1985.

GANESAN, K.; MENDKI, M. J.; SURYANARAYANA, M. V. S.; PRAKASH, S.; MALHOTRA, R. C. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. **Australian Journal of Entomology**. v.45, n.1, p.75-80. 2006.

- GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J. 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.
- HASSE, I.; MAY-DE MIO, L. L.; LIMA NETO, V. C. Efeito do pré-plantio com plantas medicinais e aromáticas no controle de *Plasmodiophora brassicae*. **Summa Phytopathologica**. v.33, n.1, p.74-79. 2007.
- HOECK, P. A. E.; RAMBERG, F. B.; MERRIL, S. A.; MOLL, C.; HAGEDORN, H. H. Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. **Journal of Vector Ecology**. v. 28, p.65-73. 2003.
- HUGHES, J.H.; PORTER, J.E. Dispersal of Mosquitoes Through Transportation with Particular Reference to Immature Stages. **Mosquitoes News**. v.16, n.2, p.106-111. 1956.
- HWANG YS, SCHULTZ GW, AXELROD H, KRAMER WL ; MULLA MS. Ovipositional repellency of fatty acids and their derivatives against *Culex* and *Aedes* mosquitoes. **Environmental Entomology**. v.11, p.223-226. 1982.
- HWANG, Y.S.; KRAMER, W.L.; MULLA, M.S.; Oviposition attractants and repellents of mosquitoes. Isolation and identification of oviposition repellents for *Culex* mosquitoes. **Journal of Chemical Ecology**. v.6, p.71-80. 1980.
- IKESHOJI, T.; SAITO, K.; YANO, A. Bacterial production of the ovipositional attractants for mosquitoes on fatty acid substrates. **Applied Entomology ; Zoology**. v.10, n.3, 239-242, 1975.
- KALPAGE, K.S.P.; BRUST, R.A. Oviposition Attractant Produced by Immature *Aedes atropalpus*. **Environmental Entomology**. v.2, n.5, p.729-730. 1973.
- KLINE, 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.
- KRAMER, W. L.; MULLA, M. S. Oviposition attractants and repellents of mosquitoes: oviposition responses of *Culex* mosquitoes to organic infusions. **Environmental Entomology**. v.8, n.6 p.1111-1117. 1979.
- LACEY, A. L.; UNDEEN, A. H. microbial control of black flies and mosquitoes. **Annual Review of Entomology**. v.31, p.265-296. 1986.
- LAURENCE, B.R.; PICKETT, J.A. Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.1, p.59-60. 1982.
- LEAL, W.S. BARBOSA, R.M.R.; XU, W.; *et al.* Reverse and Conventional Chemical Ecology Approaches for the Development of Oviposition Attractants for *Culex* Mosquitoes. **Chemical Ecology of Mosquitoes**. v.3, n.8, p.1-11. 2008.
- LIMA, J.B.P.; SILVA JÚNIOR, R.C.; GALARDO, A.K.P.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.A. Resistance 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.

LINDH, J.M. ; KÄNNASTE, A. ; KNOLS, B.G.J. ; FAYE, I. ; BONG-KARLSON, A.K. Oviposition Responses of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) and Identification of Volatiles from Bacteria-Containing Solutions. **Journal of Medical Entomology**. v.45, n.6, p.1039-1049. 2008.

LOUNIBOS, L.P. Invasions by Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**. v. 47, p.233-266. 2002.

LOZOVEI, A. L. Culicídeos (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. *Entomologia Médica e Veterinária*. Atheneu, 2001. 432 p. p. 59-103.

MACKENZIE, J.S.; GUBLER, D.J.; PETERSEN, L.R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**. v.10, p.98-109. 2004.

MARTINS, V. E. P.; MARTINS, M. G.; ARAÚJO, J. M. P; SILVA, L. O. R.; MONTEIRO, H. A. O.; CASTRO, F. C.; VASCONCELOS, P. F. C.; GUEDES, M. I. F. First report of *Aedes albopictus* in the state of Ceará, Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v.40, n.4, p.1-3. 2006.

MBOERA, L. E. G. **Chemical ecology of the behaviour of the filariasis mosquito *Cx. quinquefasciatus*** Say. Holanda, 1999, 189p., Tese (Doutorado). -Wageningen Agricultural University, Laboratory of Entomology.

MBOERA, L. E. G.; TAKKEN, W.; MDIRA, K. Y.; CHUWA, G. J.; PICKETT, J. A. Oviposition and behavioral responses of *Culex quinquefasciatus* to skatole and synthetic oviposition pheromone in Tanzania. **Journal of Chemical Ecology**. v.26, n.5, p.1193-1203. 2000.

McCALL, P.J.; CAMERON, M.M. Oviposition pheromone in insect vectors. **Parasitology Today**. v.11, n.9, p.352-355. 1995.

MENDKI, M. J.; GANESAN, K.; PRAKASH, S.; SURYANARAYANA, V. S.; MALHOTRA, R. C. ; RAO, K. M.; VAIDYANATHASWAMY, R. Heneicosane: An oviposition-attractant pheromone of larval origin in *Aedes aegypti* mosquito. **Current Science**. v.78, p.1295-1296. 2000.

MEYER, R. P.; HARD, J. L.; PRESSER, S. B. Comparative Vector Competence of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* from the Coachella, Imperial and San Joaquin Valleys of California for St. Louis Encephalitis Virus. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V.32, n.2, p. 305-311. 1983.

MILLAR, J. G.; CHANEY, J. D. MULLA, M. S. Identification of Ovipositions Attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented Bermuda grass infusions. V.8, n.1, p.11-17. 1992.

MITCHELL, C. J. Vector competence of North and South América strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.7, n.3, p.446-451. 1991.

MITCHELL, C. J.; MILLER, B. R. Vertical transmission of dengue viruses by starins of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.6, n.2, p.251-253. 1990.

MOORE C. G.; MITCHELL, C. J. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. **Emergence Infectious Disease**. v.3, p.329-334. 1997.

MORDUE LUNTZ, A. J. Arthropod semiochemicals: mosquitoes, midges and sealices. **Biochemical Society Transactions**, v.31, part 1, p.128-133. 2003.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging Infectious Disease**. V.1, n.1. 1995.

NASCIMENTO, G. S. **Estudo de Atraveses de Oviposição para o Controle Populacional do Principal Vetor da Dengue: O Mosquito *Aedes aegypti***. Maceió, 2006. 45p. Monografia (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Alagoas.

NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; DUQUE L, J.E. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.53, n.1, p.1-6. 2009.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11ª edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

OLAGBEMIRO, T.O.; BIRKETT, M.A.; MORDUE (LUNTZ), A.J.; PICKETT, J.A. Laboratory and field responses of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, to plant-derived *Culex* spp. Oviposition pheromone and the oviposition cue skatole. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, n.5, p.965-976. 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE². **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2ª edição. Geneva : World Health Organization. 1997. 84 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE¹. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. Geneva: World Health Organization. 1997. 136 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE³. Resistencia de vectores de enfermedades a los plaguicidas (10º Informe del Comitê de Expertos de la OMS em Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial). **Serie de Informes Técnicos**. nº 818. 1992.

OTIENO, W.A.; ONYANGO, T.O.; Pile, M.M.; LAURENCE; DAWSON, G.W.; WADHAMS, L.J.; Pickett, J.A. A field trial of the synthetic oviposition pheromone with *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in Kenya. **Bulletin of Entomological Research**, v.78, 463-470, 1988.

PAULINO, S. S. **Estudo de Novos Atraveses de Oviposição de Fêmeas do Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. Maceió, 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campo de Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.14, supl. 01, p. 40-44, 2004.

PIZARRO, A. P. B.; FILHO, A. M. O.; PARENTE, J. P.; MELO, M.T.V.; SANTOS, C. E.; LIMA P.R. *O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, 23-29, 1999.

PONNUSAMY, L.; XU, N.; NOJIMA, S.; WESSON, D. M.; SCHAL, C.; APPERSON, C. S. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. **The Proceedings of the National of Sciences**. v.105, n. 27, p.9262-9267. 2008.

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, 11-16, 2004.

PURI, S.N.; MENDKI, M.J.; SUKUMARAN, D.; GANESAN, K.; PRAKASII, S.; SEKILAR, K. Eletroantennogram and Behavioral Responses of *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) Females to Chemicals Found in Human Skin Emanations. **Journal of Medical Entomology**, v.43, n.2, p.207-213. 2006.

RATHBURN Jr., C. B. Insecticide Formulations – types and uses: a review. **Journal of American Mosquito Control Association**. v.1, n.1, p.80-84. 1985.

ROSE, R. I. Pesticides and Public Health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Disease**. v.7, n.1, p.17-23. 2001.

ROZENDAAL, J. A. Vector Control Methods for Use by Individuals and Communities. **Organização Mundial de Saúde**. Geneva, 1997.

SANTOS, R. La C. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública**. v.37, n.5, 2003.

SERUFO, J. C.; OCA, H. M.; TAVARES, V. A.; SOUZA, A. M.; ROSA, R. V.; JAMAL, M. C. Isolation of dengue type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in the Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**. v.88, n.3, p.503-504. 1993.

SHARMA, K. R.; SEENIVASAGAN, T.; RAO, A. N.; GANESAN, K.; AGRAWAL, O. P.; PRAKASH, S. Mediation of Oviposition Responses in the Malaria Mosquito *Anopheles stephensi* Liston by Certain Fatty Acid Esters. **Parasitology Research**. v.104, p.281-286. 2009.

SHARMA, K. S.; SEENIVASAGAN, T.; RAO, A. N.; GANESAN, K.; AGARWAL, O. P.; MALHOTRA, R. C.; PRAKASH, S. Oviposition Responses of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to Certain Fatty Acid Esters. **Parasitology Research**. v.103, p.1065-1073. 2008.

SILVA, A. M.; NUNES, V.; LOPES, J. Culicídeos associados a entrenós de bambus e bromélias, com êfase em *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) na Mata Atlântica, Paraná, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**. V.94, n.1, p.63-66. 2004.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. **Avaliação da estratégia global de controle integrado de Malária no Brasil**. Brasília. Organização Pan-Americana de Saúde, 120p. 2001.

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

SPRENGER D.; WUITHIRANYAGOOL, T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.2, n.2, p.217-219. 1986.

TAIPE-LAGOS, C. B.; NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista Saúde Pública**. v.37, n.3, p.275-279. 2003.

TORRES-ESTRADA, J. S.; MEZA-ALVARES R. M.; CIBRIÁN-TOVAR, J.; ROJAS-LEON, M. H. Vegetation-derived cues for the selection of oviposition substrates by *Anopheles albimanus* under laboratory conditions. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v.21, p.344-349. 2005.

TOWNSON, H.; NATHAN, M. B. Resurgence of Chikungunya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.102, n.4, p.308-309. 2008.

TREXLER, J. D.; APPERSON, C. S.; GEMENO, C.; PERICH, M. J.; CARLSON, D.; SCHAL, C. Field and Laboratory Evaluations of Potential Oviposition Attractants for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Associations**. V.19, n.3, p. 228-234. 2003.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS-DA-ROSA A. P. A. T.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS-DA-ROSA, E. S. T.; DEGALLIER, N. TRAVASSOS-DA-ROSA, J. F. T. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Caderno de Saúde Pública**. v.17, p.155-164. 2001.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, M. T. **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2ª Edição, 206p. 2001.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **An Introduction to Insecticides**, 4ªed. 2004. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>, acessado em agosto de 2009.

ZINZER, M.; RAMBERG, F. WILLOT, E. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. **Journal of Insect Sciences**. V.4, n.20. 2004.