

Yoná Garcia Simom

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E MECANISMOS
DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus
staigeriana* CONTRA O MOSQUITO *Aedes aegypti***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos H. L. Soares

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Simom, Yoná Garcia

AValiação DO POTENCIAL LARVICIDA E MECANISMOS DE
TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus staigeriana*
CONTRA O MOSQUITO *Aedes aegypti* / Yoná Garcia Simom ;
orientador, Agenor Furigo Jr ; coorientador, Carlos H.
L. Soares . - Florianópolis, SC, 2016.

139 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. *Aedes aegypti*. 3. *Eucalyptus*
staigeriana. 4. Atividade Larvicida. I. Furigo Jr, Agenor
. II. H. L. Soares , Carlos . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família: Pai, Mãe, obrigada por estarem em minha vida sempre me apoiando com amor, carinho, atenção e força. Vocês estão em meu coração.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos H. L. Soares, o meu orientador nesta caminhada, obrigada pelas oportunidades que me proporcionou, e em especial pela sua valiosa amizade e acolhimento em seu laboratório. Minha imensa gratidão, respeito e carinho.

Ao Prof. Dr. Agenor Fúrigo Jr. pela orientação e oportunidade junto ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química.

A Prof^a Dr^a Kiev Resende Souza de Moura pelos valiosos ensinamentos em técnicas histológicas, pelo auxílio nos cortes histológicos, pela companhia e conversas. Minha imensa gratidão.

A minha querida e competente amiga Ivana Baptista por toda ajuda nos experimentos com microalgas, pelas conversas e desabafos. Obrigada!

A grande amiga Tatiana Pineda pelas ajudas no decorrer da construção do qualify e tese e ajuda nos experimentos com fungos, por sua compreensão e pela sua amizade. Obrigada!

Aos meus queridos amigos Wilson Weis e Adolfo (Adolfinho) pela ajuda, por me aguentar nos momentos de tensão, pelas brincadeiras, conversas e pelos sorrisos largos. Minha imensa gratidão.

A amiga Tania Gonçalves dos Santos pelas muitas conversas por telefone, onde minhas dúvidas e questionamentos em entomologia eram sanados. Pela vasta bibliografia sobre insetos. Minha imensa gratidão.

A querida colega Kalina Brauko pela ajuda na parte estatística da tese e pelos “você que não entendeu...”. Minha imensa gratidão. Muito obrigada!

Aos colegas Chirle, Demétrio e Emily, técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB II) pela companhia, cafés, conversas, por serem sempre tão prestativos e atenciosos. Obrigada!

A minha querida amiga Valdelúcia Grinevicius pela companhia, almoços, cafés e conversas que acalmavam o meu coração. Minha imensa gratidão.

Ao amigo Rodrigo Willamil pela ajuda com os primeiros cortes histológicos. Obrigada!

Ao amigão Bruno Dal Paz pela ajuda no momento final da construção da tese.

Ao querido Edevilson Silva pela ajuda junto a Secretaria da Pós Graduação. Obrigada!

Aos grandes amigos (as) Mari, Mônica, Camila Milioli, Dilma, Lelo, Bety, Helena, Bru que tiveram presença marcada nos momentos bons e também nos mais difíceis durante todos estes anos. Vocês com certeza estarão sempre no meu coração.

Aos professores, por terem gentilmente aceitado fazerem parte da banca examinadora deste trabalho. Exprimo aqui o meu reconhecimento.

É necessário uma enorme força de vontade e um amor profundo por si mesmo e por aqueles que nos amam e querem que estejamos bem. É necessário uma dose muito grande de perdão. É necessário tentar esquecer uma página do livro da própria vida, rasgá-la, queimá-la. E depois, é preciso aprender a viver sem essa parte, viver uma vida nova e diferente.

Leticia Thomp

RESUMO

A busca por metodologias para a eliminação das larvas do mosquito *Aedes aegypti* é uma estratégia utilizada por vários pesquisadores. Extratos ou óleos essenciais de plantas surgem como uma alternativa aos inseticidas sintéticos, a fim de diminuir a velocidade de seleção de populações resistentes aos inseticidas químicos, organofosforados e piretróides. Diversos estudos já foram realizados e descritos na literatura, demonstrando os efeitos dos extratos obtidos com vegetais do gênero *Eucalyptus* sobre vários organismos, incluindo mosquitos e suas larvas. Entretanto, estudos com a espécie *Eucalyptus staigeriana* sobre o efeito larvicida em larvas do mosquito *A. aegypti* não foi ainda descrito. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar experimentalmente o efeito larvicida do óleo essencial comercial de *E. staigeriana*, solução aquosa, em larvas de terceiro/quarto instar de *A. aegypti*, bem como a toxicidade aguda, utilizando-se bioindicadores de níveis tróficos diferentes como: microalgas e fungos. Também teve como objetivo de caracterizar os efeitos biológicos utilizando biomarcadores de alterações metabólicas, como as enzimas: desidrogenase láctica (LDH), fosfatase alcalina (FA), colinesterase (COL) e de estresse oxidativo, tais como: glutationa reduzida (GSH) e catalase (CAT) e os níveis de proteínas totais. Através de análises histológicas foram analisadas e caracterizadas as alterações morfológicas no tubo digestório mediano das larvas de *A. aegypti*, expostas a solução aquosa de *E. staigeriana*, bem como o controle, em jejum e alimentado. As concentrações utilizadas do óleo essencial de *E. staigeriana* foram de 100, 74, 49 e 30 µg/mL, para atividade larvicida, já para os teste de toxicidade aguda foram de 100, 67, 50, 25 e 12 µg/mL. Os bioindicadores utilizados foram a microalga *Scenedesmus subspicatus* e o fungo *Fusarium oxysporum*. O extrato aquoso de *E. staigeriana* se mostrou-se eficaz como larvicida, sendo encontrada a CE50 de 45,92 µg/mL. Com relação à toxicidade aguda em *S. subspicatus* o extrato aquoso *E. staigeriana* mostrou de média a alta toxicidade, sendo que para o *F. oxysporum* não mostrou toxicidade. A redução da atividade de LDH para larvas expostas a solução aquosa mostrou ser um efeito metabólico, indicando, portanto, que a mortalidade não foi decorrente de possível hipóxia. A FA teve sua atividade reduzida, provavelmente, em função das alterações morfológicas relativas ao sistema digestório. A COL teve sua atividade elevada, mostrando aparentemente, num primeiro momento, que o extrato aquoso não é um larvicida neurotóxico. O aumento significativo de GSH em relação ao controle indica um mecanismo de adaptação a

um estresse oxidativo. A CAT mostrou-se com atividade elevada no tempo de 48 horas, em todas as concentrações testadas. Provavelmente isso se deve à exposição ao óleo, ou ainda por significar que o óleo de alguma maneira faz o papel do alimento, já que no controle alimentado sua atividade também aumentou ao longo do experimento. O perfil de alteração nos níveis de proteínas totais com o tempo foi diferente em cada uma das concentrações, ou seja, não foi observada uma tendência claramente definida de variação. Nas análises histológicas observamos alterações ao longo do intestino mediano da larva de *A. aegypti*, nas concentrações avaliadas e nos diferentes tempos de exposição, alterações tais como: modificações na forma das células, aumento das invaginações no tecido epitelial, grande quantidade de vacúolos e aumento de secreção apócrina.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. *Eucalyptus staigeriana*. Atividade Larvicida

ABSTRACT

The search for methods to eliminate the mosquito larvae of *Aedes aegypti* is a strategy used by many researchers. Extracts of essential oils from plants emerge as an alternative to chemical insecticides in order to reduce the natural selection of resistant populations to chemical pesticides, organophosphates and pyrethroids. Several studies have already been carried out and described in the literature, demonstrating the effects of the extracts obtained from vegetables of *Eucalyptus* genus on various organisms, including mosquitoes and their larvae. However, studies with *Eucalyptus staigeriana* as a larvicide for mosquito larvae of *A. aegypti* has not yet been described. Therefore, the aim of this study was to experimentally evaluate the larvicidal effect of commercial essential oil of *Eucalyptus staigeriana*, aqueous solution, in larvae of the third / fourth instar of *Aedes aegypti*, as well as its acute toxicity, using bio-indicators of different trophic levels as microalgae and fungi. Also characterizing the biological effects using metabolic change biomarkers such as the enzymes lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), cholinesterase (COL) and oxidative stress such as reduced glutathione (GSH) and catalase (CAT) and total protein levels. Additionally, morphological changes in the median digestive tube of *Aedes aegypti* larvae exposed to aqueous extract of *E. staigeriana* and control were analyzed and characterized through histological analyzes, in fasting and fed conditions. The concentrations of the essential oil of *E. staigeriana* that were used: 100, 74, 49 and 30 μ g / ml for larvicidal activity, while for acute toxicity test was 100, 67, 50, 25 and 12 μ g / ml. The bio-indicators used were the microalgae *Scenedesmus subspicatus* and the fungus *Fusarium oxysporum*. The aqueous extract of *E. staigeriana* proved to be effective as larvicide, and the 45.92 mg / mL EC50 was found. Regarding the acute toxicity for *S. subspicatus* the aqueous extract *E. staigeriana* showed high toxicity, and for *F. oxysporium* showed no toxicity. The reduction of LDH activity in larvae exposed to the aqueous extract showed to be a metabolic effect, thus indicating that mortality was not possible due to hypoxia. The FA activity was reduced probably due to the morphological changes related to the digestive system. The COL exhibited high activity, showing apparently that the aqueous extract is not a neurotoxic larvicide. The significant increase of GSH compared to the control indicated a mechanism of adaptation to oxidative stress. CAT showed high activity at time of 48 hours in all tested concentrations; probably this is due to exposure to oil, or it means that the oil promoted the same effect that the

food may do, since in the control group of larvae which was fed its activity also increased throughout the experiment. The change in profile of total protein levels during the exposure time was different in each one of the concentrations, ie, there was no clearly defined variation tendency. Histological analyzes demonstrated changes over the median intestine of *A. aegypti* larvae in all the evaluated concentrations and different exposure times, changes such as alterations in cell shape, increased invaginations in epithelial tissue, lots of vacuoles, increase of apocrine secretion.

Keywords: *Aedes aegypti*. *Eucalyptus staigeriana*. Larvicidal Activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo Biológico do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 2 - Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	27
Figura 3 - Fases Evolutivas do <i>Aedes aegypti</i>	27
Figura 4 - Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 5 - Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	30
Figura 6 - Representação esquemática dos compartimentos do intestino do inseto	42
Figura 7 - Modelos de processos secretores das enzimas digestivas de insetos.	43
Figura 8 - Etapas do crescimento das larvas	46
Figura 9 - Placa de Petri com meio de cultura e o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	49
Figura 10 - Biorreatores para crescimento de algas	50
Figura 11 - Espectro UV-Visível da mistura final água/óleo	60
Figura 12 - Evolução da mortalidade (não cumulativa) das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	62
Figura 13 - Evolução da mortalidade (não cumulativa) das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	63
Figura 14 - Evolução da mortalidade (não cumulativa) das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	65
Figura 15 - Efeito da toxicidade do extrato aquoso do <i>Eucalyptus staigeriana</i> em larvas de terceiro/quarto instar de <i>Aedes aegypti</i>	67
Figura 16 - Efeito da toxicidade da solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	69
Figura 17 - Crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporium</i> em contato com solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em diferentes concentrações	70
Figura 18 - Taxa de crescimento da alga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 48h de exposição à solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	72
Figura 19 - Valores relativos da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	76
Figura 20 - Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	79
Figura 21 - Taxa de respiração (média±SE; µl/larva/h) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> , <i>Aedes triseriatus</i> e <i>Aedes taeniorhynchus</i>	80
Figura 22 - Valores relativos da atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA), em larvas de <i>aegypti</i>	82
Figura 23 - Atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	85
Figura 24 - Valores relativos da atividade enzimática da colinesterase (COL) em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	87
Figura 25 - Valores relativos da atividade da glutatona reduzida (GSH) em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	90

Figura 26 - Valores relativos da atividade enzimática da catalase (CAT) em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	93
Figura 27 - Atividade enzimática da catalase (CAT) em larvas de <i>Aedes aegypti</i> do grupo controle.....	94
Figura 28 - Níveis de proteínas das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	96
Figura 29 - Fotomicrografia intestino mediano da larva de <i>Aedes aegypti</i> de 3º/4ºinstar, controle.....	98
Figura 30 - Fotomicrografia do intestino mediano de larvas de 3º/4ºinstar de <i>Aedes aegypti</i> , controle.....	98
Figura 31 - Fotomicrografia das modificações celulares da parte proximal do intestino mediano de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	103
Figura 32 - Fotomicrografia das alterações celulares da parte média do intestino mediano de <i>Aedes aegypti</i>	104
Figura 33 - Fotomicrografia das alterações celulares na parte posterior do intestino mediano da larva de <i>Aedes aegypti</i>	105
Figura 34 - Invaginações na região basal do tecido epitelial da parte média do intestino mediano de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	106
Figura 35 - Secreções apócrinas na parte distal do intestino mediano de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de cultura para o crescimento do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> .	48
Tabela 2 - Média da quantidade (não cumulativa) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> mortas em cada concentração do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> no tempo de 48h.	61
Tabela 3 - Média de mortalidade (não cumulativa) de larvas de <i>Aedes aegypti</i> mortas em cada concentração do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> no tempo de 48h.	64
Tabela 4 - Média da quantidade (não cumulativa) de larvas de <i>Aedes aegyptii</i> mortas em cada concentração do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i> no tempo de 48h.	66
Tabela 5 - Concentração Efetiva 50% (CE50), em µg/mL, do teste de avaliação de toxicidade da solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i> em larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 48 horas.	67
Tabela 6 - Concentração Efetiva (CE50), em µg/mL, do teste de avaliação da taxa de crescimento da alga <i>Scenedemus subspicatus</i> em 48 horas de exposição a solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i> .	73
Tabela 7 - Resultados das análises de variância para atividades de lactato desidrogenase (LDH), fosfatase (FA) e colinesterase (COL).	77
Tabela 8 - Resultados da análise de variância para atividades de glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT) e proteína totais.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ACE - Acetilcolinesterase
BChE – Butirilcolinesterase
B.t.i – *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
CE50 – Concentração Efetiva 50% de mortalidade
CE99 – Concentração Efetiva 99% de mortalidade
CAT – Catalase
COL – Colinesterase
ChE – Colinesterase
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
FA – Fosfatase Alcalina
GSH – Glutathiona Reduzida
GST – Glutathiona Transferase
IGR – Insect Growth Regulator
LDH – Lactato Desidrogenase
MP – Membrana Peritrófica
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
SNK – Student-Newman-Keuls
SOD – Superóxido Dismutase
TCA – Taxa de Crescimento Algal
USEPA – Agência de proteção Ambiental Americana
WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	24
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Biologia e Morfologia do <i>Aedes aegypti</i>	25
3.1.1 Ovos	26
3.1.2 Larvas	27
3.1.3 Pupas	28
3.1.4 Mosquito Adulto	29
3.2 Histórico da Ocorrência do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	31
3.3 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	33
3.4 Gênero <i>Eucalyptus</i>	35
3.5 Bioindicadores, Biomarcadores e Estresse Oxidativo.....	36
3.6 Enzimas como Biomarcadores.....	39
3.7 Sistema Digestório dos Insetos	40
MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	45
4.2 Otimização para obtenção da solução aquosa a partir do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	45
4.3 Material Biológico	45
4.4 Bioensaios.....	45
4.4.1 Atividade larvicida	46
4.4.2 Avaliação do crescimento micelial do fungo	48
4.4.3 Avaliação do crescimento algal	49
4.5 Atividade Antioxidante	52
4.5.1 Catalase (CAT)	52
4.5.2 Glutathiona Reduzida (GSH)	53
4.6 Ensaios Enzimáticos	53
4.7 Quantificação Proteínas Totais	54
4.8 Técnicas Histológicas	54
4.8.1 Material	54
4.8.2 Métodos	55
4.9 Análises Estatísticas.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Otimização para obtenção da solução aquosa a partir do óleo essencial de <i>Eucalyptus staigeriana</i>	59
5.2 Otimização do Bioensaio de Toxicidade para Larvas de <i>A. aegypti</i>	60
5.3 Bioensaios de Toxicidade e Avaliação Bioquímica	66
5.3.1 - Atividade Larvicida	66
5.3.2 – Avaliação do crescimento micelial do fungo	69

5.3.3 – Avaliação do crescimento algal.....	71
5.4 Enzimas como Biomarcadores de Toxicidade	74
5.4.1 – Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).....	75
5.4.2 – Fosfatase Alcalina (FA)	81
5.4.3 – Colinesterase (COL)	86
5.5 Biomarcadores de Estresse Oxidativo	88
5.5.1 – Glutathiona Reduzida (GSH).....	89
5.5.2 – Catalase (CAT)	92
5.6 – Proteínas Totais	95
5.6 Histologia do Sistema Digestório de <i>Aedes aegypti</i>	97
5.6.1 Padronização da metodologia	97
5.6.2 Descrição Histológica do Intestino da Larva de <i>Aedes aegypti</i>.....	97
5.6.3 Alterações Histológicas observadas nas Larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas a solução aquosa de <i>Eucalyptus staigeriana</i>.....	101
CONCLUSÃO	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	111
REFERÊNCIAS	113

INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos da Ordem Diptera, Família Culicidae, e estão distribuídos por todas as regiões do globo. A área Neotropical é a que detém o maior nível de endemidade. São conhecidos por diversos nomes populares, como pernalongos, muriçocas, mosquitos-pregos, zancudos, carapanãs e sovelas, dependendo da região. Os adultos alados, na grande maioria, são hematófagos e nas suas fases imaturas, aquáticos. (WARD *et. al.*, 1982; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; MARCONDES, 2001).

A Família Culicidae apresenta grande interesse em Saúde Pública, por apresentar o maior número e os mais importantes insetos hematófagos entre todo o Filo Arthropoda. (EIRAS, 2005).

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é originário da África, possivelmente da região da Etiópia, e acompanhou a migração humana pelo mundo desde as primeiras alterações antrópicas acontecidas em seu ambiente natural. Entre os culicídeos, é conhecido como a espécie mais integrada ao ambiente do ser humano. (NATAL, 2002; FERNANDES, 2006) e é o mais importante vetor dos agentes etiológicos da dengue e da febre amarela urbana. Trata-se de uma espécie cosmopolita, de hábitos diurnos, sendo muito bem adaptada ao domicílio humano. (PINA, 1999).

As fêmeas de *A. aegypti* não ovipõem em ambiente aquático, e sim em áreas de prováveis criadouros. Seus criadouros são transitórios, dependentes diretos das chuvas, pois suas larvas e pupas são aquáticas. Em função disso, a população de mosquitos adultos sofre flutuação grande e abrupta de densidade durante o ciclo anual, ou seja, seu ciclo anual é controlado pela quantidade de chuvas e pela temperatura ambiente. (LORENÇO-DE-OLIVEIRA, 1995; FORATTINI, 2002).

Cabe ressaltar, que a fase larval é o período de maior alimentação e crescimento, quando estes passam grande parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico e microplâncton presentes na água. (BERGO *et. al.*, 1990). Todo o processo digestivo das larvas ocorre no canal alimentar (sistema digestório ou intestino), que é responsável por todas as etapas do processamento do alimento: digestão, absorção, formação e eliminação das fezes. (TERRA & FERREIRA, 2009).

O intestino representa uma grande interconexão entre o inseto e o seu ambiente e a compreensão das funções e modos de operação do intestino são essenciais para avaliar os métodos de controle, pois exibem uma grande diversidade na morfologia e bioquímica. (LAW *et al.*, 1992).

Entre as estratégias já utilizadas para controle e prevenção ao *A. aegypti*, está a utilização de inseticidas sintéticos, piretróides e organofosforados. (AUGUSTO & CÂMARA NETO, 2005).

Sabe-se que os inseticidas sintéticos não são seletivos, agredem o meio ambiente e apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados. (DULOUT et al 1985; DEGRAEVE et al 1984; DEGRAEVE; MOUTSCHEN, 1984; DEFERRARI et al 1991; GARRETT, 1992; EYER, 1995; CAVALIERE *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2008).

O uso dos inseticidas químicos convencionais ou sintéticos vem se tornando cada vez mais problemático, uma vez que mesmo havendo a morte dos mosquitos suscetíveis às dosagens aplicadas, os que sobrevivem tornam-se mais resistentes, transferem essa capacidade a seus descendentes e, portanto, populações cada vez mais tolerantes são selecionadas. Aqui deve ser destacado o fato de que o uso indiscriminado dos inseticidas torna possível o estabelecimento da resistência mais rapidamente. (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

Desde a década de 70, temos relatos de resistências das formas adultas de *A. aegypti*, devido à ação residual dos inseticidas BHC, DDT e Dieldrin. (BROGDON & MCALLISTER, 1998). Pesquisas corroboram a resistência desse vetor aos atuais inseticidas, em vários locais do mundo, tais como: Tailândia (JIRAKANJANAKIT *et al.*, 2007), Cuba, Peru e Venezuela (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). No Brasil, a resistência foi verificada em Campo Grande-MS (CAMPOS & ANDRADE, 2003); São Paulo (LUNA *et al.*, 2004); Distrito Federal (CARVALHO *et al.*, 2004); Alagoas, Rio de Janeiro e Sergipe. (BRAGA *et al.*, 2004).

Uma das alternativas para evitar o desenvolvimento de resistência em mosquitos é a utilização de produtos obtidos a partir de plantas com poder inseticida. Insetos expostos a bioinseticidas apresentam lento processo de desenvolvimento de resistência, pois essas substâncias, diferentemente dos inseticidas químicos sintéticos, são compostas pela associação de vários princípios ativos. (ROEL, 2001).

Assim, o desenvolvimento de novas substâncias inseticidas biodegradáveis para o controle de *A. aegypti* tem se tornado de grande relevância no Brasil. Os óleos essenciais obtidos de plantas são considerados fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas.

Neste sentido, vários trabalhos têm citado a utilização de extratos de plantas com potencial larvicida para muitas espécies de mosquitos, e, em especial, para o *A. aegypti*. (BAGAVAN *et al.*, 2010; SIVAKUMAR R. *et al.*, 2011 ; T.M.Y. EL-SHEIKH *et al.*, 2012; KOVEDAN *et al.*,

2012; KRISHNAPPA & ELUMALAI, 2013; BEZERRA-SILVA *et al*, 2015; HERNÁNDEZ-MORALES *et al*, 2015)

Como exemplo de bioinseticidas extraídos de plantas, podem-se citar os estudos realizados com plantas pertencentes à Família Myrtaceae, tais como: *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus stageriana*, *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus grandis*, entre outras. (LUCIA *et al*, 2009; MACIEL *et al*, 2010; PARK *et al*, 2011).

Porém, é importante salientar que a utilização dos extratos e/ou óleos destes vegetais para o controle das larvas de mosquitos apresentam um fator limitante, que é a baixa solubilidade em água, bem como a utilização de solventes para a solubilização dos óleos. Solventes estes que, além de matarem as larvas de mosquitos, podem afetar outros organismos aquáticos, prejudicando o meio ambiente. Outro fator limitante observado é que alguns extratos e/ou soluções da Família Myrtaceae foram testados somente em insetos adultos e, na sua repelência, sem comprovada aplicabilidade.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho consistiu em investigar não apenas a ação larvicida da solução aquosa do óleo essencial de *E. stageriana*, como também as possíveis alterações nos níveis de enzimas e estruturas celulares que respondem à presença de toxicidade, bem como o estresse oxidativo gerado pela ação larvicida. Além disso, o estudo visou identificar através de testes de toxicidade, com outros organismos bioindicadores, os possíveis impactos desta substância no meio ambiente.

Tais estudos são importantes, pois permitem visualizar a abrangência e especificidade dos mecanismos de toxicidade envolvidos neste processo, possibilitando estimar os possíveis impactos ambientais e ecológicos da sua utilização.

Portanto, estudos nesta área darão subsídios para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novos bioinseticidas, com a vantagem de se conhecer seus mecanismos de ação, espectro de ação ambiental e propriedades físico-químicas.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito larvicida, toxicidade e alterações metabólicas e morfológicas em larvas de *Aedes aegypti*, expostas a solução aquosa do óleo essencial comercial de *Eucalyptus stageriana*.

2.2 Objetivos Específicos

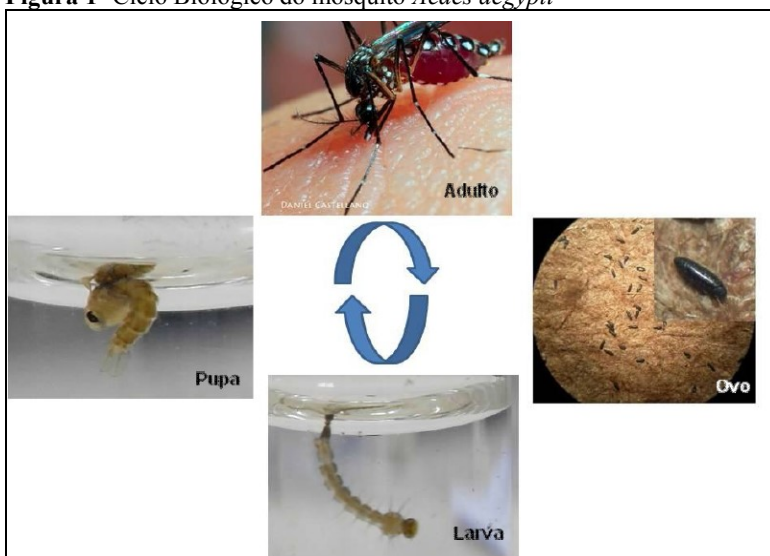
1. Avaliar a toxicidade aguda da solução aquosa do óleo de *E. staigeriana*, utilizando-se bioindicadores de níveis tróficos diferentes, como microalgas e fungos;
2. Caracterizar as alterações metabólicas em *A. aegypti* submetidas a solução aquosa de *E. staigeriana*, utilizando biomarcadores, em especial as atividades de enzimas, tais como fosfatase alcalina (FA), colinesterase (COL) e desidrogenase láctica (LDH);
3. Caracterizar os efeitos biológicos do extrato aquoso sobre as larvas de *A. aegypti*, utilizando biomarcadores de defesa antioxidante, tais como: Glutathiona reduzida (GSH) e Catalase (CAT);
4. Identificar e caracterizar as possíveis alterações morfológicas das larvas expostas a solução aquosa, utilizando microscopia de luz.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biologia e Morfologia do *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* apresenta desenvolvimento por metamorfose completa, ou holometabolismo, e o seu ciclo é constituído por quatro fases, sendo elas: ovo, larva (1^o a 4^o instar), pupa e mosquito adulto (fêmea e macho). (FORATTINI, 2002). A larva e a pupa são aquáticas (Fig.1).

Figura 1- Ciclo Biológico do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: ACIOLE, 2009

O mosquito se adapta facilmente ao ambiente urbano, tem hábitos domésticos, apresentando a hematofagia, cópula e oviposição no período diurno (primeiras horas da manhã e ao anoitecer). O macho, bem como a fêmea, pode se alimentar de néctar ou seiva vegetal, porém as fêmeas têm preferência pelo sangue humano, embora também possa se alimentar de sangue de cães, roedores e aves. A fêmea faz hematofagia após o acasalamento devido à necessidade da albumina e proteínas para maturação dos ovos. (ROZENDAAL, 1997).

3.1.1 Ovos

Os ovos de *A. aegypti* medem cerca de 1mm de comprimento, são elípticos e alongados. No momento da postura são brancos, e após algumas horas adquirem coloração negra e tonalidade brilhante. (FUNASA, 2001).

O ovo é a forma mais resistente do ciclo biológico dos culicídeos e também a fase mais importante do seu desenvolvimento, pois permite ao mosquito uma extensa sobrevivência, isso devido à resistência que possuem diante das adversidades climáticas. (SILVA & SILVA, 1999).

Em uma postura, a fêmea pode depositar de 50 a 500 ovos, preferindo fazer sua oviposição em horas do dia que apresentem uma baixa luminosidade e ainda em lugares que sua prole possa se desenvolver. Os ovos podem ainda ser colocados diretamente ou não na superfície da água, porém os que não são postos diretamente no meio líquido, quando as larvas eclodirem, facilmente conseguirão chegar ao meio líquido. (FORATTINI, 2002).

Geralmente, a fêmea dos culicídeos faz uma postura após cada repasto sanguíneo. Todavia, a fêmea de *A. aegypti*, mais do que qualquer outra espécie, alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando impedida antes de ter completado totalmente o repasto sanguíneo. Sendo assim, essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ingerir agentes patogênicos e fazer sua transmissão. (BARATA *et al.*, 2001).

Figura 2 - Ovos de *Aedes aegypti*.

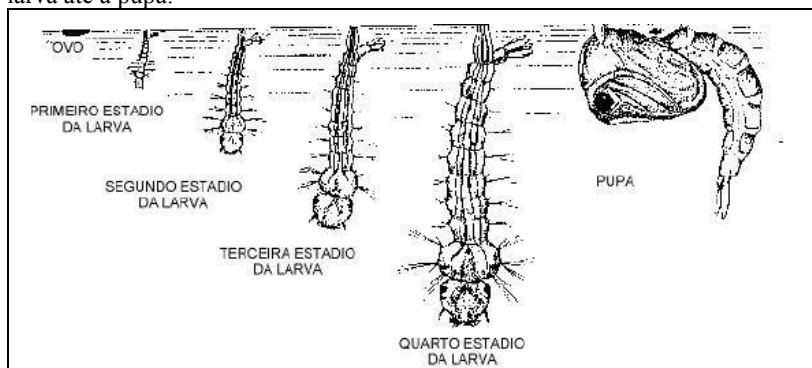


Fonte: A autora, 2010.

3.1.2 Larvas

As larvas de mosquitos são sempre aquáticas e de vida livre e passam por quatro estádios evolutivos (quatro ínstaes larvais) durante esse período (Fig.3). (FORATTINI, 2002).

Figura 3 - Fases Evolutivas do *Aedes aegypti*: do ovo, aos quatro estádios da larva até a pupa.



Fonte: <http://deolhonoaedesaegypti.blogspot.com.br/p/ciclo-de-vida.html>

O corpo é dividido em cabeça, tórax e abdômen, podendo variar sua cor entre esbranquiçada, esverdeada, avermelhada ou até mesmo

enegrecida. Apresentam cerca de duzentos e vinte e dois pares de cerdas espalhadas simetricamente pelo corpo, as quais auxiliam na flutuação da larva no meio líquido e também desempenham função sensorial. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Os quatro estádios larvais não possuem a mesma duração de tempo e, em condições ambientais normais, todo esse período de desenvolvimento leva em torno de 8 a 10 dias. (FORATTINI, 2002).

Segundo Forattini (1996), as larvas dispõem de um órgão chamado de sifão respiratório para efetuarem a respiração. Elas colocam a extremidade desse órgão em contato com o ar e o resto do corpo permanece imerso na superfície líquida.

O aparelho bucal é do tipo mastigador-raspador (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994), onde elas podem tanto morder quanto triturar substâncias que estejam submersas na água, como também raspar superfícies de objetos. Algumas espécies podem predar certos organismos que estejam presentes no mesmo hábitat, incluindo outras larvas. (FORATTINI, 2002).

Conforme Consoli & Oliveira (1994), as escovas orais estão presentes na frente da cabeça, as quais se movimentam fazendo correntes hídricas, deste modo levando até a boca da larva as partículas que serão ingeridas por ela.

É interessante destacar ainda que carências nutricionais geram um alongamento no tempo de desenvolvimento larval e também um aumento na mortalidade na fase de transição para o adulto. (BERGO *et al.*, 1990).

3.1.3 Pupas

As pupas não se alimentam e vão passar por uma metamorfose para transformarem-se em mosquitos adultos. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Esses organismos são desprovidos de mandíbulas funcionais. (FORATTINI, 1996).

Segundo Consoli & Oliveira (1994), as pupas têm aspecto de vírgula (Fig. 4). Inicialmente possuem a mesma cor da larva, porém vão escurecendo conforme se aproximam da emergência do adulto. Seu corpo é provido de cerdas e é dividido em cefalotórax e abdômen. Para realizar a respiração, a pupa é provida de um par de estruturas chamadas de trompas respiratórias, encontradas no cefalotórax.

As pupas ficam normalmente paradas em contato com a superfície da água, porém, quando são incomodadas, se movimentam com muita rapidez. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Forattini (2002) afirma que pupas que irão dar origem aos mosquitos do sexo feminino são geralmente maiores que as pupas que darão origem aos mosquitos do sexo masculino. Ressalta ainda que, em condições de temperatura e umidade normais, a fase de pupa dura cerca de dois dias ou pouco mais.

Neste período de pupa são utilizados os nutrientes que foram armazenados durante a fase larval; passam então por uma metamorfose e se transformam em mosquitos adultos, passando a viver em ambiente terrestre. (CARDOSO, 2009).

Figura 4 - Pupa de *Aedes aegypti*.



Fonte: <http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/mosquitphotos.htm#aegypti>, 2009.

3.1.4 Mosquito Adulto

O corpo dos mosquitos adultos é dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça encontram-se os olhos, antenas e palpos e órgãos do sentido. No tórax estão localizados os apêndices, especializados para a locomoção, as patas e as asas. No abdômen estão localizados os órgãos internos. Seu exoesqueleto é formado principalmente por quitina. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Segundo Forattini (2002), os mosquitos adultos representam a fase de reprodução e dispersão do inseto. Após a fecundação, as fêmeas apresentam a necessidade de realizarem o processo de hematofagia, chamado também de repasto sanguíneo; somente assim se inicia a maturação de seus ovos.

O metabolismo energético da grande maioria dos mosquitos, machos e fêmeas, depende da ingestão de carboidratos, frequentemente provenientes de seivas, flores e frutos. O glicogênio e triglicérides acumulados são determinantes para o potencial de atividade e longevidade. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O mosquito *A. aegypti* adulto (Fig. 5A) é facilmente reconhecido por sua cor, geralmente marrom, apresentando uma nítida faixa curva branco-prateada em cada lado do tórax e outras duas faixas mais fina, reta, longitudinal e central, as quais formam a figura de uma lira (Fig. 5B). (LOZOVEI, 2001).

Figura 5 - Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762).



Fonte: <http://www.eol.org/pages/740699>. Acesso em: 01/07/15

Conforme Natal (2002) o corpo do mosquito apresenta manchas e listras brancas com fundo escuro, servindo como um tipo de camuflagem para o momento em que a fêmea vai picar sua vítima.

Segundo Beserra *et.al.* (2006) quando o *A. aegypti* encontra-se em condições ambientais não favoráveis, a fêmea diminui sua fecundidade para assim aumentar sua longevidade, então conseguindo superar as condições desfavoráveis.

Esses mosquitos possuem uma agilidade muito grande, de tal modo que, se durante o repasto sanguíneo o hospedeiro se movimentar mesmo que seja delicadamente, a fêmea logo sai voando e procura outro

hospedeiro para continuar seu repasto ou retorna logo em seguida para o primeiro hospedeiro. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Logo depois do término do repasto sanguíneo e a digestão, os óvulos já se encontrando maduros, as fêmeas são estimuladas à oviposição. A fecundação se dá com a passagem dos óvulos pelo oviduto e ocorre a postura desses ovos férteis, no ambiente. (NATAL, 2002).

Consoli & Oliveira (1998) afirmam que os criadouros preferidos do *A. aegypti* são recipientes artificiais, tanto faz os que são encontrados abandonados no ambiente e preenchidos com água como os que são utilizados pelo homem para uso doméstico, como as caixas d'água. Natal (2002) ainda confirma que os ovos são depositados pela fêmea nas “paredes” desses recipientes, um pouco acima da água.

3.2 Histórico da Ocorrência do *Aedes aegypti* no Brasil

A partir do século XX, o combate ao *A. aegypti* foi institucionalizado no Brasil devido a diversas epidemias de febre amarela urbana que ocorriam no país. A primeira campanha pública foi iniciada por Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro (1902-1907), o qual instituiu as brigadas sanitárias, detectando casos de febre amarela e eliminando os focos do mosquito. (LÖWY, 1990; DONALÍSIO, 2002).

Entre 1928 e 1929, ocorreu outra epidemia, iniciada na cidade do Rio de Janeiro, disseminando-se para outros municípios do Estado. (DONALÍSIO, 2002).

Nas décadas de 1930 e 1940, com o incentivo da Fundação Rockefeller, foram executadas campanhas de erradicação do *A. aegypti* nas Américas. No Brasil, entre os anos de 1923 e 1924, essa Fundação atuou contra a febre amarela nas cidades litorâneas do Nordeste. Um acordo com o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) conferiu a esta organização norte-americana a responsabilidade exclusiva de eliminação do mosquito. (LÖWY, 1999).

Em 1947, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) decidiram coordenar a erradicação do *A. aegypti* no continente por intermédio do Programa de erradicação do *A. aegypti* no Hemisfério Oeste. (SOPER, 1965; DONALÍSIO, 2002).

Entre o final da década de 1940 e a década de 1950, eficientes programas de erradicação do vetor foram implantados em todos os países latino-americanos, sendo o mesmo eliminado em quase toda a América, com exceção dos Estados Unidos, Suriname, Venezuela,

Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana e uma pequena parte da Colômbia. (SOPER, 1965).

O último foco do mosquito no Brasil foi eliminado no dia 2 de abril de 1955, na zona rural do Município de Santa Terezinha, Bahia. (FRANCO, 1969). Em 1958, na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, em Porto Rico, foi oficialmente declarado que o País conseguira erradicar o vetor. (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Em 1967, confirmou-se a reintrodução do *A. aegypti* no País, no Estado do Pará, e em 1969, no Estado do Maranhão. Mas, em 1973, um último foco foi eliminado e o vetor foi novamente considerado erradicado no território brasileiro. (NOBRE, *et al.*, 1994).

Entretanto, em função de falhas na vigilância epidemiológica e de mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização acelerada, em 1976 o *A. aegypti* retorna ao Brasil (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2003), sendo confirmadas reinfestações nos Estados do Rio Grande do Norte e do Rio de Janeiro e, desde então, o Ministério da Saúde tem implementado programas de controle.

Na época, como não havia o registro de casos de dengue, todas as ações eram direcionadas para a erradicação do vetor. Em abril de 1990, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) foi criada para coordenar as ações de controle de dengue. (BRAGA & VALLE, 2007).

Em julho de 2001, a FUNASA abandonou oficialmente a meta de erradicar o vetor do País e iniciou trabalhos com o objetivo de controlar o mosquito em municípios com maior transmissão da doença. (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001; SILVA *et. al.*, 2002).

Ao longo dos anos as políticas públicas no Brasil sobre dengue foram evoluindo, anteriormente discutia-se a erradicação do mosquito, entretanto percebeu-se que era impossível, mas somente controlar, devido a sua rápida proliferação. Então, como forma de controlar a doença o Ministério da Saúde elaborou planos e campanhas para combate a esse vetor. Assim, dessas políticas públicas resultaram as Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue, formuladas em 2009 pelo Ministério da Saúde em parceria com os Conselhos Nacionais de Secretários Estaduais (CONASS) e Municipais (CONASEMS) de Saúde. Tais diretrizes fornecem elementos para que os planos de prevenção tenham a mesma ideia em todo país. O documento traz as responsabilidades de cada esfera do Sistema Único de Saúde (SUS), e ainda, contempla elementos para auxiliar estados e municípios na organização de suas atividades de

prevenção e controle, em períodos de baixa transmissão ou em situações epidêmicas. (BRASIL, 2012).

3.3 Controle do *Aedes aegypti*

As medidas de controle do *A. aegypti* visam à eliminação das larvas ou dos mosquitos adultos. Com relação às larvas, pode-se incluir a eliminação ou modificação dos seus habitats, como, por exemplo, a drenagem ou aplicação de inseticidas e/ou larvicidas nos locais. Já com relação aos mosquitos adultos, o controle pode ser feito de modo preventivo com a utilização de roupas protetoras, telas, repelentes ou ainda a aplicação de inseticidas. (BORROR & DELONG, 1988; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

Para controlar o *A. aegypti* são realizadas intervenções como: ambiental, mecânica, biológicas, químicas e genéticas. (BALDACCHINO *et al.*, 2015).

Desde a década de 1970, o organofosforado temephos é o larvicida usado no Brasil para controle do *A. aegypti*. Em pouco tempo, casos de resistência a este inseticida em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos. (ANDRADE & MODOLO 1991; CAMPOS & ANDRADE, 2001; POLANCZYK *et al.* 2003; BRAGA *et al.* 2004; CARVALHO *et al.* 2004; LUNA *et al.*, 2004).

Quanto mais o inseticida for utilizado, mais rápido e maior é a seleção de insetos resistentes na população. A capacidade que os insetos possuem em tolerar concentrações inicialmente letais promove uma redução gradual na eficácia dos inseticidas, até sua ineficiência. (CRUZ, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004).

Devido à resistência dos mosquitos ao produto químico, um número maior de aplicações é utilizado, causando grandes impactos ao meio ambiente e ao homem. (D'AMATO *et al.*, 2002).

No mundo todo, a utilização de plantas com fins medicinais e contra a ameaça representada por determinados organismos são hábitos comuns na cultura popular. Porém, seu uso no combate aos mosquitos é de certa maneira uma novidade em vigilância entomológica. (SIMAS *et al.*, 2004).

Diversas substâncias extraídas da casca, do caule, das folhas e dos frutos de diversos vegetais têm demonstrado propriedades larvicidas e de repelência no controle de diversos culicídeos, em especial para o *A.*

aegypti. (SILVA *et al.*, 2002; ARRUDA *et al.*, 2003 SILVA *et al.*, 2004; SIMAS *et al.*, 2004, KAUSHIK & SAINI, 2008; BAGAVAN & RAHUMAN, 2011; SIVAKUMAR R. *et al.*, 2011; EL-SHEIKH, T. M. Y. *et al.*, 2012).

Esses produtos agem de diversas formas sobre os insetos, provocando também inibição da oviposição e da alimentação, distúrbios no desenvolvimento, deformações e infertilidade. (ROEL, 2001). Reguladores de crescimento de insetos, os *Insect Growth Regulator* (IGR), causam modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento e o crescimento do inseto. O IGR mais utilizado é o diflubenzuron, inseticida fisiológico, e seu ingrediente ativo atua interferindo na deposição de quitina, um dos principais componentes da cutícula dos insetos. (MARTINS & SILVA, 2004).

Uma alternativa para a substituição dos produtos químicos foi a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B.t.i.*), que a partir de 1976 começou a ser utilizada no controle de insetos-pragas na agricultura, e atualmente é utilizado no controle de vetores de doenças, como é o caso do *A. aegypti*. (POLANCZYK *et al.*, 2003). A ação do *B.t.i* se processa pela ingestão de esporos e cristais proteicos pelas larvas de mosquito. Uma vez ingeridos, os cristais são solubilizados no lúmen intestinal, em pH alcalino, liberando as protoxinas, que são clivadas por enzimas proteolíticas em fragmentos menores, tornando-se toxinas ativas (CHARLES, 1983). Estas toxinas ativas passam pela membrana peritrófica, interagem com a porção apical do epitélio do intestino médio da larva, dando início à formação de poros ou canais (LAHKIM-TSROR *et al.*, 1983), provocando distúrbios na regulação do potencial elétrico trans-membrana, causando lise colóide-osmótica das células do epitélio intestinal. (CHARLES, 1981). As toxinas interagem especificamente com receptores da membrana apical do intestino médio, causando danos ao epitélio, levando à morte da larva. (CHARLES, 1981; GILL *et al.*, 1992). Nas duas últimas décadas, ocorreu um aumento progressivo no número de produtos à base de *B.t.i.* (BECKER, 2000).

Outra forma de controlar o mosquito é alterar o processo de reprodução do mesmo, liberando machos estéreis. (KNIPLING, 1985). Os mosquitos estéreis são liberados no ambiente, de tal maneira que o resultado de acasalamentos resulte na inviabilização de ovos, podendo assim levar a extinção do mesmo. (BARTLETT, 1990). Os mosquitos se tornam estéreis devido ao uso de agentes que causam mutações, tais como a radiação gama. Criada pelo entomólogo americano Edward Knippling, a técnica de esterilização com energia nuclear já é utilizada

em vários países como Peru, Chile, Portugal, Argentina, Austrália, África do Sul, Tailândia, Japão e recentemente no Brasil. Surge como uma medida alternativa a técnica usual de aplicação de inseticida, que, além de promover resistência do inseto ao produto químico utilizado, não é seletiva. (YANG & THOMÉ, 2009).

Apesar dos avanços na área de controle dos mosquitos, ainda há muitos impedimentos quanto ao uso em âmbito comercial, pois a escassez de experimentos científicos na determinação da toxicidade ao homem e a outros organismos vivos é a real causa da impossibilidade de sua comercialização. As pesquisas são desenvolvidas simplesmente objetivando apenas a verificação da atividade larvicida.

3.4 Gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus*, da Família Myrtaceae, compreende mais de 600 espécies, originárias da Austrália, e desenvolve-se com grande vigor em todas as condições ecológicas, podendo ser encontrado em plantações do Rio Grande do Sul até o Amazonas. (PEREIRA, 1987). Uma das plantas mais valiosas para o homem, tanto pelas suas propriedades medicinais como pelo seu valor econômico. (ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1988).

O eucalipto no Brasil além de ser explorado pelas indústrias moveleiras, madeireiras e serrarias, hoje também tem a exploração de suas folhas, cascas e de frutos para a produção de óleos essenciais. (SALGADO, 2001; BRUM, 2010). Embora todos os tecidos de uma planta consigam acumular óleos voláteis, a composição dos mesmos pode variar de tecido para tecido, por exemplo, óleo extraído da casca de uma planta pode ser rico em determinada substância, sendo que suas folhas podem conter óleo com composição diferente. (BUSATTA, 2006).

Assim, os óleos essenciais de eucalipto são misturas complexas formadas por uma grande variedade de substâncias em diferentes concentrações, as quais são em geral de componentes orgânicos bastante voláteis. Tais substâncias apresentam grupamentos químicos típicos de hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. A grande maioria, no entanto, é constituída de terpenos complexos, constituídos de unidades do isopreno organizadas em cadeias as mais diferentes.

Os compostos terpênicos mais frequentes são os monoterpenos (90% dos óleos) e os sesquiterpenos. (SALGADO *et. al.*, 2003). Os monoterpenos são metabólitos secundários que podem causar interferência tóxica nas funções bioquímicas e fisiológicas em

organismos de invertebrados, apresentando a vantagem de, na maioria das vezes, serem pouco tóxicos para os mamíferos (RICE & COATS, 1994).

3.5 Bioindicadores, Biomarcadores e Estresse Oxidativo

No sentido ecotoxicológico, um bioindicador pode ser definido como sendo o organismo utilizado para a verificação e avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas no meio ambiente. O efeito que determinada substância, ou conjunto de substâncias, provoca é observado no final de uma cadeia de eventos, que se inicia na emissão da mesma, seguido pela sua dispersão no ambiente, sua concentração e os efeitos desta substância sobre os seres humanos, animais e plantas. (KLUMPP, 2001).

Um bioindicador pode fornecer informações sobre a qualidade do ambiente e como este se altera ao longo do tempo (MARKET *et al.*, 2003; HOLT & MILLER, 2011), baseado em parâmetros biológicos. Portanto, um bioindicador atua como um biossensor. Em geral, os organismos bioindicadores são utilizados em metodologias cujo objetivo consiste em testar a sua sobrevivência e, para esta finalidade, tem-se indicado teste de toxicidade aguda em microcrustáceos, bactérias, microalgas, algas, fungos e animais (SVENSSON *et al.*, 2005). A mortalidade de organismos tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica. O ensaio de mortalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, assim sendo, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. (CAVALCANTE *et al.*, 1999).

Outro conceito importante é o de biomarcador. Um biomarcador de toxicidade é definido como qualquer resposta biológica no nível de indivíduo ou a grau inferior, traduzindo a exposição a um agente tóxico, sendo que nessa definição estão incluídas as alterações bioquímicas, fisiológicas, citogenéticas, histológicas e também comportamentais. (WHO, 1993).

Os biomarcadores permitem a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos, possibilitando a mensuração de efeitos subletais. (ARIAS *et al.*, 2007).

No entanto, tem-se sugerido uma grande variedade de técnicas que utilizam organismos biomarcadores, tais como células isoladas, organelas, sistemas enzimáticos entre outras, as quais são capazes de

avaliar o grau de toxicidade de diversas fontes de contaminação ambiental. (SVENSSON *et al.*, 2005).

Os biomarcadores geralmente são divididos em três categorias: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição são aqueles que indicam a exposição do indivíduo ao poluente, sendo capazes de estimar a dose interna ou a bioviabilidade de um xenobiótico particular ou seu metabólito em um organismo. Os biomarcadores de efeito são todos aqueles que demonstram algum tipo de efeito adverso no organismo exposto, o qual pode ser decorrente de uma falha no mecanismo de defesa, ocasionando injúrias histológicas, bioquímicas e fisiológicas. (OKEY, 1990; DALHOFF *et al.*, 2005). Os biomarcadores de susceptibilidade ajudam a elucidar a variação na resposta da exposição a substâncias tóxicas observadas nos diferentes indivíduos e estão relacionados à sensibilidade dos organismos. (WHO, 1993).

Assim, o desenvolvimento e uso de biomarcadores de exposição e de efeito, enquanto indicadores de alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, vêm ganhando espaço como mecanismo de avaliação de impacto em diversos países. (STREB *et al.*, 2002).

Dentre os biomarcadores encontram-se os de estresse oxidativo, induzidos por radicais livres pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e pelas espécies reativas de nitrogênio (ERNs). (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo representa uma situação de desequilíbrio bioquímico/fisiológico, onde ocorre o aumento celular dos agentes oxidantes, como os radicais livres, e o decréscimo dos agentes antioxidantes, ditos de defesa. (BOVERIS *et al.*, 2008). O estresse oxidativo é um mecanismo conhecido por promover lesão celular, resultante da produção excessiva de EROs, e é responsável por inúmeras disfunções celulares e fisiológicas. (CATALA, 2006).

Antioxidantes podem ser vastamente definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. (SIES, 1986; SIES & STAHL, 1995). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, os quais são produzidos pelo próprio organismo ou provindos de fontes exógenas (dietéticas), como as vitaminas E e C, os carotenoides, alguns minerais como zinco, selênio e cobre e os compostos fenólicos, incluindo os flavonoides. O sistema de defesa antioxidante compreende: I) agentes que removem

cataliticamente as EROs e outras espécies de oxigênio, como a superóxido dismutase, catalase e peroxidases; II) proteínas que minimizam o efeito pró-oxidativo dos íons ferro e cobre e o grupamento heme (metalotioneína, transferrinas etc.); III) proteínas que protegem as biomoléculas contra o dano (inclusive o dano oxidativo) por outros mecanismos, como proteínas estressoras; IV) agentes de baixo peso molecular que removem as EROs e os ERNs, por exemplo, glutathiona, α -tocoferol, bilirubina etc. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

As defesas antioxidantes constituem sistemas bioquímicos que tendem a proteger as células contra os efeitos deletérios de EROs. As EROs incluem radicais livres derivados do oxigênio molecular (O_2), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxil ($^{\cdot}OH$), bem como os derivados não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma vez formadas, as EROs podem reagir com diferentes alvos celulares, levando à formação de lesões oxidativas em proteínas, DNA e lipídios (ALMEIDA *et al.*, 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A célula possui um complexo sistema de detoxificação de EROs, formada tanto por moléculas não enzimáticas, como a glutathiona reduzida (GSH), como por enzimas com funções definidas neste processo. Especificamente, a enzima superóxido dismutase (SOD) remove o radical ânion superóxido, enquanto as enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) atuam na detoxificação do peróxido de hidrogênio. (LEVY, 2002).

A GSH é um tiol de baixo peso molecular que se encontra dentro das células, sendo um tripeptídeo importante na proteção das células contra o dano oxidativo e na defesa contra substâncias tóxicas. (UHLIG & WENDEL, 1992). A GSH é o mais abundante antioxidante tiol intracelular, apresenta-se em concentração aproximadamente milimolar em todas as células aeróbicas viventes e sua principal função é servir como um tampão sulfidril. A GSH também é utilizada na detoxificação de xenobióticos, via reações de conjugação catalisada pela enzima GST (glutathiona transferase) (ARMSTRONG, 1997; VAN BLADEREN, 2000). É um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos, sendo considerado como uma primeira linha de defesa devido à sua habilidade de ser pronta e continuamente recuperada pelo ciclo da GSH.

Entretanto, a dismutação do ânion superóxido gera o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e esta espécie reativa é decomposta em água e oxigênio pela CAT. A atividade da CAT se dá nos tecidos animais e vegetais, localizada principalmente em organelas subcelulares,

circundadas por uma membrana simples, conhecida como peroxissomas. (FABER *et al.*, 1990; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

3.6 Enzimas como Biomarcadores

As enzimas, em sua maioria, são catalisadores de natureza proteica, produzidas pelos organismos vivos. (CAMPBELL, 2000; NELSON & COX, 2004). Nos sistemas biológicos, as enzimas constituem a base das complexas e variadas reações que caracterizam os fenômenos vitais. Elas estão presentes em todas as células vivas e desempenham a função vital de controlar os processos metabólicos pelo qual os nutrientes são convertidos em energia. (CAMPBELL, 2000).

A fosfatase alcalina (FA) é uma hidrolase, que tem como função principal remover os grupos fosfato de um grande número de moléculas, incluindo os nucleotídeos, as proteínas e os alcaloides. Este processo é conhecido como desfosforilação (SCHÖNAU *et al.*, 1994). A fosfatase alcalina é extremamente abundante em alguns tecidos ou órgãos, sendo sua atividade relacionada com muitos processos fisiológicos, tais como digestivo, absorção, reabsorção e secreção (ROCHE, 1950; FERNLEY, 1971).

A FA constitui um sistema de múltiplas formas, isoenzimas e isoformas, cuja heterogeneidade se deve, respectivamente, a fatores genéticos e a modificações ocorridas após a síntese proteica. As diferentes isoenzimas são codificadas por diferentes genes e modificações pós-tradução em cada uma delas originam as várias isoformas. (XIE & ALPERS, 2000).

Estudos relatam que é possível que a FA tenha um papel importante na meiose, sendo também associada ao desenvolvimento embrionário, ao processo mitótico e à apoptose. (HUI, 1993; DEGHANI *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que nos dípteros e lepidópteros a FA é normalmente um marcador de membrana nas microvilosidades do intestino médio, embora possa também ocorrer em membranas intestinais basolaterais e até mesmo como uma enzima secretora. (TERRA & FERREIRA, 1994). Ou seja, a FA desempenha um papel importante no processo digestivo destes organismos e o estudo da sua atividade, neste caso, pode fornecer informações importantes sobre o funcionamento normal e patológico do processo digestivo. (HOUK & HARDY, 1984; KOODALUIGAM *et al.*, 2011).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima tetramérica presente em uma ampla variedade de organismos, que apresenta cinco

isoenzimas que catalisam a conversão do lactato a piruvato em todos os tecidos, especialmente no citoplasma das células. Essas isoenzimas podem ser encontradas em concentrações relativas que variam de tecido para tecido. A atividade catalítica da LDH somente é possível na presença da coenzima NADH, que atua no balanço redox durante a redução do piruvato a lactato (ou vice-versa). Enzima que pode ser utilizada, como biomarcador de lesão celular. (TURK & CASTEEL, 1997; HOCHACHKA & SOMERO, 2002).

As colinesterases (ChE) são enzimas responsáveis pela hidrólise da acetilcolina (ACh), neurotransmissor responsável pela transmissão dos impulsos nervosos. Existem duas enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar a acetilcolina: a acetilcolinesterase (AChE) ou colinesterase verdadeira e a pseudocolinesterase, também denominada butirilcolinesterase (BChE) ou colinesterase inespecífica. (SEIZI *et. al.*, 2003; MOTTA, 2003).

Substâncias anticolinesterásicas inibem as enzimas colinesterases, impedindo, por conseguinte, a hidrólise da acetilcolina, o que leva a um acúmulo desta na fenda sináptica. Este acúmulo é danoso, pois causa uma hiperestimulação colinérgica. (SANTOS & MOSTARDEIRO, 2008).

A acetilcolina, neurotransmissor que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Em situação normal, após a cessação do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, sendo a acetilcolinesterase a enzima responsável por isso. Organofosforados e carbamatos, usados como inseticidas, atuam inibindo a AChE e, em consequência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não cessa, levando o inseto à morte. Nestes casos, a resistência está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal, ou quase, do estímulo nervoso. (HEMINGWAY & RANSON, 2000).

3.7 Sistema Digestório dos Insetos

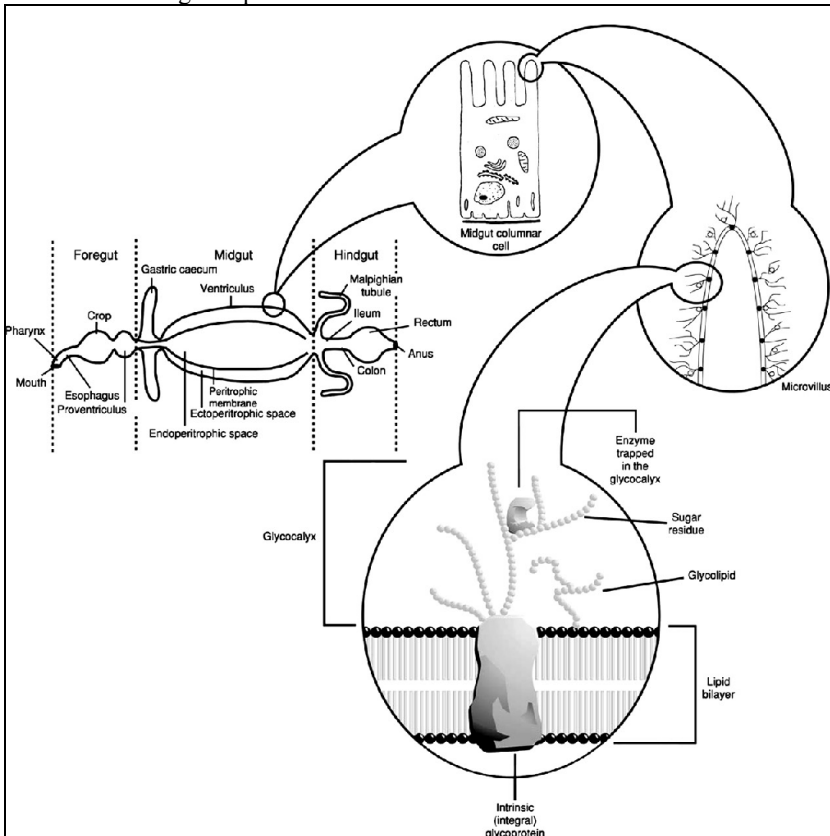
Os processos de distribuição de alimentos, utilização e de armazenamento são muito semelhantes em insetos e vertebrados, assim como na maioria dos outros seres vivos. No entanto, alguns processos metabólicos distintos são encontrados apenas em insetos. (KLOWDEN, 2007).

Os insetos possuem o tubo digestório dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior (Fig 6). A região anterior (estomodeu) está relacionada com a ingestão, o armazenamento, a trituração e o transporte do alimento para a próxima região, a mediana. O intestino médio (mesênteron) contém, pelo menos, quatro tipos de células em uma única camada epitelial, que inclui células colunares, regenerativas, caliciformes e endócrinas. São produzidas e secretadas enzimas digestivas e ocorre a absorção dos produtos da digestão. Já na região posterior (proctodeu) ocorre a absorção de água, de sais e de outras moléculas importantes, antes da eliminação das fezes pelo ânus. (CHOWN & NICOLSON, 2004; GULLAN & CRANSTON, 2005; KLOWDEN, 2007).

No intestino médio da maioria dos insetos o bolo alimentar é envolvido por uma camada acelular semipermeável composta por quitina e proteínas, denominada membrana peritrófica (MP). A MP delimita o espaço endoperitrófico (onde se encontra o bolo alimentar) e o espaço ectoperitrófico (espaço luminal entre a MP e o epitélio) (Fig. 6). (TERRA & FERREIRA, 2009).

As regiões anterior e posterior do intestino são revestidas por quitina e não secretam enzimas nem absorvem os produtos resultantes da ação delas sobre o alimento. Na região mediana, as enzimas das células do intestino podem ser intracelulares, associadas ao glicocálix, ou serem proteínas integrantes da membrana microvilar. O pH do conteúdo do intestino médio é uma das importantes propriedades que afetam as enzimas digestivas, geralmente fica entre 6 e 7,5, mas existem exceções onde o conteúdo é muito alcalino, com pH 9-12. Entretanto, ao longo do intestino médio, o pH pode ter valores variados. (TERRA & FERREIRA, 1994).

Figura 6 - Representação esquemática dos compartimentos do intestino do inseto. Glicocálix, que consiste das cadeias de carboidratos das proteínas intrínsecas e dos glicolípídios das membranas microvilares.



Fonte: TERRA & FERREIRA, 2012.

Os insetos podem ser ingestores contínuos (síntese e secreção de enzimas constitutivas, ou seja, ocorrem continuamente) e ingestores descontínuos (síntese e secreção de enzimas reguladas). (LEHANE *et al.*, 1996).

Billingsley (1990) confirma que a presença de alimento no intestino estimula a síntese e a secreção de enzimas digestivas em mosquitos.

A síntese de proteínas ocorre no retículo endoplasmático rugoso das células, processada no complexo de Golgi e empacotadas em

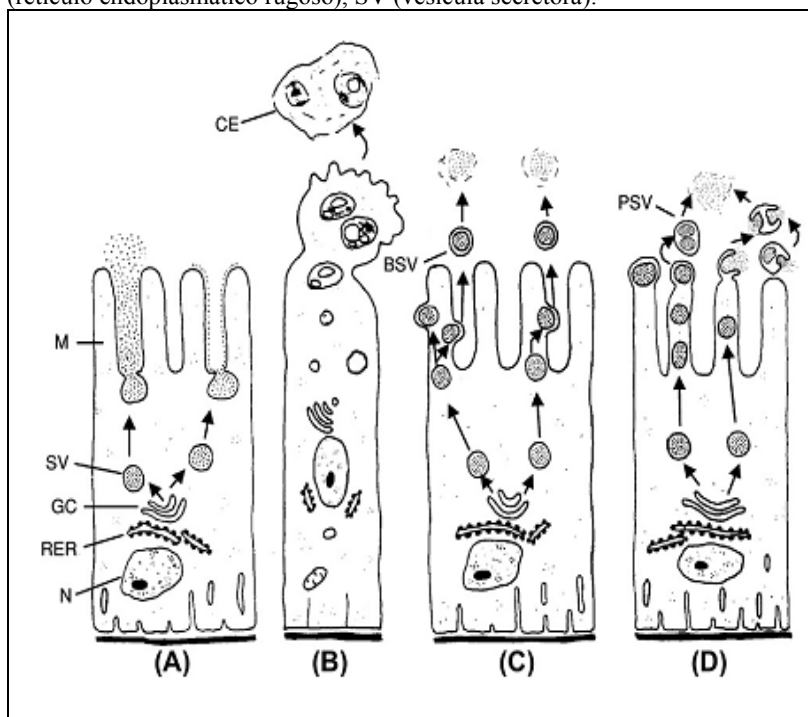
vesículas secretoras (Fig.7). Vários são os mecanismos celulares de liberação das vesículas secretoras no lúmen intestinal, entre eles:

a. Secreção exocítica – as vesículas produzidas se fundem com a membrana plasmática apical, esvaziando os seus conteúdos e não ocorre a perda de citoplasma (Fig. 7A). (GRAF *et al.*, 1986);

b. Secreção apócrina – juntamente com as vesículas secretoras liberadas ocorre a perda de, pelo menos, 10% do citoplasma apical (Fig 7B). (CRISTOFOLETTI *et al.*, 2001);

c. Secreção microapócrina – liberação de vesículas de duas membranas por brotamento (Fig. 7C). Em alguns insetos, esta secreção ocorre por vesículas destacantes, que pode conter uma ou várias vesículas secretoras (Fig. 7D). (JORDÃO *et al.*, 1996).

Figura 7 - Modelos de processos secretores das enzimas digestivas de insetos. BSV (vesículas secretoras), CE (extrusão celular), GC (complexo de Golgi), M (microvilosidades), N (núcleo), PSV (vesícula secretora destacante) RER (retículo endoplasmático rugoso), SV (vesícula secretora).



Fonte: TERRA & FERREIRA, 2012.

Diversos estudos demonstram o funcionamento normal e patológico do sistema digestivo dos insetos, utilizando técnicas bioquímicas e histológicas. (ALVES *et al.*, 2010).

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana*

O óleo essencial de *E. staigeriana* foi adquirido através da FERQUIMA Ind. e Com. de Óleos Essenciais, São Paulo/SP, a qual é Agente e Distribuidora da Empresa Francesa Sovimpex.

No laboratório de Avaliação Ecotoxicológica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), para o bioensaio, o óleo essencial foi diluído em 100 mL de água destilada, nas concentrações de 100µg, 74µg, 49µg e 30µg, formando assim, as soluções aquosas.

4.2 Otimização para obtenção da solução aquosa a partir do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*

Visando a não utilização de solventes para a solubilização do óleo essencial do *E. staigeriana*, buscamos desenvolver métodos mais eficazes para os bioensaios de toxicidade. Neste sentido realizamos:

1 - Homogeneização da solução aquosa com sonicador e agitador magnético para posterior varredura por espectrofotometria UV-Visível.

2 - Obtenção do espectro UV-Visível (Pró-Análise V-1200) do extrato aquoso no intervalo de comprimento de onda de 180 nm a 500 nm, com o intuito de analisar o perfil de absorbância da solução aquosa do óleo essencial de *E. staigeriana*, na Central de Análises do Departamento de Química -UFSC.

4.3 Material Biológico

Os ovos de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller (cedido pelo Ministério da Saúde) foram fornecidos pelo Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

O fungo utilizado no teste de toxicidade foi o *Fusarium oxysporum*, obtido do Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIBIOT), da Universidad Pontificia Bolivariana (UPB).

A microalga verde de água doce, *Scenedesmus subspicatus*, foi obtida da coleção do Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

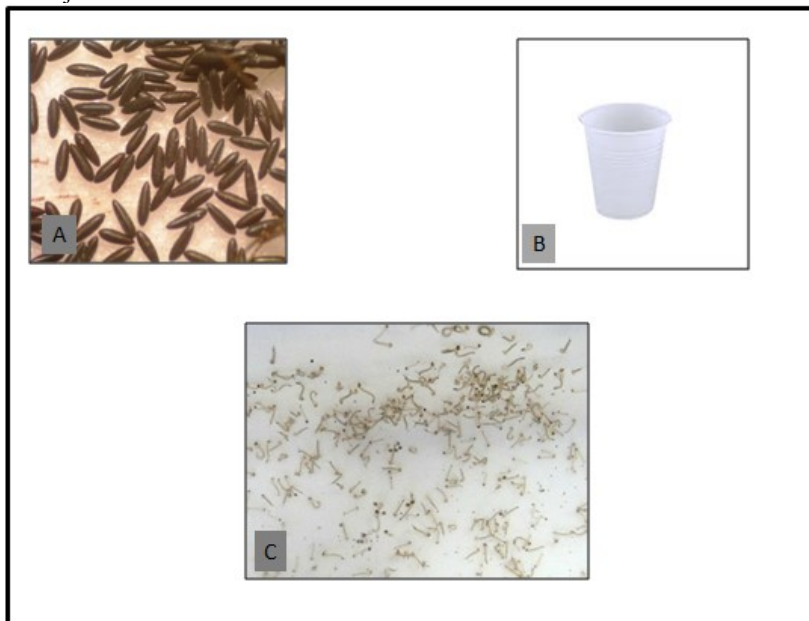
4.4 Bioensaios

4.4.1 Atividade larvicida

As larvas foram obtidas a partir de ovos que foram submersos em água destilada, a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas, em copos plásticos com capacidade para 250 mL, e adicionado alimento (ração para gatos, Purina® Cat Chow®). Após observação da eclosão larval, depois de 24 horas, estas foram transferidas para bandejas plásticas, contendo também água destilada e alimento (Fig.8).

Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura ($26^{\circ}\text{C} \pm 2$), umidade ($70\% \pm 10$) e fotoperíodo (dia:noite) controlados em câmara climatizada no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica, até atingirem o estágio de 3º ínstar final ou 4º ínstar inicial. No período de crescimento, as larvas não sofreram nenhum tipo de tratamento químico, somente alimentadas com a ração acima citada de dois em dois dias, bem como a troca de água da bandeja.

Figura 8 - Etapas do crescimento das larvas: a) Ovos de *A. aegypti*, já embrionados; b) Local para eclosão das larvas; c) Larvas após a eclosão em bandejas.



Fonte: A e B – A autora, 2011; C – Lígia Barizon de Souza, 2011.

Os bioensaios da atividade larvicida seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981), com algumas modificações como, utilização de frascos de vidro nos bioensaios e a modificação da quantidade de larvas por volume de solução.

Todos os bioensaios para atividade larvicida foram realizados com larvas da colônia Rockefeller mantidas em Câmara climatizada sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo citadas anteriormente, seguindo-se os mesmos padrões, mas com concentrações da solução aquosa distintas.

Atingindo o estágio larval de 3º instar final ou 4º instar inicial, larvas foram contadas e transferidas com auxílio de uma pipeta Pasteur para copos plásticos descartáveis, capacidade 50 mL, para posteriormente serem colocadas nos frascos de vidro com a solução aquosa.

Num primeiro momento, um teste piloto foi realizado e 10 larvas de terceiro/quarto instar foram expostas a concentrações diferentes do óleo essencial de *E. staigeriana* (200, 130, 100, 74, 50, 49, 30, 24 e 12µg/mL). Cada concentração foi preparada em duplicata, incluindo o controle (somente água destilada). Destas foram selecionadas quatro concentrações que apresentaram os melhores resultados com relação à capacidade larvicida (100, 49, 74 e 30µg/mL) otimizando assim, o cálculo da CE50 (Concentração Efetiva 50), preparadas em triplicata, 20 larvas por concentração, incluindo o controle.

A quantidade do óleo essencial para cada concentração foi pesada diretamente em frascos de vidro com capacidade de 100 mL, separadamente. Depois da pesagem do óleo foram adicionados 100 mL de água destilada e feita a homogeneização da solução, com auxílio do agitador magnético ou do ultrassom por cinco minutos, resultando na solução aquosa de *E. staigeriana*. Para o grupo controle, as larvas foram mantidas apenas em água destilada.

A mortalidade das larvas foi acompanhada no teste piloto após 20min, 30min, 2, 24 e 48 horas de exposição na solução aquosa. Já no bioensaio para cálculo da CE50 a mortalidade das larvas foi acompanhada após 1hora, 5 horas, 24 horas e 48 horas. No teste piloto, bem como nos bioensaios as larvas não foram alimentadas.

Larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos com pipetas de vidro foram consideradas como larvas mortas.

Outros testes preliminares para a atividade larvicida foram realizados com a finalidade de obter larvas que ficassem expostas às maiores concentrações possíveis da solução aquosa por 48 horas. Isso

se deu em função de que as concentrações testadas deveriam estar no intervalo em que não fosse observada mortalidade acentuada, nem mesmo mortalidade moderada, uma vez que um dos objetivos do trabalho foi de avaliar os mecanismos bioquímicos de toxicidade, bem como as alterações morfológicas, em concentrações subletais e seus respectivos períodos cronológicos. E isso só pode ser obtido através de vários ensaios exploratórios.

4.4.2 Avaliação do crescimento micelial do fungo

O meio de cultivo (Tabela 1) utilizado no experimento foi esterilizado em autoclave a 120°C por 30 minutos. Após um breve resfriamento, em câmara estéril, o caldo foi colocado em béqueres esterilizados contendo o óleo de *E. staigeriana* já pesado, sendo então homogeneizados com movimentos circulares e colocados respectivamente nas placas de Petri.

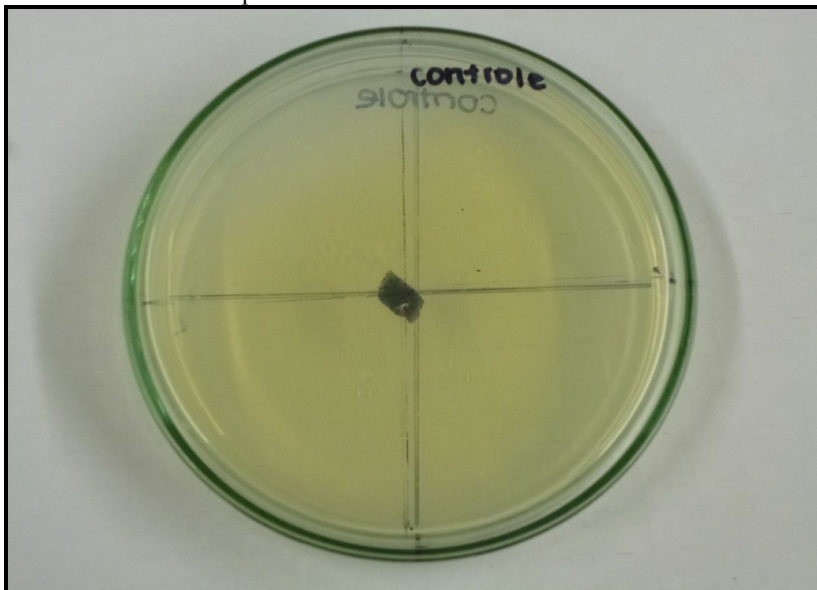
Tabela 1 - Meio de cultura para o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*.

Meio de cultura com extrato de Malte	
Substância	Composição (g)
Extrato de Malte	18
Glicose (dextrose)	3
Ágar	15
Água destilada	1L
pH	6,4-6,8

Fonte: Tatiana Pineda, 2011.

Depois que o caldo solidificou e esfriou, foi inoculado aproximadamente 0,5g de fungo no centro da placa (Fig. 9). As concentrações do óleo essencial utilizadas para o teste de toxicidade com o fungo *F. oxysporum* foram de: 100, 67, 50, 25 e 12 µg/mL, em triplicata para cada concentração. O controle continha somente o meio de cultivo.

Figura 9 - Placa de Petri com meio de cultura e o fungo *Fusarium oxysporum*, inoculado no centro da placa.



Fonte: A autora, 2012.

As placas com o fungo inoculado foram deixadas em estufa à 28°C durante dois dias, observando se ocorria o aparecimento de alguma contaminação nas placas. Nas tampas das placas em que foi colocado o meio de cultura (parte externa), foram desenhados quatro quadrantes para auxiliar na medição do raio de crescimento do fungo.

Não ocorrendo contaminação e depois das 48h de crescimento do fungo, iniciou-se a medição a partir do ponto de inoculação, com auxílio de uma régua, nas quatro direções dos eixos. Esta medição foi executada diariamente, durante 15 dias. O valor de crescimento radial para cada condição testada representa, portanto, a média aritmética dos quatro valores de raios obtidos, respectivamente.

4.4.3 Avaliação do crescimento algal

Os testes de toxicidade com a alga foram realizados segundo a Norma DIN 38.412, parte 33, 1991, com as devidas adaptações para as condições locais e já testadas no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica/CCB da UFSC. O inóculo algal foi mantido no

laboratório, resfriado a 4°C, em meio de cultura CHU (segundo Norma DIN).

O óleo essencial de *E. staigeriana* foi pesado diretamente nos balões volumétricos, separadamente com o auxílio de uma micro seringa de vidro, de forma que as soluções aquosas finais atingissem as concentrações de 100, 67, 50, 25 e 12 µg/mL.

Os ensaios foram realizados em duplicata para cada concentração, sendo que o volume final da mesma em cada biorreator (balões volumétricos de 200 mL) foi de 100 mL (Fig. 10).

Figura 10- Biorreatores para crescimento de algas



Fonte: Anabelle Barroso de Paiva, 2009.

O inóculo algal para o ensaio requer uma concentração inicial de células de aproximadamente 10^3 células por litro. Para isso, determinamos as concentrações através da medida de transmitância das soluções a 720 nm, utilizando-se espectrofotômetro (FEMTO – 700 PLUS) e utilizando a curva padrão necessária para converter transmitância em número de células, conforme análises anteriores.

Então, iniciou-se a preparação das soluções de diferentes concentrações, para duas repetições. Adicionou-se o meio nutriente (Meio CHU), inóculo de algas com concentração de células definida e completamos com água destilada até o volume final de 600 mL, assim, foi preparado o inóculo do bioensaio.

Após a preparação acima citada, colocamos 100 mL do inóculo do bioensaio nos balões volumétricos, que continham o óleo essencial de *E. staigeriana* pesado. Os controles foram feitos com meio nutriente CHU, água destilada e a concentração inicial de alga (aproximadamente 10^3 células por litro). As algas foram cultivadas em biorreatores de 200 mL, conectados ao suprimento de CO_2 (ar), incubados a uma temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 2$, com iluminação constante de 2000 lux, a uma distância de 5 cm dos balões, conforme Figura 10.

Os ensaios tiveram duração de 72 horas, sendo que a cada 24 horas foram retiradas alíquotas (1 mL), com pipeta de vidro, agitando para que a amostra ficasse mais homogênea possível, para serem realizadas medidas de transmitância.

A amostra de 1ml foi colocada na cubeta de quartzo no espectrofotômetro digital UV-VIS, em comprimento onda de 720nm para leitura óptica. A medida de transmitância expressa a turbidez da solução em função da concentração de células no meio. Quanto maior a transmitância da solução, menor a concentração de células no meio.

Para medir a Taxa de Crescimento Algal (TCA), o valor da transmitância inicial (tempo 0) foi subtraído dos valores das transmitâncias obtidas em 24h, 48h e 72h, e dividido pelo respectivo tempo, para obter o valor da taxa de crescimento da massa algal utilizando-se a Equação 1 (NIE *et. al.*, 2008), nas diferentes concentrações testadas. Para os dados expressados no gráfico da Figura 18 utilizamos para o cálculo a Equação 2.

$$\mu_{ti} = \frac{N_{ti} - N_{to}}{t_i - t_o} \quad (1)$$

$$\rho_{ti} = \frac{100(\mu_o - \mu_{ti})}{\mu_{ti}} \quad (2)$$

Onde:

μ_{ti} = TCA (Taxa de crescimento algal no tempo t_i e ρ_{ti} = Taxa percentual de crescimento algal)

μ_o = número de células no tempo t_o

N_{t_i} = número de células no tempo t_i

N_{t_0} = número de células no tempo t_0

4.5 Atividade Antioxidante

Para efetuar a medição da atividade da Catalase (CAT) e a concentração da Glutathiona Reduzida (GSH) foi efetuado paralelamente outro bioensaio com a mesma metodologia do bioensaio de toxicidade para larvas de *A. aegypti*.

A partir dos tempos estabelecidos para o teste de toxicidade do extrato aquoso, 10 larvas inteiras foram retiradas de cada concentração-teste e do controle, pesadas e colocadas no freezer a $- 80^{\circ}\text{C}$. Para o transporte dos criotubos até o freezer $- 80^{\circ}\text{C}$ utilizamos gelo seco.

Para efetuar os ensaios, as larvas foram retiradas do freezer, colocadas em gelo seco para transporte até o laboratório, onde foi feito um homogenato.

Cada homogenato continha dez larvas, 1 mL de água ultrapura com Triton x-100 a 0,01%, em temperatura ambiente. Este foi feito com homogeneizador manual, com cerca de 15 impactos cada amostra.

Feito o homogenato, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi retirado e novamente em gelo seco foram colocadas as amostras prontas para a execução dos ensaios.

Todas as análises foram feitas no dia da preparação dos homogenatos, bem como a preparação das soluções para os respectivos ensaios, quando necessário.

4.5.1 Catalase (CAT)

Em uma cubeta de quartzo de 0,5 mL, contendo 955 μL de tampão (água ultrapura e Triton x-100 à 0,01%) em temperatura ambiente, foram adicionados 10 μL de amostra e 35 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,3 M. Desta forma, a atividade da CAT foi quantificada através do monitoramento da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), durante 2 minutos (AEBI, 1984) em espectrofotômetro 700 PLUS FENTON, em 240nm.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades de atividade (U) e a massa de proteína total (mg) presente no meio de reação. Após o cálculo efetuado para atividade da CAT, a mesma foi dividida pelo peso das larvas da amostra em questão.

A quantificação da CAT foi determinada pela equação 3:

$$A_{CAT} = \frac{\Delta abs}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon p} \cdot \frac{V_t}{V_a} \cdot 10^3 \cdot 30 \quad (3)$$

Sendo:

A_{CAT} = Atividade da enzima catalase (U/L)

ΔAbs = variação absorvância por 1 minuto de cinética enzimática linear

Δt = 1 minuto

ϵp = Absortividade molar do Peróxido de Hidrogênio (40 L.mmol⁻¹)

V_t = Volume total de reação

V_a = Volume de amostra

10^3 = Conversão de mmol para μ mol

30 = Fator de diluição para procedimento

4.5.2 Glutationa Reduzida (GSH)

A GSH, forma majoritária de tióis de baixo peso molecular, foi quantificada nas amostras com larvas de *A. aegypti* pelo método descrito por Beutler, Duron e Kelly (1963).

Após centrifugação dos homogenatos, alíquotas (100 μ L) foram submetidas à precipitação com o ácido tricloroacético (TCA) a 20%. Após a precipitação, 50 μ L do sobrenadante foi misturado com 50 μ L de ditionitrobenzóico (DTNB) e 800 μ L de tampão (água ultrapura com Triton x-100 a 0,01%).

A absorvância do ânion tiolato, formado após 3 minutos à temperatura ambiente, foi medida em 412nm em espectrofotômetro semi-automatizado (Bioplus BIO 2000) contra o branco da reação.

A concentração de GSH nas amostras foi calculada pela equação da reta obtida na curva de calibração com padrão de GSH, substituindo o valor de absorvância da amostra.

As análises foram realizadas em duplicatas e os valores expressos em μ mol.g⁻¹.

4.6 Ensaio Enzimáticos

As enzimas dosadas foram: Colinesterase (COL), Fosfatase Alcalina (FA) e Desidrogenase Láctica (LDH), através de kits da Labtest Liquiform, método cinético, para equipamento automatizado.

Para os ensaios enzimáticos utilizamos a mesma metodologia do ensaio anterior, incluindo o preparo dos homogenatos das análises de CAT e GSH.

Todos os ensaios enzimáticos também foram feitos no mesmo dia da preparação dos homogenatos, bem como a preparação das soluções para os respectivos ensaios, quando necessário.

As atividades das enzimas foram determinadas em equipamento automatizado Cobas Mira da Plus Roche-Basel, Suíça, no Laboratório de Análises Clínicas no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFSC.

Para calcular a atividade específica de cada enzima, o valor da atividade de cada amostra foi dividido pelo peso das larvas da amostra em questão. O resultado obtido também foi dividido pela concentração das proteínas totais encontradas na respectiva amostra.

4.7 Quantificação Proteínas Totais

Para determinação de proteínas totais nos homogenatos foi empregado o método de Bradford, o qual é rápido e sensível para a quantificação de proteínas, baseado na reação das proteínas com o reagente *Coomassie Brilliant Blue*, proposto por Marion Bradford (1976).

A curva de calibração empregada na quantificação de proteínas foi preparada usando soluções de diferentes concentrações de albumina bovina: 5, 25, 50, 100 e 125 µg/mL.

Em tubos de ensaio, 0,25mL do reagente de Bradford foram misturados com 2,25mL do homogenato das amostras. Após 10 minutos, as respectivas absorbâncias a 595 nm foram determinadas em espectrofotômetro 700 Plus Fenton, utilizando-se água ultrapura com Triton x-100 à 0,01% como branco.

Para calcular a quantidade específica de proteínas totais o valor da atividade de cada amostra foi dividido pelo peso das larvas da amostra em questão.

4.8 Técnicas Histológicas

4.8.1 Material

As larvas utilizadas foram obtidas empregando-se a mesma metodologia dos bioensaios anteriores, incluindo a mesma faixa de concentração do extrato aquoso, ou seja, de 100µg/mL, 74 µg/mL e 30µg/mL.

4.8.2 Métodos

1 – Fixação

A partir dos tempos estabelecidos para a observação do teste de toxicidade do extrato aquoso, duas larvas do mosquito foram retiradas do meio de teste e submetidas a 2 tipos de soluções fixadoras:

- **Bouin** (BEÇAK & PAULETE, 1976), solução aquosa de ácido pícrico, formol e ácido acético. Tempo de fixação de 24 horas em temperatura ambiente.

- **Formalina tamponada** 4%, 0,1M, ph 7 (JUNQUEIRA *et al.*, 1989), tempo de fixação de 24 horas em temperatura ambiente.

Após as 24 horas, o material foi lavado em água destilada, várias vezes até a retirada da solução fixadora.

2 – Desidratação

Na desidratação posterior, as larvas foram imersas em soluções alcoólicas crescentes de 70% (duas trocas de 20 minutos), 95% (30 minutos) e 100% (duas trocas de 1 hora cada).

3 – Inclusão

As larvas foram incluídas em parafina (Merck) ou Historesina (hidroxietil metacrilato – Leica)

- **Parafina** – Após a desidratação, foi realizada a diafanização do material em xilol (2 banhos de 30 minutos cada) e inclusão em parafina, com ponto de fusão a 60°C (2 banhos de 1 hora cada). Em seguida, o material foi emblocado.

- **Historesina** - Após a desidratação, as larvas foram submetidas a uma solução de 2:1 de álcool etílico 100% e historesina, por 30 minutos, 1:1 de álcool etílico 100% e historesina, 1:2 de álcool etílico 100% e historesina, seguida de dois banhos de historesina pura, sendo que o primeiro foi over night e o segundo de 1 hora.

No dia seguinte, o material foi emblocado em formas plásticas e deixadas por 24 horas em estufa a 40°C.

4 – Microtomia

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo manual (EK MICRO 2.1), regulado para fornecer cortes de 3µm de espessura. Em seguida, os cortes foram deixados por 24 horas em estufa a 37°C.

Os blocos de historesina foram cortados em micrótomo rotativo (Leica RM2255), regulado para fornecer cortes de 3µm de espessura. Em seguida, os cortes foram deixados por 24 horas em estufa a 37°C.

5 – Coloração

As lâminas com os cortes de parafina foram desparafinizadas em xilol e hidratadas (banhos sucessivos em soluções de álcool etílico 100, 95 e 70% e água). Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina. Vários tempos de coloração foram testados. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas (álcool etílico 70, 95 e 100%), diafanizadas em xilol e depois montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá.

Para historesina foram utilizadas 3 tipos de coloração:

- **Hematoxilina-Eosina** – Foi utilizada a hematoxilina de Gill e a eosina aquosa a 1%. Vários tempos de coloração foram testados.

- **Azul de toluidina a 1%** - durante o tempo de 1 minuto.

- **PAS (“Periodic Acid Schiff”) - Hematoxilina** - As lâminas foram submetidas aos seguintes banhos sucessivos: solução de ácido periódico a 0,4%, por 30 minutos, lavagem rápida em água destilada, reativo de Schiff por 1 hora, passagem direta para 3 banhos de água sulfurosa de 3 minutos de duração cada, lavagem durante 30 minutos em água corrente e, finalmente, coloração em hematoxilina, por 10 minutos em temperatura de 40°C. Alguns cortes do material foram utilizados como controle, sendo incubados com saliva a 37°C por 20 minutos, seguidos de imersão nas soluções descritas acima. A saliva, nesta técnica, serve para a eliminação do glicogênio (polissacarídeo livre).

Após as colorações as lâminas foram secas em estufa a 37°C e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá.

6 – Análises Fotográficas

As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio de luz Zeiss binocular “standard”, e fotografadas em microscópio Olympus, modelo Bx41, com câmera digital colorida com 3.3 mpxel da Q-imaging, programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging.

4.9 Análises Estatísticas

A concentração Efetiva (CE50) para a atividade larvicida (fator concentração com 5 níveis – controle, 30µg, 49µg, 74µg e 100µg) e para a taxa de crescimento algal (fator concentração com 6 níveis – controle, 12µg, 25µg, 50µg, 67µg e 100µg) foi calculada utilizando-se o método estatístico Probit Method (WEBER, 1993), a partir do número de organismos mortos, em cada concentração, após o período de observação de 48 horas.

As diferenças no crescimento micelial do fungo *F. oxysporium* em distintas concentrações do extrato aquoso (controle, 12µg, 25µg, 50µg, 67µg e 100µg) no 13º dia foram testadas com uma análise de variância (ANOVA) unifatorial. Já para o estresse oxidativo (CAT e GSH), atividade enzimática (Fosfatase alcalina, LDH e Colinesterase) e determinação das proteínas totais as diferenças foram testadas entre distintas concentrações e tempos (fator concentração com 4 níveis – controle, 30, 74 e 100; fator tempo com 4 níveis – 1h, 5h, 24h e 48h) utilizando ANOVAs bifatoriais. A homogeneidade das variâncias foi previamente testada com o teste de Cochran, e transformações em Log foram utilizadas quando necessárias. Para os termos significativos com $p < 0,05$ foram adotados teste pós-hoc do tipo SNK (Student-Newman-Keuls) com objetivo de identificar quais grupos diferem entre si.

As análises estatísticas foram realizadas na programação R (R Development Core Team, 2013) utilizando o pacote GAD (Sandrini-Neto e Camargo, 2012). Sendo que, os gráficos foram desenvolvidos no programa estatístico GraphPad Prism version 6.0 software (San Diego, USA).

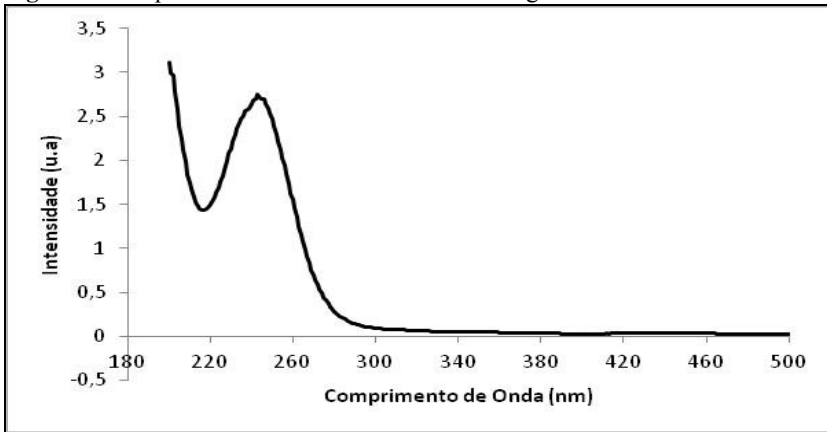
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização para obtenção da solução aquosa a partir do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana*

A grande maioria dos artigos publicados sobre o efeito de extratos vegetais como larvicidas utiliza solventes para solubilização dos óleos essenciais utilizados em bioensaios de toxicidade. Os solventes mais empregados são dimetilsulfóxido (DMSO) e detergentes tais como Triton-X100 e Tween. Esses solventes, em determinadas concentrações, se mostram tóxicos para os mosquitos, bem como para outros organismos de vida aquática e até mesmo para o homem. (FURTADO *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2009; CUNHA E SILVA *et al.*, 2014).

Tentando evitar este efeito indesejável em nossos bioensaios, não utilizamos solventes para a solubilização do óleo essencial de *E. staigeriana*, mas utilizamos equipamentos como sonificador e agitador magnético para solubilizar e obter uma solução aquosa o mais homogêneo possível.

Além dos equipamentos para obtenção da solução aquosa, era necessário identificarmos a presença ou não do óleo em nossas amostras, se de fato são solubilizados, bem como determinar uma metodologia que possibilitasse estabelecer um controle e/ou um padrão da quantidade de material na solução. Com essa finalidade, diversas concentrações diferentes (200 µg/mL a 12 µg/mL) do óleo essencial em água destilada foram submetidas a varredura por espectrofotometria UV-Visível (Pró-Análise V-1200). O espectro apresentou um único pico majoritário da solução aquosa do óleo de *E. staigeriana*, que está centrado em 240nm, como mostra a Figura 11. Verificamos ainda que as absorbâncias foram proporcionais a massa de óleo adicionada inicialmente.

Figura 11 - Espectro UV-Visível da mistura final água/óleo

Fonte: A autora, 2012.

A partir da obtenção deste dado, em todos os bioensaios realizados para avaliar a toxicidade em larvas do mosquito e microalgas, as soluções aquosas foram homogeneizadas com o auxílio de um sonificador e suas absorvâncias verificadas em espectrofotômetro, a 240nm.

5.2 Otimização do Bioensaio de Toxicidade para Larvas de *A. aegypti*

Inicialmente foi feito um teste piloto para a atividade larvicida da solução aquosa de *E. staigeriana*, sendo que seis concentrações diferentes foram testadas (200, 130, 100, 50, 24, 12 µg/mL).

Para a transferência do óleo essencial de *E. staigeriana* para os frascos-teste, no momento da pesagem, utilizamos pipeta Pasteur. Após a pesagem, foi adicionado 100mL de água destilada em cada frasco e colocados no sonificador, por cinco minutos. No momento da colocação da água nos frascos de vidro, observamos que na superfície da solução formou-se uma película esbranquiçada.

Após os 5 minutos, executou-se a leitura da absorvância de cada amostra e posteriormente, 10 larvas de terceiro/quarto ínstar foram adicionadas em cada frasco (duplicata), totalizando 20 larvas por concentração. A partir da colocação das larvas, iniciamos as observações.

As larvas que estavam em contato com a solução aquosa com maiores concentrações (200, 130 e 100µg/mL) mudaram rapidamente o

seu comportamento, em comparação com as larvas que estavam no controle. As mesmas tinham mais dificuldade para chegar até a superfície, possuíam movimentos letárgicos e no percurso utilizavam sua parte anterior friccionando a parte posterior, ficando com o corpo em forma de um círculo fechado.

Após este comportamento, os movimentos ficaram cada vez mais lentos, onde não conseguiam mais chegar até a superfície, ficando no fundo do frasco ou paralisadas na superfície da solução aquosa, não respondendo quando estimuladas mecanicamente.

Já na concentração de 50 μ g/mL e 24 μ g/mL, as larvas levaram 30 minutos para iniciarem o mesmo comportamento citado anteriormente. Entretanto, na concentração de 12 μ g/mL e no controle, as larvas apresentaram comportamento normal.

Com relação à mortalidade das larvas, ou seja, atividade larvicida, nas concentrações maiores (200, 130 e 100 μ g/mL), após vinte minutos de experimento já tivemos morte de larvas, como mostra a Tabela 2, na concentração de 12 μ g/mL não tivemos mortes de larvas, bem como no controle (Fig. 12).

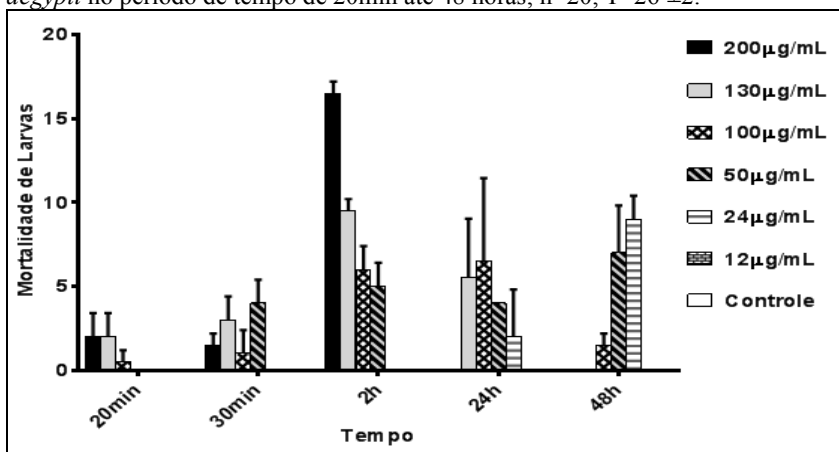
Tabela 2 - Média da quantidade (não cumulativa) de larvas de *Aedes aegypti* mortas em cada concentração do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* no tempo de 48h; n=20, T=26 \pm 2.

Tempo	Concentração (μ g/mL)						
	200	130	100	50	24	12	Controle
20min	2	2	2	-	-	-	-
30min	1,5	3	3	4	-	-	-
2h	16,5	9,5	6,5	5	-	-	-
24h	-	5,5	6,5	4	2	-	-
48h	-	-	2	7	9	-	-
Total	20	20	16	20	11	0	0

Fonte: A autora, 2015.

Na maior concentração, ou seja, de 200 μ g/mL, em duas horas de bioensaio, todas as larvas já estavam mortas. Na concentração de 24 μ g/mL, a mortalidade aconteceu a partir de 24 horas de experimento e

Figura 12 - Evolução da mortalidade (não cumulativa) das larvas de *Aedes aegypti* no período de tempo de 20min até 48 horas; n=20, T=26°±2.

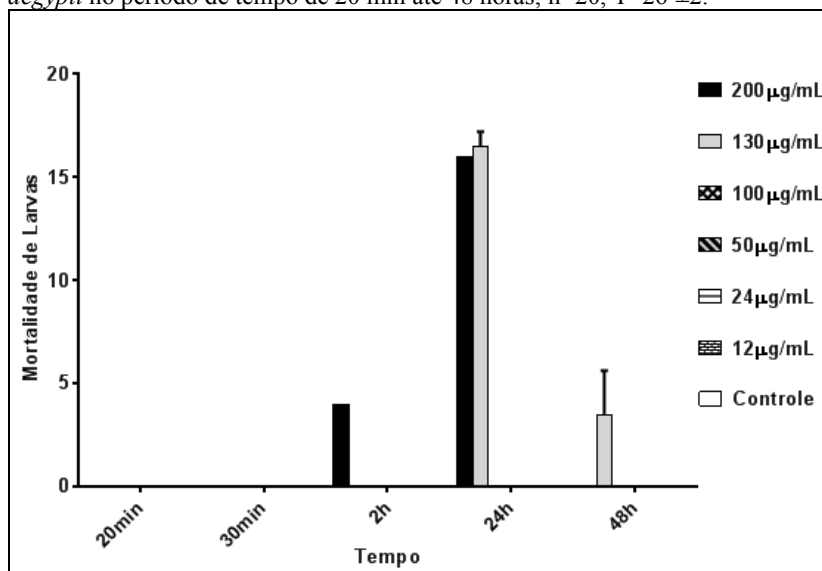


Fonte: A autora, 2015.

Entretanto, visando calcular a concentração efetiva (CE50) em 24 horas, fez-se novamente outro bioensaio. As mesmas concentrações anteriores foram utilizadas, pipeta Pasteur para a transferência do óleo para os frascos de vidro, mesma quantidade de larvas e repetições. Sendo que, para homogeneização da solução aquosa, diferentemente do ensaio anterior, foi utilizado agitador magnético por 10 minutos e medido a absorbância. Novamente observou-se uma camada espessa de óleo na superfície da água. Neste bioensaio, as absorbâncias obtidas foram abaixo dos valores do bioensaio anterior.

Após a colocação das larvas na solução aquosa, também observamos o comportamento na locomoção das mesmas. Neste evento, ocorreu uma demora de aproximadamente 20 minutos para iniciar os movimentos diferenciados com relação ao controle e após uma hora de experimento as larvas apresentaram movimentos letárgicos. Entretanto, a mortalidade das larvas ocorreu somente duas horas depois do início do experimento na concentração mais alta, de 200µg/mL, como mostra a Figura 13.

Figura 13 - Evolução da mortalidade (não cumulativa) das larvas de *Aedes aegypti* no período de tempo de 20 min até 48 horas; n=20, T=26°±2.



Fonte: A autora, 2015.

Podemos observar na Tabela 3, que somente nas concentrações de 200µg/mL e 130µg/mL ocorreu mortalidade de larvas, no período de 24 horas do início do bioensaio e que nas concentrações abaixo de 130µg/mL não ocorreu morte das larvas, no decorrer das 48 horas de experimento.

Tabela 3 - Média de mortalidade (não cumulativa) de larvas de *Aedes aegypti* mortas em cada concentração do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* no tempo de 48h; n=20, T=26°±2.

Tempo	Concentração (µg/mL)						
	200	130	100	50	24	12	Controle
20min	-	-	-	-	-	-	-
30min	-	-	-	-	-	-	-
2h	4	-	-	-	-	-	-
24h	16	16,5	-	-	-	-	-
48h	-	3,5	-	-	-	-	-
Total	20	20	0	0	0	0	0

Fonte: A autora, 2015.

A partir do segundo bioensaio, percebeu-se que alguns itens da metodologia para avaliação da toxicidade da solução aquosa do óleo de *E. staigeriana* em *A. aegypti* deveriam ser modificados.

Então, descartou-se a utilização de artefatos de plástico para a transferência do óleo essencial para os frascos de vidro no momento da pesagem. A utilização do agitador magnético também foi descartada, pois com amostras obtidas com o uso do sonicador foram obtidas maiores taxas de mortalidade de larvas, provavelmente pela formação de uma emulsão mais homogênea do óleo de *E. staigeriana*. Nesse caso, gotículas muito pequenas de óleo são formadas, potencializando o efeito do larvicida pelo aumento da superfície de contato entre as larvas e o óleo essencial. A utilização de ultrassom de baixa frequência para a formação de emulsões tem sido usada principalmente em escala laboratorial. (ABISMAIL *et. al.*, 1999). No entanto, a maioria dos trabalhos até agora tem se concentrado na preparação de emulsões de síntese, por exemplo, para tintas industriais ou na preparação de nanopartículas. (KENTISH *et. al.*, 2008).

Portanto, diante do resultado obtido anteriormente e sem êxito para achar a CE50, foi realizado um terceiro bloco de bioensaios.

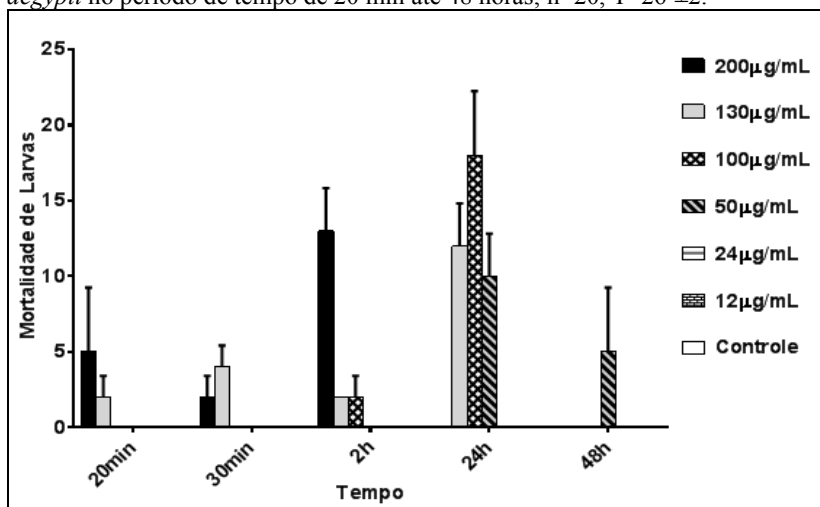
No terceiro bloco de bioensaio foi utilizada a mesma metodologia anterior com relação às concentrações, quantidade de larvas e repetições. Entretanto, para a colocação do óleo nos frascos de vidros utilizamos micro seringa de vidro e para a homogeneização novamente, o sonicador e novamente verificamos a absorvância das amostras.

Já a partir da colocação da água destilada nos frascos observamos mudanças no bioensaio. A camada espessa, esbranquiçada na superfície

da água não foi mais visualizada, somente gotas do óleo essencial, o que levou a concluir, de forma visual, a boa dispersão do óleo, e que a pipeta Pauster por ser de plástico liberou substâncias para o meio líquido.

Ao colocarmos as larvas no extrato aquoso, observamos novamente o comportamento diferenciado das larvas com relação ao controle, ficando mais lentas e friccionando sua parte anterior na posterior, letárgicas com dificuldades de chegar à superfície, sendo que nas concentrações maiores (200 e 130 $\mu\text{g/mL}$), algumas larvas morreram após 20 minutos de experimento, como mostra a Figura 14.

Figura 14 - Evolução da mortalidade (não cumulativa) das larvas de *Aedes aegypti* no período de tempo de 20 min até 48 horas; n=20, T=26 $^{\circ}\pm 2$.



Fonte: A autora, 2015.

Nas concentrações de 200 a 100 $\mu\text{g/mL}$, até 24h ocorreu mortalidade de forma expressiva, já na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, a morte das larvas aconteceu a partir de 24 horas de exposição. Não ocorrendo aqui mortalidade de larvas nas concentrações de 24 e 12 $\mu\text{g/mL}$, bem como no controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Média da quantidade (não cumulativa) de larvas de *Aedes aegypti* mortas em cada concentração do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* no tempo de 48h; n=20, T=26°±2.

Tempo	Concentração (µg/mL)						
	200	130	100	50	24	12	Controle
20min	5	2	-	-	-	-	-
30min	2	4	-	-	-	-	-
2h	13	12	2	-	-	-	-
24h	-	2	18	10	-	-	-
48h	-	-	-	5	-	-	-
Total	20	20	20	15	0	0	0

Fonte: A autora, 2015.

Assim sendo, diante dos resultados anteriores, iniciou-se um quarto bioensaio em busca de concentrações que nos indicassem a CE99 e CE50 em 24 horas.

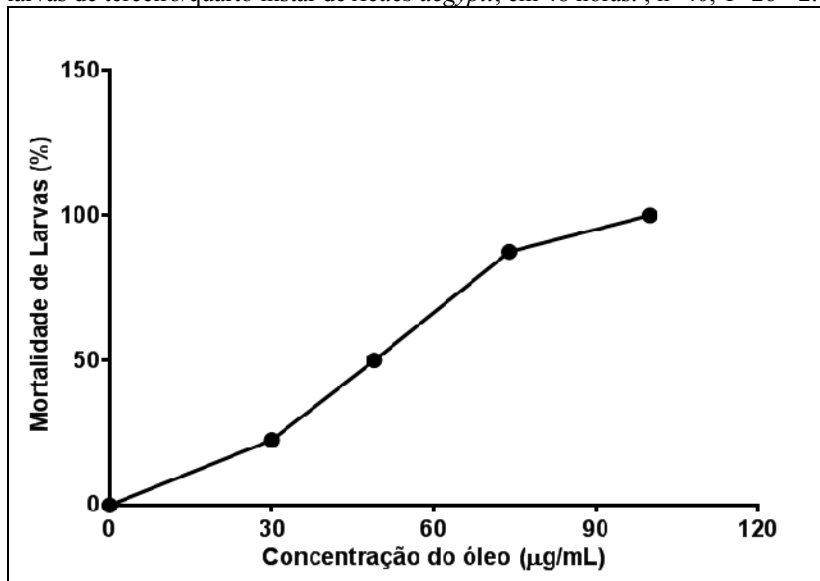
5.3 Bioensaios de Toxicidade e Avaliação Bioquímica

5.3.1 - Atividade Larvicida

A partir dos resultados obtidos com os testes anteriores, iniciamos um novo bioensaio utilizando as concentrações de 100, 74, 49 e 30µg/mL, 20 larvas por frasco, em duplicata, num total de 40 larvas por concentração, micro seringa de vidro para a transferência do óleo essencial para os frascos, sonicador para a homogeneização, água destilada e verificação da absorbância das amostras.

Quanto à atividade larvicida a solução aquosa do óleo essencial de *E. staigeriana*, apresentou atividade larvicida contra as larvas de *A. aegypti*, em toda a faixa de concentração testada, tendo sido observada uma correlação entre dose e resposta (Fig.15). A concentração de 30µg/mL apresentou a menor atividade larvicida, matando uma quantidade de larvas (média das duplicatas de 4,5 larvas), o que corresponde 22,5% de mortalidade. A concentração de 100µg/mL do óleo essencial testado apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 40 larvas. As concentrações intermediárias 74 e 49µg/mL mataram 17,5 e 10 larvas respectivamente, o que corresponde a uma mortalidade de 87,5 e 50 % respectivamente, conforme mostra o gráfico abaixo.

Figura 15- Efeito da toxicidade do extrato aquoso do *Eucalyptus staigeriana* em larvas de terceiro/quarto instar de *Aedes aegypti*, em 48 horas. ; n=40, T=26°±2.



Fonte: A autora, 2015.

A CE50, concentração na qual cinquenta por cento dos indivíduos testados morrem, foi de 45,92. A análise do percentual de mortalidade das larvas de *A. aegypti*, no intervalo de concentração de 100 µg/mL a 30 µg/mL, utilizando-se o software Probit, permitiu confirmar o valor da CE50 (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração Efetiva 50% (CE50), em µg/mL, do teste de avaliação de toxicidade da solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana* em larvas de *Aedes aegypti* em 48 horas; n=40, T=26°±2.

CE ₅₀	LC	UC
45.92	40.36	52.25

LC = limite inferior do intervalo a 95% de confiança

UC = limite superior do intervalo a 95% de confiança

Fonte: A autora, 2015.

Confirmando-se a ação larvicida da solução aquosa e o intervalo de concentração mais adequado para se testar a atividade, assumiu-se como necessária a investigação dos mecanismos bioquímicos associados

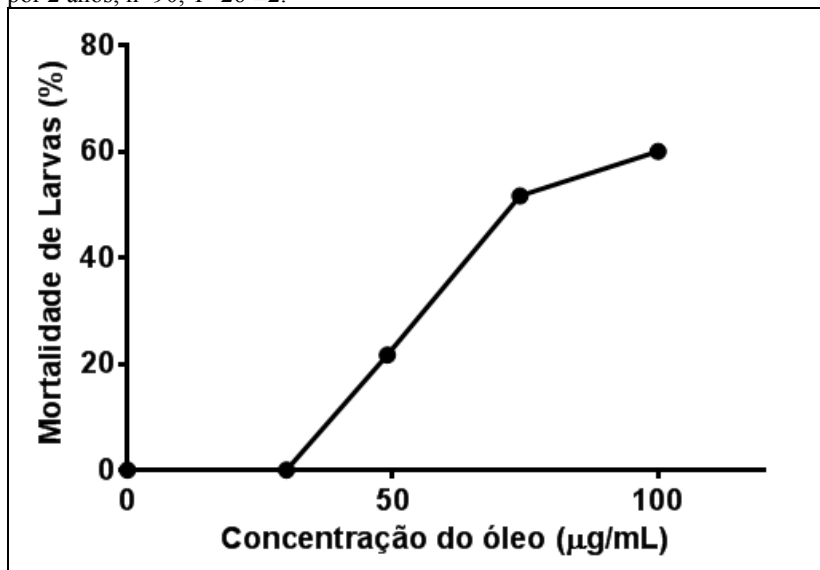
a citotoxicidade desta solução aquosa que podem demonstrar qual mecanismo pode ser o responsável pela mortalidade das larvas. Para tal, necessitávamos de larvas vivas que ficassem expostas a solução aquosa por até 48 horas, ou seja, os ensaios deveriam ser realizados em intervalo de concentração que incluísse efeitos subletais. A elucidação dos mecanismos de toxicidade é importante, pois nos permite avaliar ou estimar quais grupos de organismos poderiam ser afetados pela ação tóxica da solução aquosa do óleo e, portanto, seu possível impacto ambiental.

Com esse objetivo, vários bioensaios de toxicidade foram efetuados até conseguirmos um pool de no máximo 10 larvas por concentração que ficaram expostas por 48 horas em todas as concentrações estudadas e assim, através de estudos enzimáticos e de estresse oxidativo, avaliar o que bioquimicamente ocorre com larvas expostas a solução aquosa de *E. staigeriana*.

Então, um último bioensaio foi feito com as concentrações de 100, 74, 49 e 30µg/mL e controle, em triplicata, 30 larvas por frascos, totalizando 90 larvas por concentração, onde conseguimos um pool de 10 larvas para os testes enzimáticos e das defesas antioxidantes. Além das análises enzimáticas e das defesas antioxidantes, coletamos larvas para avaliação histológica.

A Figura 16 mostra que na concentração de 100µg/mL morreram somente 60% das larvas que estavam em contato com a solução aquosa de *E. staigeriana* em 48 horas de exposição. Além disso, na concentração de 30µg/mL não ocorreu mortalidade. Já nas concentrações intermediárias 74 e 49µg/mL morreram em média de 10,3 e 4,3 de larvas, respectivamente, o que corresponde a uma mortalidade de 51,6% e 21,6 % respectivamente. Fica evidente que a ação larvicida da solução aquosa de *E. staigeriana*, embora confirmada nesta fase de bioensaios, demonstrou ser menos intensa do que nos ensaios anteriores. Ou seja, observamos que o óleo essencial, em função do tempo de armazenamento, começa a perder sua eficácia, como todo óleo essencial, pois alguns componentes são voláteis e/ou sofrem reações de oxidação (os constituintes insaturados são mais facilmente oxidáveis que os saturados).

Figura 16 - Efeito da toxicidade da solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana* em larvas de 3º/4º instar de *Aedes aegypti*, em 48 horas. Óleo essencial em uso por 2 anos; n=90, T=26±2.



Fonte: A autora, 2015.

Embora indesejado no laboratório, esse é um resultado muito importante do ponto de vista de formulação e aplicação de um possível produto final em situações de campo reais. Assim, concluímos que estudos posteriores mais aprofundados serão necessários para se obter uma estabilidade maior do óleo e, portanto, chegarmos a uma formulação comercial do mesmo.

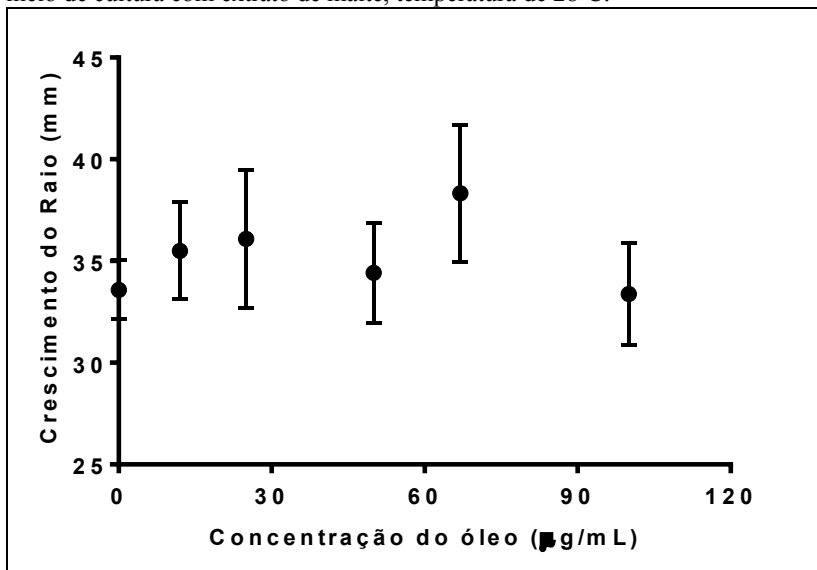
Sabe-se que os óleos essenciais são misturas complexas de terpenos e esteróis, sendo que uma das suas características é a volatilidade. (SIMÕES *et al.*,2010). A relativa instabilidade das moléculas que constituem os óleos torna difícil sua conservação.

5.3.2 – Avaliação do crescimento micelial do fungo

As avaliações do crescimento micelial radial iniciaram-se após 48h da inoculação do fungo. As avaliações consistiram na mensuração diária do raio definido pelo micélio em quatro diferentes direções pré-estabelecidas. Portanto, o valor do crescimento radial representa a média aritmética calculada a partir da média de crescimento em 4 eixos da

placa, das três triplicatas. O fungo *F. oxysporum* apresentou bom desenvolvimento, completando seu crescimento em toda placa no período de quinze dias. Como evidenciado pelos dados da Figura 17, o crescimento micelial não foi afetado significativamente em nenhuma das concentrações do extrato testadas, para as quais foram observadas mortalidade das larvas do mosquito. O resultado encontrado no presente estudo é diferente e não confirma resultados obtidos em outros estudos. (Elgorban *et al.* 2015). Do ponto de vista ecológico, o fato de que o óleo de eucalipto não se mostrou tóxico para o fungo estudado é muito importante, uma vez que esses organismos são degradadores e, portanto, produtores de nutrientes importantes na cadeia trófica.

Figura 17 - Crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporium* em contato com solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana* em diferentes concentrações, em meio de cultura com extrato de malte, temperatura de 28°C.



Fonte: A autora, 2015.

Os valores do teste ANOVA não foram significativos entre as concentrações com $p < 0,05$ ($p=0,28$).

Alguns estudos documentam as propriedades antifúngicas dos óleos essenciais de plantas (DAFERERA, *et al.*, 2003, TYAGI *et al.*, 2014, FUGUO *et al.*, 2015).

Tyagi *et al.* (2014) testaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de eucalipto, o qual foi determinado *in vitro* contra 8 diferentes leveduras encontradas em processo de deterioração dos alimentos, incluindo o teste dos vapores ou compostos voláteis do óleo. A atividade dos vapores de eucalipto (voláteis) foi significativamente mais elevada do que a concentração inibidora do óleo de eucalipto. As concentrações do fungicida inibitórias mínimas para os diversos organismos variaram entre 0,56 e 4,50mg/ml e de 1,13 a 9 mg/ml, respectivamente.

Os resultados relatados sugerem o óleo de eucalipto como um potente inibidor de leveduras deterioração dos alimentos não apenas *in vitro*, mas também em um sistema alimentar real.

Elgorban *et al.* (2015) demonstraram que extratos de *Eucalyptus globulus* obtidos por hidrodestilação usando um equipamento tipo-Clevenger, diferente desse estudo, foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em 48%, no período de 5 dias de exposição. O mesmo estudo demonstrou que para outras espécies de *Fusarium* testadas a inibição variou de 57 a 78%. Aqui cabe ressaltar que pelo fato de que o método de extração foi diferente, a composição do extrato também pode apresentar diferenças.

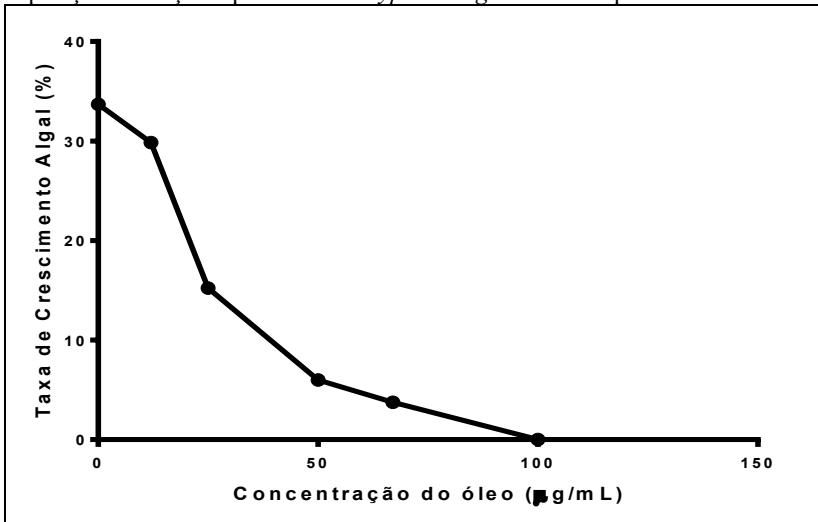
5.3.3 – Avaliação do crescimento algal

O objetivo desse teste foi avaliar o possível efeito de inibição do crescimento (multiplicação celular) da alga clorofícea *S. subspicatus*, existente em águas doce, causada pela exposição ao extrato de óleo utilizado. Como produtores primários, microalgas verdes estão na base da cadeia trófica em ambientes aquáticos. A utilização do óleo em teste como larvicida em ambientes naturais, com grande probabilidade, poderá afetar tais ambientes e por esse motivo, consideramos fundamental testar a toxicidade do óleo para esse tipo de organismo.

Testes de toxicidade com microalgas em avaliações ecotoxicológicas são aceitos, bem definidos internacionalmente e são descritos/normatizados por diversos protocolos internacionais, como por exemplo, os descritos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) e pela OECD (Test N° 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test).

Na Figura 18, os resultados mostram com clareza a toxicidade da solução aquosa para as algas, avaliado em testes de 48h, confirmando que a taxa de inibição do crescimento pode ser correlacionada com a concentração de óleo. Para a concentração de 100 µg/mL, a taxa de inibição foi de 100% do crescimento algal.

Figura 18 - Taxa de crescimento da alga *Scenedesmus subspicatus* em 48h de exposição à solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana*. Temperatura ambiente.



Fonte: A autora, 2015

O valor de CE50 encontrado foi de 24,94 µg/mL, o qual pode ser considerado ou indicativo de média para alta toxicidade (Tabela 6). Pelo fato de que o óleo em estudo é de origem vegetal e contém majoritariamente terpenos e fitoesteróis, a toxicidade observada é bastante compreensível, uma vez que tais componentes são conhecidos por dar origem a diversos hormônios vegetais.

Relatos de estudos da toxicidade de óleo de eucalipto em microalgas não estão disponíveis na literatura. Estudos mais detalhados utilizando parâmetros bioquímicos para avaliar os mecanismos da toxicidade nesse caso deverão ser realizados, porém, não estão nos objetivos do presente estudo.

Tabela 6 - Concentração Efetiva (CE50), em µg/mL, do teste de avaliação da taxa de crescimento da alga *Sceneddemus subspicatus* em 48 horas de exposição a solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana*; temperatura ambiente.

CE ₅₀	LC	UC
24,94	22,38	27,78

LC = limite inferior do intervalo a 95% de confiança

UC = limite superior do intervalo a 95% de confiança

Fonte: A autora, 2015.

É importante relatar, que diversos estudos foram realizados e descritos na literatura, demonstrando os efeitos dos extratos obtidos com vegetais do gênero *Eucalyptus* sobre vários organismos, incluindo mosquitos e suas larvas.

O óleo essencial de *C. citriodora* apresentou atividade inibitória sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli* (ESTANISLAU *et al.*, 2001), sobre os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. sublineolum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria triticina*, *Alternaria alternata* e *Rhizoctonia solani* (RAMEZANI *et al.*, 2002; BONALDO *et al.*, 2007) e sobre os insetos coleópteros *Acanthoscelides obtectus* (MAZZONETTO & VENDAMIM, 2003). Esse óleo também apresentou atividade tóxica *in vitro* sobre as larvas do fitonematóide *Meloidogyne incognita*. (PANDEY *et al.*, 2000).

Já o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* demonstrou também atividade sobre bactérias e fungos (NAVARRO *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2004; SALARI *et al.*, 2006), sobre o carrapato *Boophilus microplus* (CHAGAS *et al.*, 2002), bem como atividade inseticida sobre *Musca domestica* (MORSY & HALIM, 2005), *Pediculus capitis* (YANG *et al.*, 2004), além do coleóptero *Acanthoscelides obtectus* (PAPACHRISTOS & STAMOPOULOS, 2004). Também foi tóxico para larvas de *A. aegypti* (LUCIA *et al.*, 2007), bem como larvicida e inseticida para *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil e América do Sul (MACIEL *et al.*, 2010). O óleo obtido através do processo de hidrodestilação apresentou atividade inseticida sobre o caruncho do milho *Sitophilus zeamais* (SANDI & BLANCO, 2007).

O óleo essencial *Eucalyptus staigeriana* mostrou-se eficiente no controle do coleóptero *Callosobruchus maculatus* provocando mortalidade de adultos através do processo de fumigação (BRITO *et al.*, 2006). O mesmo óleo foi testado quanto à ação acaricida verificando-se

atividade sobre larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus* (CHAGAS *et al.*, 2002), bem como larvicida para *L. longipalpis* (MACIEL *et al.*, 2010) e ainda tóxico para nematódeos (MACEDO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2013).

5.4 Enzimas como Biomarcadores de Toxicidade

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza principalmente proteica, que participam de todas as reações celulares, tendo como papel fundamental o controle metabólico celular. Do ponto de vista ecotoxicológico, constituem excelente ferramenta para estimar-se o efeito de substâncias, na avaliação das alterações bioquímicas, morfo-histológicas ou comportamentais, em especial de fármacos e poluentes. (COELHO *et al.*, 2008; JESUS & CARVALHO, 2008).

A escolha das enzimas no presente estudo deveu-se às informações descritas na literatura, bem como à experiência do nosso laboratório – Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica - UFSC em estudos com poluentes.

Como mencionado anteriormente, diversos autores demonstraram que fosfatases alcalinas de mosquitos podem ser utilizadas como marcadores de membrana nas microvilosidades do intestino médio, embora possam também ocorrer em membranas intestinais basolaterais e até mesmo como uma enzima secretora. (TERRA & FERREIRA, 1994). Assim, existem evidências experimentais importantes de que podem desempenhar um papel importante no processo digestivo destes organismos e o estudo da sua atividade, neste caso, pode fornecer informações importantes sobre o funcionamento normal e patológico do processo digestivo.

Da mesma forma, a enzima lactato desidrogenase é uma importante enzima do metabolismo de carboidratos, estrategicamente posicionada como catalisador de uma reação que oferece alternativa ao metabolismo aeróbio de glicose, ou seja, participa da fase do metabolismo anaeróbio.

A enzima colinesterase tem sido intensamente utilizada como um bio- marcador da exposição de diversos organismos a inseticidas fosforados. Esses fatos justificaram a escolha dessas enzimas como possíveis biomarcadores das alterações bioquímicas que poderiam ocorrer nas larvas expostas ao óleo de eucalipto.

Portanto, com o objetivo de elucidar a influência da exposição a solução aquosa de *E. stangeriana* no metabolismo do mosquito *A. aegypti*, as três enzimas marcadoras de possíveis alterações metabólicas

importantes foram escolhidas: Lactato Desidrogenase (LDH), Colinesterase (COL) e Fosfatase Alcalina (FA).

Nesses estudos, com base em diversos ensaios preliminares tentativos, utilizamos um pool de 10 larvas em 1 mL de água ultrapura contendo Triton a 0,01%, para fazer o homogenato das mesmas. Constatou-se que o homogenato que continha 10 larvas do mosquito possuiu material suficiente para analisar as enzimas avaliadas neste trabalho, com base na concentração de proteínas totais encontrada. (Figura 28).

Para uma melhor visualização dos resultados que evidenciam a evolução das respostas das atividades enzimáticas, especialmente em relação aos controles, decidimos aqui expressar os resultados na forma de valores relativos, em vez dos valores absolutos, nos gráficos que demonstram a variação da atividade das enzimas em função do tempo e da concentração da solução. As razões que justificam este tratamento dos dados ficarão mais evidentes com a discussão dos mesmos, a seguir.

Para o cálculo dos valores relativos, o valor de atividade enzimática dos controles em 1 hora, 5 horas, respectivamente, 24 horas, bem como para o de 48 horas, foi considerado como sendo o valor relativo igual a 1 (um). Os respectivos valores das médias (das replicatas) das atividades enzimáticas das amostras, para cada concentração testada, foram divididos pelo valor de cada controle (valor relativo = valor da amostra/valor do controle). Exemplificando, o resultado da atividade enzimática das amostras obtido no tempo de 1 hora foi dividido pelo valor do controle de 1 hora, sendo o mesmo procedimento utilizado para as amostras e controle de 5 horas, 24 horas e 48 horas. Obtivemos assim, o valor relativo de cada uma das amostras testadas.

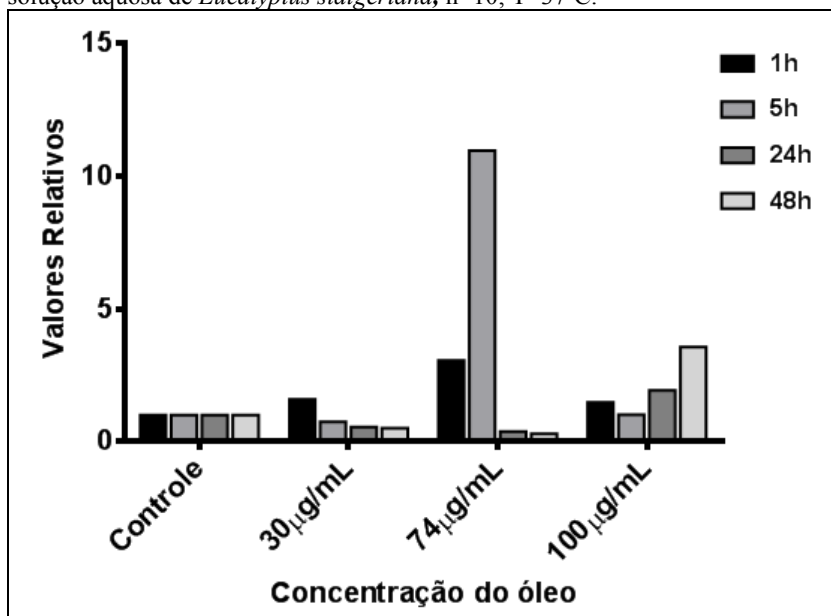
5.4.1 – Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH é uma das enzimas chaves do metabolismo anaeróbico de glicose que catalisa a reação reversível do piruvato a lactato, no final da via glicolítica, em períodos de baixa ou insuficiente disponibilidade de oxigênio, incluindo anaerobiose tecidual, hipóxia. (HOCHACHKA & SOMERO, 2002).

No gráfico (Fig. 19), podemos observar que no tempo de 1 hora, em todas as concentrações, os valores da atividade enzimática foram mais altos ou praticamente iguais ao resultado do controle. Após 5 horas de exposição a solução aquosa, para a concentração de 74µg/mL, o seu valor mostrou-se relativamente aumentado, sendo que nas outras

concentrações os valores foram menores que o controle. Em 24 horas de exposição, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi a única onde o valor da atividade enzimática foi acima do valor expresso no controle, elevando-se ainda mais após 48 horas de exposição a solução aquosa.

Figura 19 - Valores relativos da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) em larvas de *Aedes aegypti* em 1, 5, 24 e 48 horas de exposição em solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana*, n=10; T=37°C.



Fonte: A autora, 2015.

O resultado da ANOVA indica que a interação entre o efeito de concentração e o de tempo foi muito significativa (Tabela 7, ver coluna LDH). Isto significa que os efeitos das diferentes concentrações foram de fato dependentes dos tempos, ou seja, há diferenças significativas entre os efeitos das diferentes concentrações dependendo do tempo em que as larvas de *A. aegypti* ficaram expostas a solução aquosa do óleo de *E. staigeriana*. Os testes pos-hoc SNK comprovaram as tendências observadas no gráfico acima.

Tabela 7 - Resultados das análises de variância para atividades de lactato desidrogenase (LDH), fosfatase (FA) e colinesterase (COL). Os termos de interesse significativos ($\alpha=0,05$) utilizados nas comparações a *posteriori* estão em negrito. Para os testes Student-Newman-Keuls (SNK): Ct (controle), 30, 74 e 100=concentrações em $\mu\text{g/mL}$. “ < “ ou “ > “, indica $p<0,05$ e = indica $p>0,05$. Níveis de significância * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Fatores	GL	LDH		FA		COL	
		F		F		F	
[]	3	15,45		6,86		3,48*	
t	3	15,12		34,37		4,18*	
t x []	9	19,39***		7,14***		0,47	
Resíduo	16						
SNK		t x []		t x []		[]	
		1h	Ct=100=30=74	1h	74=Ct=100=30		30>74
		5h	30=Ct=100<74	5h	30=100=Ct<74		
		24h	74=30=Ct<100	24h	30=100=74=Ct	t	1h>5h
		48h	74=30=Ct<100	48h	30=100=Ct=74		1h>24h

Fonte: A autora, 2015.

Nas concentrações de $74\mu\text{g/mL}$ e $30\mu\text{g/mL}$, a atividade da LDH diminuiu com o tempo (de 5 à 48h) comparando-se com o controle (Fig. 19). Esta resposta significa que, aparentemente, a disponibilidade de oxigênio tecidual não é um fator atuante e responsável pelos efeitos tóxicos encontrados, nesta fase de exposição, pois é fato bem conhecido que a atividade desta enzima deve aumentar com a redução da concentração de oxigênio presente no tecido, em diversos organismos. Infelizmente, que seja do nosso conhecimento, não existem dados disponíveis na literatura com relação à atividade desta enzima em mosquitos, bem como em larvas. Existem dados indiretos, especialmente dados relativos à expressão gênica de enzimas e outras proteínas, que demonstram que a atividade da via glicolítica aumenta significativamente em larvas submetidas à condição de estresse, incluindo por agentes tóxicos, porém, sem qualquer menção específica à enzima LDH, (BARREIRA, 1996). O valor de atividade de LDH extraordinariamente elevado no tempo de 5h de exposição à concentração de $74\mu\text{g/mL}$ não possui uma explicação fácil ou óbvia, porém o perfil é o mesmo da concentração de $30\mu\text{g/mL}$ e diferente da concentração de $100\mu\text{g/mL}$, na qual à medida que o tempo de exposição aumenta (de 5 à 48h), a atividade da LDH aumenta significativamente.

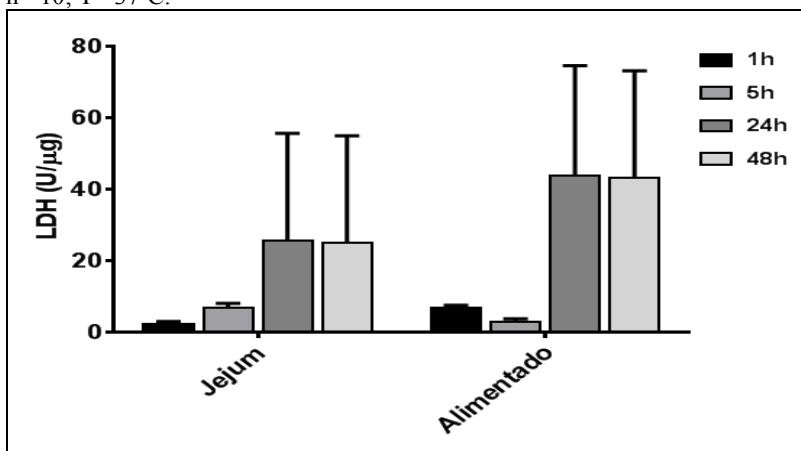
Os resultados da atividade de LDH parecem indicar que existem duas fases distintas de comportamento metabólico das larvas com relação ao tempo de exposição. O mesmo comportamento parece ocorrer com a relação à variação das concentrações, pois as concentrações de 30

e 74 $\mu\text{g/mL}$ exibem um padrão e a de 100 $\mu\text{g/mL}$ outro comportamento. No intervalo de tempo de 0 à 5h, provavelmente, as larvas estão tentando se adaptar a exposição ao óleo. Assim a atividade aumenta e em seguida se reduz a valores inferiores ao controle, provavelmente refletindo a situação dinâmica entre o efeito provocado e a intensidade da reação de defesa do organismo. No momento seguinte (de 5 à 48h), a tendência da atividade de LDH parece obedecer a um único efeito determinante do comportamento, o qual induz a redução gradual e sucessiva da atividade, para as larvas expostas a solução aquosa do óleo, nas concentrações de 30 e 74 $\mu\text{g/mL}$. Para a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a atividade aumenta significativamente. Isso significa que por ser essa uma concentração bastante elevada, o perfil de atividade com o tempo é diferente das demais. Se levarmos em consideração que para essa concentração a mortalidade é muito alta e rápida, tal comportamento parece compreensível.

Não menos importantes nos parecem os efeitos da adaptação ao jejum, os quais estão de certa forma, indicados na literatura. Alguns poucos estudos indicam que a resposta metabólica ao estresse é diferente entre larvas alimentadas e larvas em jejum. (BARRERA, 1996). Aqui cabe destacar que o protocolo utilizado neste estudo (OMS) para testar a atividade larvicida determina que as larvas não sejam alimentadas. A discussão desse fato ou fator no presente estudo será feita a seguir.

Para melhor entender os efeitos do jejum sobre a atividade das enzimas em estudo, as larvas foram monitoradas de 0 à 48h, com e sem alimentação e não expostas a solução aquosa do óleo. Neste caso, os dados da Figura 20 a seguir, não são os dados relativos, pois se trata apenas do grupo controle.

Figura 20 - Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) em larvas de *Aedes aegypti* do grupo controle em 1, 5, 24 e 48 horas em jejum e alimentado. n= 10; T= 37°C.



Fonte: A autora, 2015.

Observando os resultados da atividade enzimática de LDH das larvas em jejum e comparando-se com o resultado das larvas alimentadas por 48 horas, podemos observar que para as larvas em jejum, bem como para as que receberam alimento por 48 horas, a atividade da enzima LDH aumentou ao longo das 48 horas do bioensaio. Para as larvas alimentadas, os valores foram ainda maiores do que os valores expressos no controle. Salientamos que não ocorreu mortalidade de larvas em nenhum dos frascos onde as larvas foram mantidas por 48 horas e foi observado mudança de instar normalmente. Em resumo, para as larvas do grupo controle, com e sem alimento, a atividade de lactato desidrogenase não se reduz, ao contrário, aumenta com o tempo de 0 à 48h. Neste caso, o aumento da atividade de LDH ao longo do período de 48 h deve ser provocado pelas mudanças morfológicas que as larvas sofrem, uma vez que completaram o terceiro instar e atingiram o quarto instar e se preparam para se transformar em pupa.

Assim, a redução da atividade de LDH para larvas expostas a solução aquosa do óleo é um efeito metabólico provocado pelo mesmo, nas concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 74 $\mu\text{g/mL}$ e que, portanto, podemos afirmar que, nestas duas concentrações a mortalidade das larvas não foi por hipóxia. Por outro lado, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, além dos efeitos de toxicidade promovidos pela exposição ao óleo, como será discutido na seção referente aos dados histológicos, também é provável

que efeitos de hipóxia possam ser operantes, o que explicaria o aumento da atividade de LDH. Numa outra hipótese, nessa concentração alta, o óleo poderia estar promovendo o mesmo efeito que a alimentação provoca, ou seja, o aumento da atividade de LDH.

Por outro lado, é importante observar no gráfico da GSH (Figura 25) (o qual será discutido a seguir) que os valores da atividade antioxidante foram crescentes, com relação ao tempo em que as larvas estavam expostas a solução aquosa. Fica evidente que os mecanismos de defesa das larvas nestas duas concentrações aumentaram com relação ao tempo de exposição. Ou seja, as larvas estavam submetidas a algum tipo de estresse.

Barrera (1996) estudou a resistência ao jejum e a competição entre larvas de 3,5 dias (3º instar) das três espécies do gênero *Aedes*. O estudo mostrou através do consumo de oxigênio, que a taxa metabólica durante o jejum cai significativamente nas quatro espécies estudadas, *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. triseriatus* e *A. taeniorhynchus* (Fig. 21). Os nossos resultados nos permitem sugerir que a redução da taxa de consumo de oxigênio no jejum não significa uma redução da taxa metabólica de uma maneira geral, mas sim uma reorganização metabólica, em especial do metabolismo de carboidratos, com uma possível redução da degradação de glicose.

Figura 21 - Taxa de respiração (média±SE;µl/larva/h) de larvas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes triseriatus* e *Aedes taeniorhynchus* de 3,5 dias, medida pelo consumo de oxigênio. * Poucos sobreviventes.

Species	Days in starvation		
	0	3	6
<i>A.aegypti</i>	3.11 ± 0.20	0.77 ± 0.17	1.34 ± 0.11
<i>A.albopictus</i>	2.02 ± 0.07	0.75 ± 0.07	1.25 ± 0.15
<i>A.taeniorhynchus</i>	2.20 ± 0.20	0.57 ± 0.05	—*
<i>A.triseriatus</i>	2.52 ± 0.06	0.85 ± 0.04	0.94 ± 0.09

Fonte: Barrera, 1996.

É interessante destacar ainda que, que carências nutricionais geram um alongamento no tempo de desenvolvimento larval e também um aumento na mortalidade na fase de transição para o adulto. (BERGO *et al*, 1990).

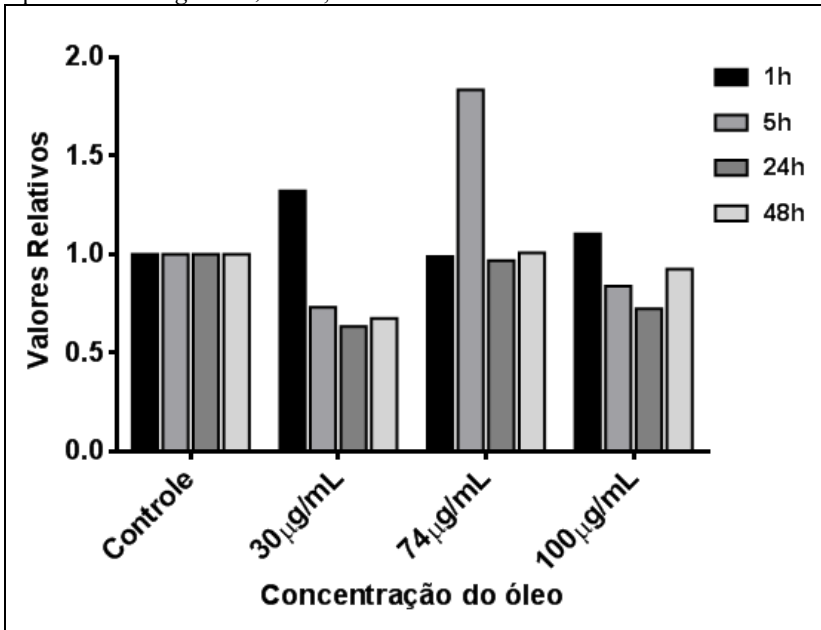
Os dados da atividade enzimática para larvas controle, com e sem alimentação, indicam que existe um alto grau de complexidade e dificuldade na avaliação dos efeitos de toxicidade do óleo em estudo, pois além de demonstrar os efeitos do jejum, também demonstram os efeitos da evolução das larvas no período de 48h, ou seja, as prováveis mudanças de instar e respectivas alterações bioquímicas. Por essa razão, para excluir ou descontar essas influências dos efeitos tóxicos promovidos pela exposição ao óleo, nós avaliamos que a melhor forma seria expressar os dados de atividade como dados relativos ao controle, uma vez que os efeitos de mudança de instar e do jejum estão acontecendo também para as larvas controle. Esse mesmo raciocínio foi, portanto, utilizado na discussão de todos os resultados das atividades enzimáticas.

5.4.2 – Fosfatase Alcalina (FA)

Fosfatases constituem um grupo de enzimas que estão envolvidas e/ou regulam a fosforilação de proteínas relacionadas com a sinalização celular, metabolismo de carboidratos e nucleotídeos, transferência de energia através de ATP, crescimento e diferenciação de tecidos. (COLEMAN, 1992). As fosfatases ácidas são encontradas dentro de vacúolos e intimamente associadas com a face interna de membranas, enquanto que as fosfatases alcalinas são principalmente localizadas nas superfícies luminais de epitélios que transportam metabólitos, incluindo o processo digestivo de larvas e mosquitos. Assim, fosfatases e esterases com diversificado significado fisiológico têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores sensíveis e precisos para avaliar a toxicidade de biocidas químicos e de origem vegetal, sobre pragas e insetos que atuam como vetores de doenças. (ALEXANDER, 1990; WHEELLOCK, *et al.*, 2005).

No gráfico da Fig. 22, podemos observar que após 1 hora, em todas as concentrações, os valores da atividade enzimática foram superiores ou praticamente iguais ao resultado do controle. Após 5 horas de exposição, na solução aquosa a concentração de 74µg/mL, as larvas apresentaram o valor de atividade aumentado, como observado para LDH, sendo que nas outras concentrações, os valores foram menores ou iguais ao controle. Em 24 horas de exposição todas as concentrações tiveram sua atividade abaixo do valor expresso no controle, sendo que após 48 horas de exposição à concentração de 74µg/mL se manteve igual ao controle, mas as outras concentrações tiveram seus valores abaixo do valor apresentado no controle.

Figura 22 - Valores relativos da atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA), em larvas de *aegypti* em 1, 5, 24 e 48 horas de exposição em solução aquosa de *E. staigeriana*; n=10; T= 37°C.



Fonte: A autora, 2015.

O resultado da ANOVA para essa atividade enzimática também indica que a interação entre os efeitos de concentração e efeitos de tempo foi muito significativa (Tabela 7, ver coluna FA). Isto significa que os efeitos das diferentes concentrações foram de fato dependentes dos tempos de exposição, ou seja, há diferenças significativas entre as concentrações dependendo do tempo em que as larvas de *A. aegypti* ficaram expostas a solução aquosa de *E. staigeriana*. Os testes pos-hoc SNK comprovaram as tendências observadas no gráfico acima (Tabela 7, ver coluna FA).

Novamente, assim como na atividade de LDH, os períodos de 0 à 1h e de 1 à 5h são diferentes do restante dos tempos de exposição, de 5 à 48h. Provavelmente, os mesmos efeitos de adaptação também são operantes aqui. Observou-se um aumento de atividade nas primeiras horas de exposição e em seguida ocorre a redução, ou manutenção, da atividade da fosfatase alcalina. Porém, diferentemente da atividade de de

LDH, a atividade observada na concentração de 100 µg/mL não foi superior à atividade nas demais concentrações.

Importante salientar que, neste caso, o método utilizado para determinação da atividade enzimática não permite diferenciar os diversos grupos de fosfatases alcalinas. Em outras palavras, a atividade de fosfatase medida reflete a atividade de um *pool* de enzimas com distribuição entre tecidos diferentes e, embora todas sejam fosfatases alcalinas, também as suas funções específicas são diferentes, incluindo as fosfatases envolvidas no processo digestivo. Neste sentido, seria de se esperar que a atividade do grupo de fosfatases envolvidas no processo digestivo, que promovem a absorção dos lipídeos do óleo, aumentasse como um efeito de compensação provocado pelas alterações induzidas pela presença do extrato de óleo de eucalipto. Também a atividade das fosfatases envolvidas no metabolismo energético poderia aumentar em função do aumento da demanda por energia, em função do processo de desintoxicação e absorção dos lipídeos. Obviamente, esse parece não ser o caso. Alternativamente, o óleo poderia desestruturar a membrana peritrófica e/ou também as células do tecido epitelial do intestino médio, afetando a atividade das enzimas ali contidas, incluindo as fosfatases. Neste caso, poderíamos observar a redução da atividade das fosfatases, como realmente foi observado. As análises histológicas de fato revelaram alterações celulares importantes no intestino médio das larvas expostas ao extrato em estudo, como será discutido posteriormente. Porém, ainda que esse efeito fosse operante, a relação do efeito com a concentração do óleo não poderia ser explicada por um único fator, como pode ser evidenciado pelos efeitos diferentes detectados em 30, 74 e 100 µg/mL, uma vez que não existe proporcionalidade da intensidade do efeito com o aumento de concentração.

Estudos sobre a sensibilidade de larvas à toxina *B.t.i.*, produzida pelo *Bacillus thuringiensis* e usada como larvicida, entre insetos suscetíveis e cepas resistentes revelaram a importância da fosfatase alcalina, especialmente no intestino, a qual serve como um potencial receptor para a ligação da toxina *B.t.i* (ANDRADE & MODOLO, 1991). Embora a fosfatase alcalina e outras enzimas têm sido consideradas por desempenhar um importante papel na toxicidade *B.t.i.*, o efeito direto de *B.t.i.* nestas enzimas permanece ainda em discussão.

Adicionalmente, Koodalingan *et al.* (2011) relataram que o nível da atividade enzimática da FA de larvas expostas a solução aquosa de *Sapindus emarginatus* diminuiu durante o desenvolvimento de larvas de quarto instar do *A. aegypti*, redução esta de 12% do nível de atividade em comparação com o controle. Por outro lado, o estudo com pupas

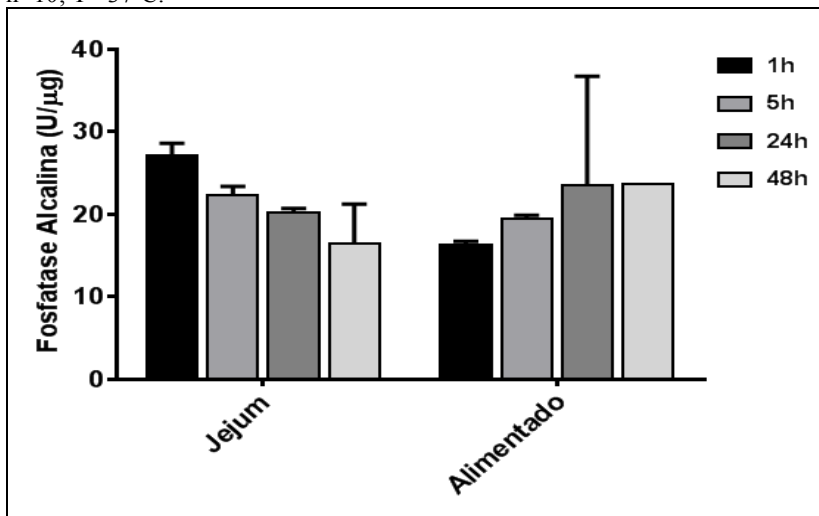
expostas ao mesmo óleo revelou um aumento de 49% de atividade da FA sobre o controle. Da mesma forma, estudos que avaliaram a evolução de larvas de primeiro a quarto instar constataram que durante esse período ocorre uma redução de atividade de fosfatase alcalina. Ou seja, os efeitos observados dependeram da fase de desenvolvimento em que as larvas estavam.

Podemos sugerir que efeitos semelhantes também estão operando no nosso estudo, uma vez que as larvas evoluem das primeiras horas até o tempo de 48h, sendo que nesse tempo, elas certamente estão no 4º instar e se preparam para se transformar em pupas, como já mencionado anteriormente.

Neste sentido, da mesma forma que para LDH, os efeitos do jejum e evolução morfológica das larvas sobre a atividade das fosfatases em estudo foram avaliados. Para tanto, as larvas foram monitoradas de 0 à 48h, com e sem alimentação, não expostas ao extrato de óleo.

O gráfico da Figura 23 indica que, em primeiro lugar, o jejum e as alterações morfológicas relativas à mudança de instar promovem a redução na atividade de fosfatase alcalina. Em segundo lugar, demonstra que a alimentação pode mudar esse comportamento, para o intervalo de tempo de 0 à 24h, porém, no tempo de 48h esse efeito de redução da atividade é aprofundado.

Figura 23 - Atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) em larvas de *Aedes aegypti* do grupo controle em 1, 5, 24 e 48 horas em jejum e com alimento; n=10; T= 37°C.



Fonte: A autora, 2015.

Outro fator importante na discussão da participação das fosfatases é relativo às fosfatases envolvidas na regulação do metabolismo energético.

Em estudo feito com o mosquito *Culex quinquefasciatus* Alves *et al.*, (2010) observaram uma alteração no pH do intestino médio, quando as larvas foram expostas aos inseticidas: temefós, cipermetrina, deltametrina, ivermectina e abamectina. Segundo Clements, (1996) o pH do intestino médio de mosquitos varia de espécie para espécie, mas é mantido entre 10,5 e 11,0 na região anterior.

Segundo os autores, a alteração observada sugere um desequilíbrio elétrico, já que a manutenção do pH alcalino é o principal gasto energético das larvas, podendo gerar um desarranjo fisiológico também na hemolinfa dos mosquitos. (ALVES *et al.*, 2010).

Para que as larvas consigam um pH alcalino de 11,0, no intestino médio, cátions, como Na^+ ou K^+ e ânions, como OH^- , CO_3^{2-} ou HCO_3^- precisam ser acumulados no lúmen do intestino mediano. Portanto, duas vias de transporte epitelial são utilizadas com a função de alcalinizar o mesmo. (BOUDKO, *et al.*, 2001).

Íons de K^+ ou Na^+ são bombeados ativamente para dentro da hemolinfa, de tal forma que a energia para o movimento destes íons seja

provida pela V-ATPase presente no ápice das membranas do ceco anterior de insetos. (CHAPMAN, 1998).

Na região do intestino médio das larvas de *A. aegypti*, a H^+ -V-ATPase está presente na membrana basal, sendo que o transporte de prótons de células intestinais para a hemolinfa poderá acidificar a hemolinfa, enquanto os prótons que seguem para o lúmen tende a alcalinizá-lo. No entanto, este movimento deverá ser hiperpolarizado por enzimas tanto na membrana apical como na membrana basal. (FILIPPOVA *et al.*, 1998; ZHUANG *et al.*, 1999; BOUDKO *et al.*, 2001).

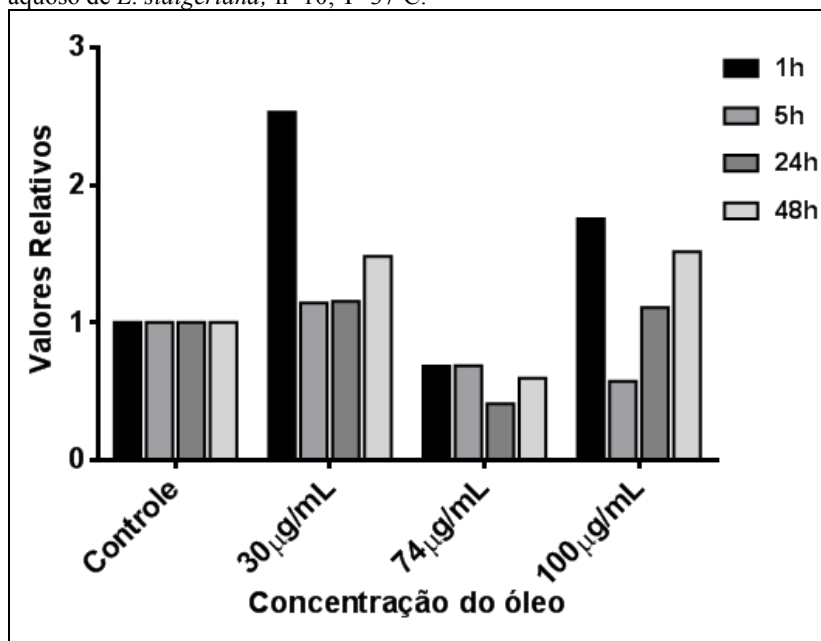
Aqui cabe ressaltar que o estudo feito por Alves *et al.*, (2010) demonstrou o aumento de alteração no pH do intestino mediano de *C. quinquefasciatus* e concluiu que os inseticidas podem estar influenciando nesta V-ATPase de tal forma que íons tendem a passar da hemolinfa para o lúmen, podendo acidificar o intestino médio das larvas. No mesmo estudo o autor também percebeu o aumento das invaginações na membrana basal do tubo intestinal como sendo um indicativo da alteração no transporte de eletrólitos, pois este aumento pode resultar no acréscimo de bombas iônicas na tentativa de bombear íons para o lúmen a partir da hemolinfa.

Em nossas análises histológicas também conseguimos perceber o aumento das invaginações (Fig. 34) na porção basal do epitélio do intestino médio das larvas de *A. aegypti*, observando com isso uma diferenciação na coloração das células ao longo do intestino mediano, provavelmente provocado pela mudança de pH.

5.4.3 – Colinesterase (COL)

O perfil de atividade enzimática com o tempo para essa enzima é diferente das demais enzimas estudadas. Também o perfil de variação da atividade em função das concentrações é diferente. No gráfico (Fig. 24), podemos observar que na concentração de 74 μ g/mL, em todos os tempos de exposição estudados, a atividade enzimática foi abaixo dos valores expressos no controle. Já na concentração de 100 μ g/mL seu valor expressou-se maior que o controle, com exceção do tempo de exposição de 5 horas. Na concentração de 30 μ g/mL, em todos os tempos de exposição estudados, os valores ficaram acima dos valores expressados pelo controle.

Figura 24 - Valores relativos da atividade enzimática da colinesterase (COL) em larvas de *Aedes aegypti* em 1, 5, 24 e 48 horas de exposição em extrato aquoso de *E. staigeriana*; n=10; T=37°C.



Fonte: A autora, 2015.

O resultado da ANOVA indica que os efeitos das diferentes concentrações foram dependentes dos tempos, ou seja, a concentração do extrato afetou a atividade da enzima de forma significativamente diferente, dependendo do tempo que as larvas ficaram expostas a solução aquosa. (Tabela 7, ver coluna COL).

Também para a atividade de colinesterase, a relação do efeito observado com a concentração do óleo não poderia ser explicada por um único fator, como pode ser evidenciado pelas diferenças detectadas em 30, 74 e 100 µg/mL, uma vez que não existe proporcionalidade da intensidade do efeito com o aumento de concentração.

Acetilcolinesterase (Ace) é uma enzima essencial no sistema nervoso de todos os animais. Está presente nas membranas pós-sinápticas e seu principal papel é interromper a transmissão nervosa, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina. (SOREQ & SEIDMAN, 2001; REVUELTA *et al.*, 2009).

A Ace vem sendo muito pesquisada por ser o alvo dos inseticidas organofosforados e carbamatos. Sua inibição por estes inseticidas faz com que a enzima perca a capacidade de hidrolisar a acetilcolina e, com isso, a concentração do neurotransmissor permanece alta nas junções nervosas, causando excitação exagerada, o que eventualmente culmina na morte do inseto. (FUKUTO, 1990, WALSH *et al.* 2001, NABESHIMA *et al.* 2003; WU *et al.*, 2010). Exatamente por essa razão, verificar se a atividade larvicida do óleo poderia ser via neurotoxicidade, é que avaliamos o comportamento dessa enzima no presente estudo.

O papel fisiológico de duas diferentes acetilcolinesterases estudadas em alguns insetos ainda não está claro. No entanto, Revuelta *et al.* (2009) analisando os dois genes *ace* de *Blattella germanica* por meio de RNA de interferência e PCR quantitativo, demonstraram que o produto do gene *ace-1* é o principal responsável pela hidrólise fisiológica de acetilcolina: cerca de 65-75% de toda a atividade colinesterásica neste modelo.

Trabalhos relatam que larvas expostas a substâncias consideradas larvicidas exibem a inibição significativa a acetilcolinesterase, mostrando a atividade neurótoxica para *A.aegypti* e *C. quinquefasciatus* (KODALINGAM *et al.*, 2011; KODALINGAM *et al.*, 2012), sendo a dosagem da sua atividade utilizada frequentemente como biomarcador de efeito.

Como mostra o gráfico (Fig. 24), em nosso estudo sobre a ação larvicida da solução aquosa de *E. staigeriana*, aparentemente, a solução não se mostrou um larvicida neurotóxico, uma vez que a atividade de colinesterase não foi inibida, com exceção do efeito observado na concentração de 74 µg/mL e no período de 1h para a concentração de 100 µg/mL, porém, neste caso, aumentando sucessivamente com o tempo.

Em resumo, a variação das atividades de todas as enzimas estudadas não obedece a uma regra simples em relação à concentração do óleo e, portanto, exibiu um certo grau de dificuldade na sua explicação. Tal fato é comum quando se estuda misturas complexas de agentes tóxicos, como no caso da solução aquosa do óleo de eucalipto. Tais misturas complexas são constituídas de muitas substâncias diferentes, as quais podem apresentar efeitos antagônicos ou sinérgicos, umas em relação às outras. Assim, a relação dose resposta é a resultante de vários efeitos e, portanto, bastante complexa.

5.5 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

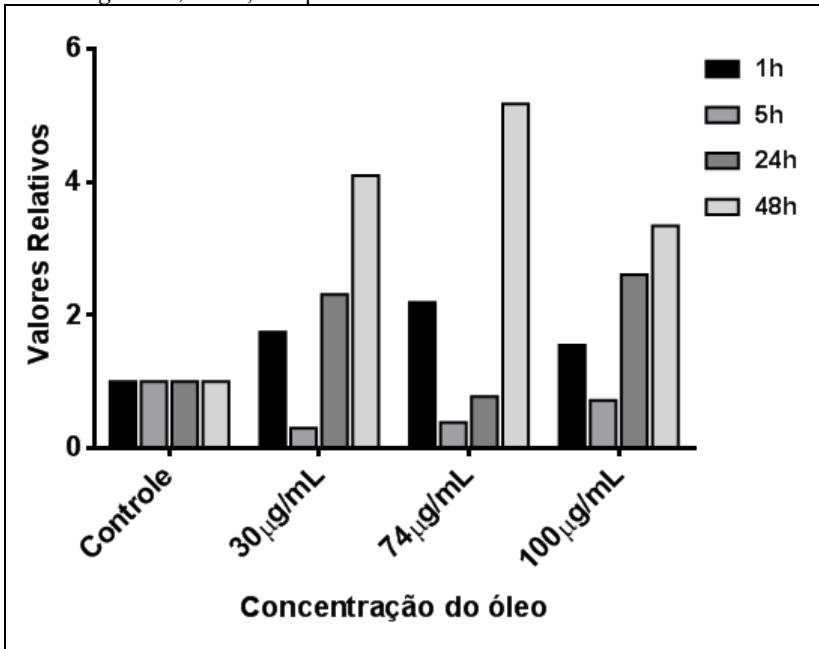
Os procedimentos para obtenção dos homogenatos foram os mesmos utilizados para analisar as enzimas LDH, FA e COL, já explicados no item 5.4.

Entende-se como estresse oxidativo quando ocorre uma produção de espécies oxidantes numa quantidade maior do que os sistemas de desintoxicação são capazes de suportar. Essa situação fisiológica de desbalanceamento causa oxidações não específicas de proteínas, ácidos nucleicos, membranas, que lesam os sistemas biológicos. (JONES, 2006).

5.5.1 – Glutationa Reduzida (GSH)

A Figura 25 mostra que a atividade de GSH em 1 hora, em todas as concentrações, está acima dos valores expressos pelo controle. Em 5 horas de exposição a solução aquosa, em todas as concentrações, os valores ficaram abaixo dos valores contidos no controle. Mas, em 24 horas, com exceção da concentração de $74\mu\text{g/mL}$, os valores estão acima dos valores expressos pelo controle e ainda maiores do que os valores expressos em 1 hora de exposição a solução aquosa. Da mesma forma, nas 48 horas de exposição, os valores da atividade estão, em todas as concentrações, maiores se compararmos com os demais tempos de exposição, bem como com os valores expressos no controle.

Figura 25 - Valores relativos da atividade da glutatona reduzida (GSH) em larvas de *Aedes aegypti* em 1, 5, 24 e 48 horas de exposição em extrato aquoso de *E. staigeriana*; n=10; Temperatura ambiente.



Fonte: A autora, 2015.

O resultado da ANOVA indica que a interação entre os efeitos das concentrações e tempo foi extremamente significativa (Tabela 8, ver coluna GSH). Isto significa que as concentrações foram de fato dependentes dos tempos, ou seja, há diferenças muito significativas entre as concentrações dependendo do tempo em que as larvas de *A. aegypti* ficaram expostas a solução aquosa de *E. staigeriana*. Os testes pos-hoc SNK comprovaram as tendências observadas no gráfico acima.

Tabela 8- Resultados da análise de variância para atividades de glutatona reduzida (GSH), catalase (CAT) e proteína totais. Os termos de interesse significativos ($\alpha=0,05$) utilizados nas comparações *a posteriori* estão em negrito. Para os testes Student-Newman-Keuls (SNK): Ct (controle), 30, 74 e 100=concentrações em $\mu\text{g/mL}$. “ < “ ou “> “, indica $p<0,05$ e = indica $p>0,05$. Níveis de significância * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Fatores	GL	GSH		CAT		Proteínas Totais	
		F		F		F	
[]	3	8,33		1,59		9,73	
t	3	130,19		7,01		14,35	
t x []	9	17,82***		2,80*		13,44***	
Resíduo	16						
SNK		t x []		t x []		t x []	
		1h	Ct<100=30<74	1h	74=Ct=30=100	1h	100=30<74=Ct
		5h	30=74<100<Ct	5h	100=Ct=30=74	5h	74=Ct<30<100
		24h	74=Ct<30=100	24h	30=100=Ct=74	24h	74=100=30<Ct
		48h	Ct<100=30=74	48h	Ct<100=74=30	48h	100<74=30=Ct

Fonte: A autora, 2015.

A atuação protetora/antioxidante da GSH, dependendo da sua relação de concentração com o agente oxidante, é capaz de prevenir os danos às membranas celulares e a outras macromoléculas. Esta molécula hidrossolúvel pode ser encontrada desde os microrganismos até plantas e animais superiores. É encontrada principalmente no citosol celular e em outras fases aquosas de sistemas vivos, onde desempenha um papel fundamental na regulação do balanço redox. Assim sendo, pode ser usada como um indicador de estresse oxidativo no processo de intoxicação por xenobióticos. (JEFFERIES *et al.*, 2003; KONISHI *et al.*, 2005).

Na presente pesquisa, no final do período de exposição (48 horas) pode-se constatar um aumento significativo de GSH nas larvas expostas a solução aquosa de *E. staigeriana* em relação ao controle, indicando que o efeito de toxicidade do extrato do óleo pode envolver a formação de radicais livres e/ou espécies ativas de oxigênio, estimulando assim a elevação da concentração de GSH.

Desta forma, os resultados parecem confirmar (Figura 17, resultados de LDH) que a GSH é frequentemente a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, inclusive em larvas de mosquitos. Os níveis de GSH podem aumentar devido a um mecanismo de adaptação a um estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998; ZHANG *et al.*, 2005).

Na literatura, não encontramos nenhum estudo acerca da atuação da GSH como defesa antioxidante em larvas de mosquitos, em especial de *A. aegypti*, após a exposição à xenobióticos. Porém, esta defesa

antioxidante é muito estudada em outros organismos aquáticos como os peixes e algas.

Em estudos realizados por Lima *et al.* (2006) foi observado que, em sete dias, tilápias expostas a efluentes de indústria suína apresentaram baixos níveis de GSH, por outro lado, após 90 dias de exposição foi observado elevado conteúdo de GSH sugerindo adaptação antioxidante em resposta a exposição crônica. Assim, o aumento nos níveis de GSH sugere resposta adaptativa e de proteção desta biomolécula contra o estresse oxidativo, induzido por substâncias contaminantes. (PANDEY *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004; FAROMBI *et al.*, 2007).

Modesto (2009) estudou o efeito de dois tipos de herbicidas à base de glifosato, Roundup® e Roundup Transorb®, para a espécie de peixe nativa *Prochilodus lineatus* após 6 e 24 horas de exposição, e observou um aumento significativo no conteúdo da GSH, quando comparados com os respectivos controles. Ele supôs que a GSH foi utilizada prioritariamente como defesa antioxidante.

Já Torres *et al.* (2008) estudaram a susceptibilidade das defesas antioxidantes e de mecanismos de desintoxicação de xenobióticos na microalga diatomácea *Minutocellus polymorphus* quando submetida a concentrações subletais de oxifluorfenol e de benzo[a]pireno em exposição aguda. Os resultados mostraram que a GSH diminuiu frente aos controles, em quase 40% sob ação do oxifluorfenol e mais de 50% nas culturas com benzo[a]pireno.

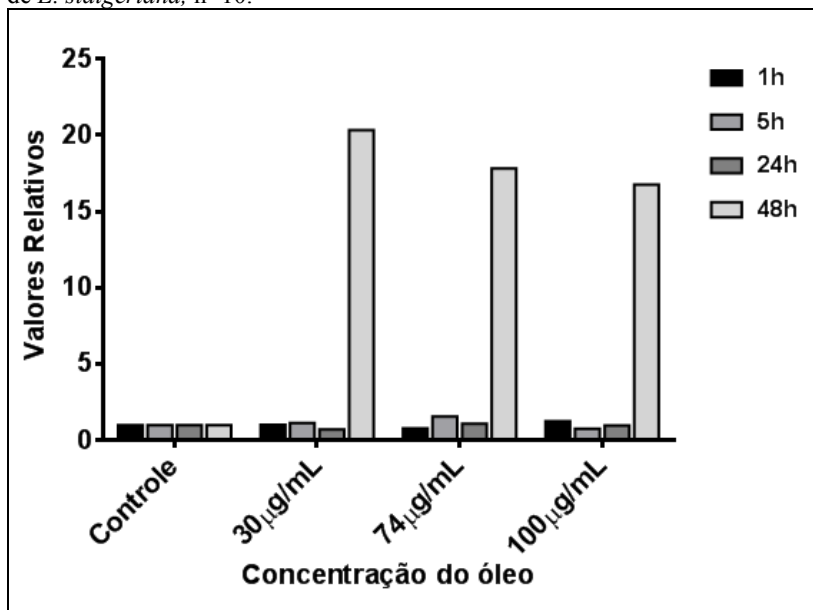
Ghelfi (2014) estudou os efeitos tóxicos agudos causados pela exposição ao diclofenaco em concentrações semelhantes às encontradas no ambiente no peixe *Rhamdia quelen*. Ao ser avaliada nesse estudo, a GSH não apresentou alteração em seu níveis em nenhuma concentração de diclofenaco testada em relação ao controle, no fígado e no rim. A redução nas concentrações da GSH poderia estar diminuída em função da conjugação da GSH com xenobiótico para a ação catalítica da Glutathione Transferase (GST), desta forma agiria como um agente celular redutor que protegeria a célula contra os radicais livres.

A diminuição no conteúdo de GSH pode ser um indicio de que, num estresse severo, haja depleção deste tiol devido à perda do mecanismo de adaptação ou devido à oxidação interna da GSH sem haver a reposição de sua forma reduzida. (ZHANG *et al.*, 2005).

5.5.2 – Catalase (CAT)

Na Figura 26 observamos que a atividade da catalase aumentou consideravelmente somente nas larvas expostas por 48 horas a solução aquosa, em todas as concentrações. Sendo que nos demais os tempos observados, a atividade da CAT foi menor ou igual ao controle, em todas as concentrações.

Figura 26 - Valores relativos da atividade enzimática da catalase (CAT) em larvas de *Aedes aegypti* em 1, 5, 24 e 48 horas de exposição em extrato aquoso de *E. staigeriana*, n=10.



Fonte: A autora, 2015.

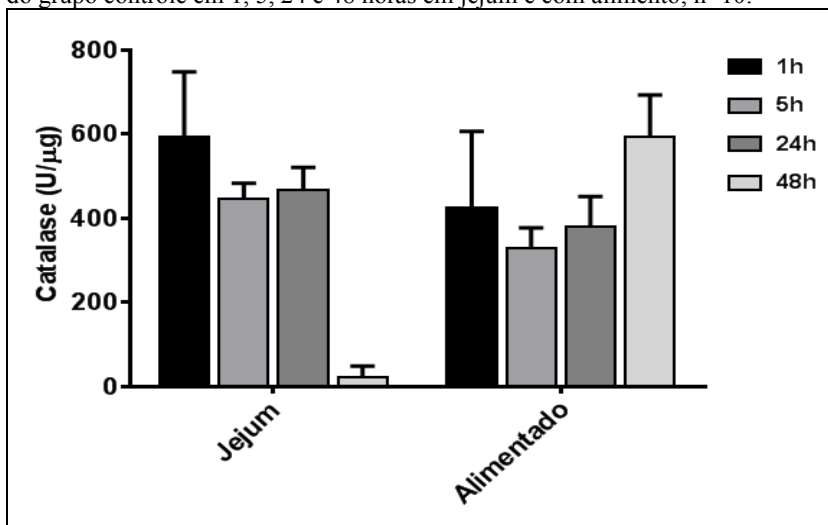
O resultado da ANOVA indica que a interação entre concentrações e tempo foi pouco significativa (Tabela 8, ver coluna CAT). Os testes pos-hoc SNK comprovaram as tendências observadas no gráfico acima.

Sim *et al.* (2011) estudaram a produção de catalase em mosquitos adultos da espécie *Culex pipiens* esclarecendo os mecanismos envolvidos na regulação da síndrome da diapausa em mosquitos fêmeas. Demonstrou que dois genes que codificam para as enzimas antioxidantes, catalase e sod-1, 2 e 3 e a glutathiona peroxidase, oferecem um papel protetor em mosquitos diapáusicos. Catalase, em particular,

desempenha um papel fundamental na proteção aos danos oxidativos dos ovários.

Curiosamente, na presente pesquisa, as larvas expostas a solução aquosa apresentaram diferença significativa em relação ao controle, apenas no período de 48 horas. Entretanto, quando comparamos as larvas que ficaram alimentadas por 48 horas de bioensaio com as larvas em jejum, no mesmo período, observamos que a atividade da CAT nas larvas em jejum por 48 horas é muito baixa com relação a todos os demais tempos, mas particularmente menor do que o valor encontrado para as larvas alimentadas (Fig. 27).

Figura 27 - Atividade enzimática da catalase (CAT) em larvas de *Aedes aegypti* do grupo controle em 1, 5, 24 e 48 horas em jejum e com alimento; n=10.



Fonte: A autora, 2015.

Esses resultados demonstram que a elevação da atividade da catalase se deve à exposição ao óleo, ou por responder a um processo de toxicidade, ou por significar que o óleo de alguma maneira faz o papel do alimento. A atividade da CAT em larvas de mosquito na literatura é pouco explorada.

SOHAL *et al.* (1983) estudaram a determinação do padrão dos mecanismos de proteção contra radicais livres, associados com a idade, durante a respiração aeróbica da *Musca domestica*. A atividade da CAT diminuiu bastante, progressivamente com a idade; 19 dias de idade as moscas exibiram redução de aproximadamente 45% na atividade da

CAT em comparação com o moscas de 3 dias de idade. O estudo indica que, em geral, o envelhecimento na mosca doméstica é acompanhado por um declínio na atividade da CAT.

Benassi (2004) verificou um aumento da atividade da CAT em peixes, *Oreochromis niloticus*, expostos aos efluentes originários da mineração de carvão não remediados, em relação ao grupo controle. O autor sugere que a presença de compostos tóxicos no efluente de carvão não remediado provavelmente favoreceu a formação de peróxido de hidrogênio.

Suryawanshi *et al.* (2015) investigaram a eficácia da prodigiosina pura (pigmento natural, de cor vermelha, produzido pela bactéria *Serratia marcescens*), como propriedade larvicida contra larvas e pupas dos mosquitos *A. aegypti* e *Anopheles stephensi*, onde demonstrou atividade inibitória para as espécies anteriormente citadas, independente do estágio de desenvolvimento, sendo que não existiu inibição da CAT nas larvas testes, bem como no controle.

Hermes-Lima & Storey (1996) consideram que a elevação da atividade da CAT em alguns organismos, representa um caráter adaptativo que está associado à prevenção do estresse oxidativo, em função do aumento da produção de peróxido de hidrogênio.

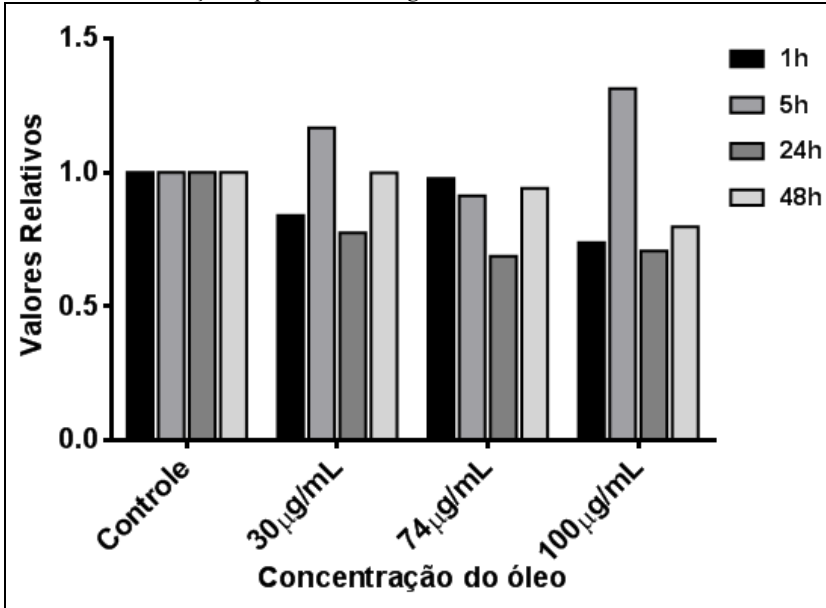
5.6 – Proteínas Totais

A Figura 28 mostra que os valores dos níveis de proteínas totais em 1 hora, nas concentrações de 100µg/mL e 30µg/mL, estão abaixo dos valores expressos pelo controle, entretanto a concentração de 74µg/mL está igual ao valor expresso no controle. Em 5 horas de exposição a solução aquosa, as concentrações de 100 e 30µg/mL tiveram seus valores maiores que os valores contidos no controle, já na concentração de 74µg/mL seu nível ficou quase igual ao do controle. Mas, em 24 horas, todas as concentrações tiveram seus níveis de proteínas totais abaixo dos valores expressos pelo controle. Em 48 horas os níveis de proteínas totais aumentaram com relação aos valores obtidos em 24 horas, mas se mostraram menores que os níveis expressos pelo controle. O perfil de alteração da atividade com o tempo é diferente em cada uma das concentrações, ou seja, não foi observada uma tendência claramente definida de variação.

Adicionalmente, também constatou-se que o perfil de alteração da concentração de proteínas totais não se correlacionou com nenhum perfil de atividade enzimática avaliado - LDH, FA, e COL. Isso significa

que, provavelmente, as alterações na concentração de proteínas totais observada não se deve a um grupo em particular de proteínas.

Figura 28 - Níveis de proteínas das larvas de *Aedes aegypti* expostos por 1, 5, 24 e 48 horas em solução aquosa de *E. staigeriana*; n=10.



Fonte: A autora, 2015.

O resultado da ANOVA indica que a interação entre os efeitos das concentrações e tempo foi extremamente significativa (Tabela 8, ver coluna Proteínas Totais). Isto significa que as concentrações foram de fato dependentes dos tempos, ou seja, há diferenças muito significativas entre as concentrações dependendo do tempo em que as larvas de *A. aegypti* ficaram expostas a solução aquosa de *E. staigeriana*. Os testes pos-hoc SNK comprovaram as tendências observadas no gráfico acima.

Um número significativo de pesquisadores examinaram o impacto de uma variedade de biocidas no nível de proteínas totais em insetos. Por exemplo, a concentração de proteínas totais em ninfas do coleóptero, *Callosobruchus maculatus*, foi afetada após a exposição desses insetos a um inseticida obtido da folha de *Bauhinia monandra*. (MACEDO *et al.*, 2007).

Recentemente, Koodalingam *et al.* (2009) relataram a redução do nível de proteína total de larvas e pupas de *A. aegypti* expostos ao

extrato de *Sapindus emarginatus*, com atividade larvicida, como no presente estudo. Adicionalmente, verificou-se que o metabolismo de proteínas em larvas de *A. aegypti* expostas ao Vectobar foi perturbado com a evidente redução de 34% no nível de proteínas totais nos homogenatos de larvas. Esta observação sugere um efeito tóxico direto do produto a base de *B.t. i.*, toxina na maquinaria sintética de proteínas da larva do mosquito.

Na análise qualitativa realizada utilizando PAGE bidimensional, Huang *et al.* (2004) demonstraram expressão defeituosa de importantes proteínas em larvas expostas a azadirachtin (composto químico que pertence ao grupo limonóide, é um metabolito secundário presente em sementes de amargosa (Neem)). Da mesma forma, estudos também demonstraram que o metabolismo geral das proteínas foi perturbado nas larvas após exposição ao extrato de *Sapindus emarginatus*.

5.6 Histologia do Sistema Digestório de *Aedes aegypti*

5.6.1 Padronização da metodologia

a – Fixação - Entre os fixadores utilizados, verificou-se que o fixador de Bouin (Beçak & Paulete, 1976) apresentou uma boa preservação histológica da larva de *A. aegypti*, com boa definição das estruturas após a coloração.

b – Inclusão - As preparações histológicas do material incluído em historesina apresentaram qualidade superior às do material incluído em parafina, já que o uso de historesina proporcionou a obtenção de cortes mais finos (3 μ m), com menor sobreposição das estruturas celulares. Diante disso, a inclusão em parafina foi descartada e passou-se a utilizar somente a inclusão em historesina.

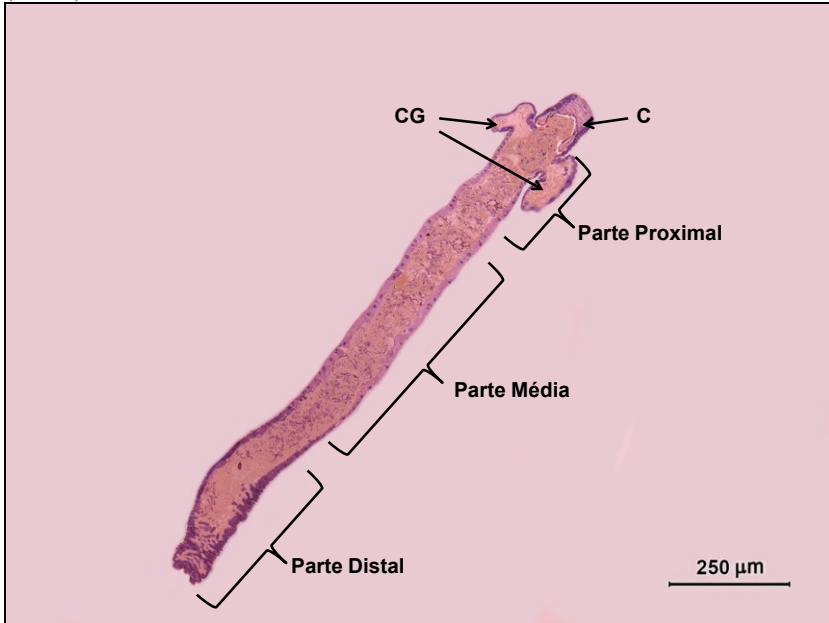
5.6.2 Descrição Histológica do Intestino da Larva de *Aedes aegypti*

O Intestino dos mosquitos é dividido anatomicamente em três regiões: intestino anterior, intestino mediano e intestino posterior. Neste estudo, foi analisado somente o intestino mediano, responsável pela maior parte da digestão, onde ocorrem a secreção das enzimas digestivas e a absorção dos nutrientes.

O intestino mediano, ou mesêntero, de larvas do grupo controle de 3^o/4^o instar de *A. aegypti* é subdividido em três regiões distintas: parte

proximal em que os cecos gástricos estão presentes; parte **média** e parte **distal**, onde encontramos diferentes tipos celulares (Fig. 29).

Figura 29 - Fotomicrografia intestino mediano da larva de *Aedes aegypti* de 3^o/4^o instar, controle, coradas com HE; vista geral, 40x. CG (cecos gástricos), C (cárdia).



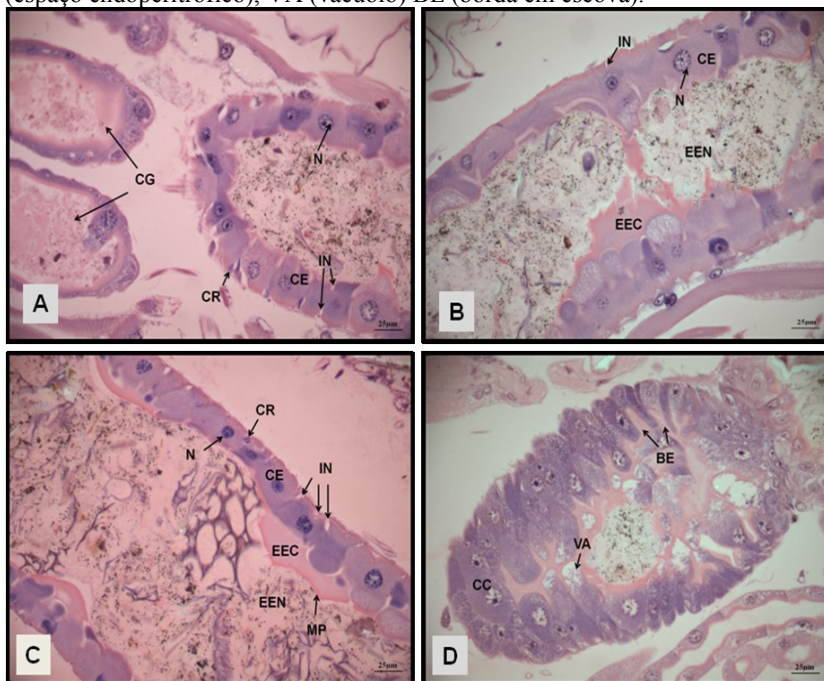
Fonte: A autora, 2015.

O epitélio do intestino mediano é do tipo simples, com células cúbicas nas partes proximal e média. Na parte distal, as células são colunares. Subjacente ao epitélio do intestino observa-se uma delgada camada de tecido conjuntivo (Fig. 30).

As células da parte proximal (Fig 30A) caracterizam-se por apresentar citoplasma heterogêneo, acidofilia moderada, núcleo esférico e central (N) e a presença de microvilosidades em sua membrana plasmática apical, formando a borda em escova. Nesta parte, encontram-se os cecos gástricos (CG), onde ocorre a digestão intermediária e final (Fig 30A).

Figura 30 - Fotomicrografia do intestino mediano de larvas de 3^o/4^o instar de *Aedes aegypti*, controle, coradas com HE, 400x, A (parte proximal), B e C (parte média), D (parte distal), CG (cecos gástricos), CE (células epiteliais

cúbicas), N (núcleo), CR (células regenerativas), IN (invaginações no tecido epitelial), MP (membrana peritrófica), EEC (espaço ectoperitrófico), EEN (espaço endoperitrófico), VA (vacúolo) BE (borda em escova).



Fonte: A autora, 2015

As células epiteliais da parte média (Fig. 30B e C) apresentam forma cúbica (CE), núcleo esférico e microvilosidades em sua membrana plasmática da região apical. Destaca-se, ainda, a presença de invaginações dispostas regularmente (IN) na região basal do epitélio intestinal, que podem ou não serem bem visíveis, dependendo da condição metabólica da larva. Embora na literatura não exista uma descrição precisa e detalhada de tais estruturas, as invaginações observadas formam uma rede de espaços intercelulares, tal como canais estreitos, que penetram na região basal do tecido e cujas aberturas comunicam-se diretamente com a lâmina basal. Tal arranjo de estruturas está localizado em uma região onde ocorre o intenso fluxo de fluidos, provavelmente, relacionado com o transporte de água, proteínas e íons através do epitélio. (THREADGOLD, 1976; MARTOJA & BALLAN-DUFRANÇAIS, 1984). Em estudo realizado com a espécie *Rhynchosciara americana*, Ferreira *et al.* (1981) analisou a organização

de um sistema de transporte, introduzindo a base morfológica para o modelo de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas. Berridge (1970) e Ribeiro *et al.* (1990) verificaram que as invaginações presentes nos cecos gástricos formam um compartimento extracelular que possui acesso restrito à hemolinfa, devido à presença de poucas aberturas das invaginações para o espaço extracelular. Tal organização estrutural deve permitir à célula concentrar solutos nesse compartimento, criando assim um gradiente de pressão osmótica entre o mesmo e o lúmen, auxiliando, portanto, na tomada de água da luz, como deve ocorrer na região do reto.

Na parte distal do intestino mediano, as células do epitélio são colunares (CC) com núcleo esférico e inúmeros vacúolos (VA) no citoplasma da região apical (Fig. 30C e D). O termo célula colunar vem sendo utilizado há um bom tempo para nomear as células que desempenham as principais funções no processo digestivo de insetos (WIGGLESWORTH, 1972; MARTOJA & BALLAN-DUFRAÇAIS, 1984; RIBEIRO *et al.*, 1990; TERRA, 1990), assim essa denominação excedeu os limites da morfologia, agrupando um caráter fisiológico. A região apical destas células apresenta uma espessa borda em escova (BE) com grande quantidade de microvilosidades. A borda em escova é observada em todo o intestino mediano, sendo mais espessa na parte posterior (Fig 30D)

Observam-se, também, ao longo do intestino mediano, células basais regenerativas (CR), distribuídas isoladamente ou em grupos na base do epitélio. As células regenerativas são pequenas, triangulares, com um núcleo arredondado (Fig. 30 A e C). O processo de renovação do epitélio a partir da diferenciação das células regenerativas parece ser um mecanismo comum entre os insetos (CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 1999), tendo sido observado em várias espécies. (TERRA 1988; CHAPMAN, 1998). As células regenerativas se dividem por mitose e substituem as células mais velhas, que se degeneram e são liberadas para a luz do tubo. (TERRA, 1988; CHAPMAN, 1998).

Ao longo de todo o intestino mediano observa-se a membrana peritrófica (MP), importante estrutura no sistema digestório de insetos (Fig. 30C). A membrana peritrófica é acelular, composta por uma rede de quitina e proteínas (peritrofinas). Esta membrana está presente no intestino mediano da maioria dos insetos, com exceção dos Hemiptera e Thysanoptera. (TELLAM, 1996; TERRA, 2001; HEGEDUS, 2009). Em certos insetos, como mosquitos hematófagos, a membrana peritrófica só é secretada após a distensão do tubo digestório com a alimentação (RICHARDS & DAVIES, 1997), mas em outros insetos a membrana

peritrófica é parcialmente solubilizada durante a fixação e só pode ser detectada durante a dissecação. (TERRA, 2001). Alguns autores destacavam que a função da membrana peritrófica era apenas de proteção contra possíveis danos mecânicos causados ao epitélio intestinal pelo alimento ingerido. (PETERS, 1992). Posteriormente, uma função de barreira contra microrganismos foi reconhecida (JACOBS-LORENA & Oo, 1996; TELLAM, 1996; LEHANE, 1997) e muitos autores consideram ser esta a sua principal função. (LEHANE, 1997). Davidson (1979) relatou que larvas de *C. quinquefasciatus*, infectadas por *Bacillus sphaericus*, apresentaram a membrana peritrófica dobrada em zig-zag devido à expansão do intestino médio e Lacey & Federici (1979) encontraram aspecto morfológico semelhante em larvas de *Simulium vittatum* expostas ao *B. thuringiensis*.

Dados mais recentes salientam o papel da membrana peritrófica na compartimentalização dos eventos da digestão, dividindo a luz do intestino em um espaço endoperitrófico (Fig. 30B e C) (interior do espaço delimitado pela membrana peritrófica) e um espaço ectoperitrófico (Fig. 30B e C) (no exterior da região definida pela membrana peritrófica). (TERRA, 2001). Esta organização definida pela membrana peritrófica permite a criação de um contra-fluxo de água na região ectoperitrófica da parte posterior para a parte anterior do intestino mediano, contrário ao fluxo antero-posterior do alimento ingerido.

Zhuzhikov (1970) relata também que, a MP de larvas de *A. aegypti* não possui permeabilidade iônica seletiva, sugerindo que trocas iônicas de compostos inorgânicos dissociados não teriam sua passagem afetada através da MP. Desta forma, é provável que as moléculas do óleo essencial dissolvidos na água, possam passar pela MP e cheguem às células do intestino mediano das larvas de *A. aegypti*, onde ocorre absorção e conseqüentemente seus efeitos deletérios poderiam então ser pronunciados.

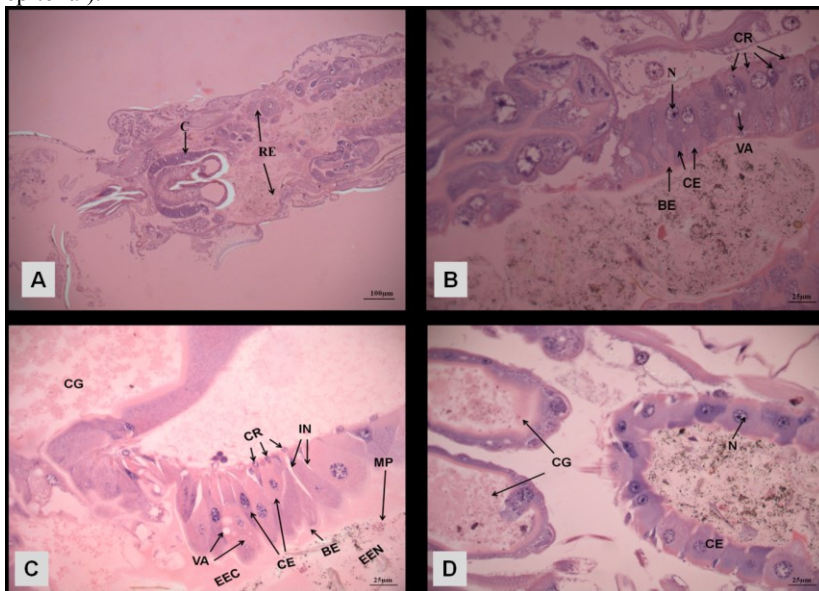
5.6.3 Alterações Histológicas observadas nas Larvas de *Aedes aegypti* expostas a solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana*

Algumas mudanças no comportamento das larvas expostas a solução aquosa foram observadas durante os bioensaios, quando comparadas às do grupo controle, como, por exemplo, a diminuição gradativa dos movimentos. As larvas apresentaram movimentos mais lentos a partir de 1 hora do início dos testes, principalmente as larvas expostas nas concentrações de 100 e de 74µg/mL. Após 1 hora de exposição algumas larvas entraram em estado letárgico, permanecendo

assim mesmo quando estimuladas. Larvas mortas foram descartadas para evitar qualquer interferência na análise histológica.

As modificações morfológicas nas células do mesêntero das larvas foram observadas já a partir da primeira coleta no tempo 1 hora de exposição a solução aquosa. Na parte anterior de larvas expostas a concentração de 100µg/mL (Fig. 31), verificou-se o rompimento do epitélio intestinal. Esta alteração pode estar relacionada à alta mortalidade de larvas (100%) nesta concentração e em concentrações mais altas nos bioensaios de atividade larvicida no tempo de 2 horas (Fig.12 – Gráfico de mortalidade, no item 5.2). Por outro lado, no controle e nas outras concentrações menores analisadas, nos tempos de exposição de 5, 24 e 48 horas, do extrato aquoso de *E. staigeriana* não observou-se ruptura drástica do epitélio, embora tenham sido observadas outras alterações. Na literatura, não encontramos relatos sobre o rompimento total do epitélio em larvas de mosquitos sob impacto de agentes químicos estressores. Aqui cabe destacar que o óleo de eucalipto é formado basicamente de compostos químicos altamente lipofílicos, os quais podem se ligar ou se fundir com estruturas lipídicas das membranas celulares.

Figura 31 - Fotomicrografia das modificações celulares da parte proximal do intestino mediano de larvas de *Aedes aegypti*, coradas com HE, 100x (A), 400x (B, C e D). C (cárdia), CG (cecos gástricos), CE (células epiteliais), N (núcleo), CR (células regenerativas), IN (invaginações no tecido epitelial), MP (membrana peritrófica), EEC (espaço ectoperitrófico), EEN (espaço endoperitrófico), VA (vacúolo) BE (borda em escova), RE (rompimento epitelial).

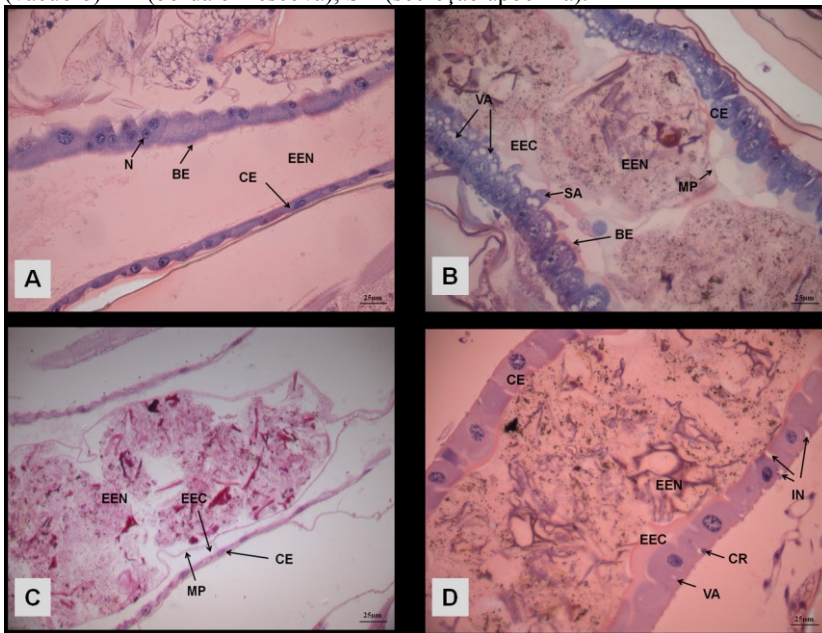


Fonte: A autora, 2015.

Outra modificação observada foi na forma da célula de todo o epitélio do intestino mediano a partir de 5 horas de exposição a solução aquosa de *E. stageriana*. Na parte proximal, o epitélio cúbico simples modificou suas células tornando-as alongadas e seus núcleos de posição central passaram para basais. Modificações essas observadas nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 31B) e 74 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 31C).

Adicionalmente, em 24 horas o epitélio da parte média, modificou-se de epitélio cúbico para epitélio pavimentoso, na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 32A) e em 48 horas, ocorreu à mesma modificação do epitélio, mas na concentração de 74 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 32C).

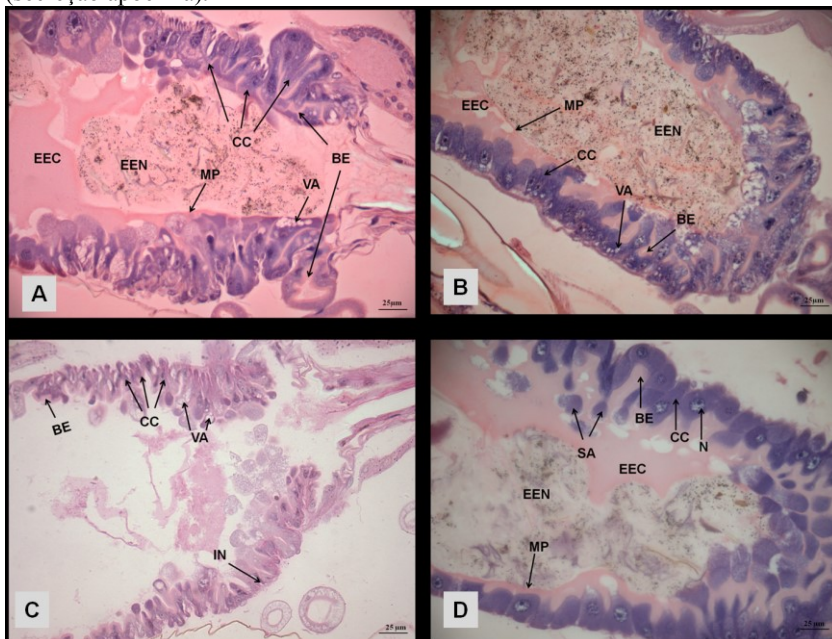
Figura 32 - Fotomicrografia das alterações celulares da parte média do intestino mediano de *Aedes aegypti* coradas com HE (A, B e D), PAS (C), 400x. Controle 24 horas (B), controle 48 horas (D), CE (células epiteliais), N (núcleo), CR (células regenerativas), IN (invaginações no tecido epitelial), MP (membrana peritrófica), EEC (espaço ectoperitrófico), EEN (espaço endoperitrófico), VA (vacúolo) BE (borda em escova), SA (secreção apócrina).



Fonte: A autora, 2015.

Já as células da parte distal apresentaram alto grau de desorganização no tecido nas concentrações de $74\mu\text{g/mL}$ em 24 horas (Fig. 33A) e em 48 horas (Fig 33C) de exposição a solução aquosa, exibindo modificações morfológicas importantes das suas estruturas, tais como alongamentos.

Figura 33 - Fotomicrografia das alterações celulares na parte posterior do intestino mediano da larva de *Aedes aegypti* coradas com HE (A, B e D), PAS (C), 400x. Controle 24 horas (B), controle 48 horas (D), 74 μ g/mL/24h (A), 74 μ g/mL/48h (C) N (núcleo), CC (células colunares), IN (invaginações no tecido epitelial), MP (membrana peritrófica), EEC (espaço ectoperitrófico), EEN (espaço endoperitrófico), VA (vacúolo) BE (borda em escova), SA (secreção apócrina).



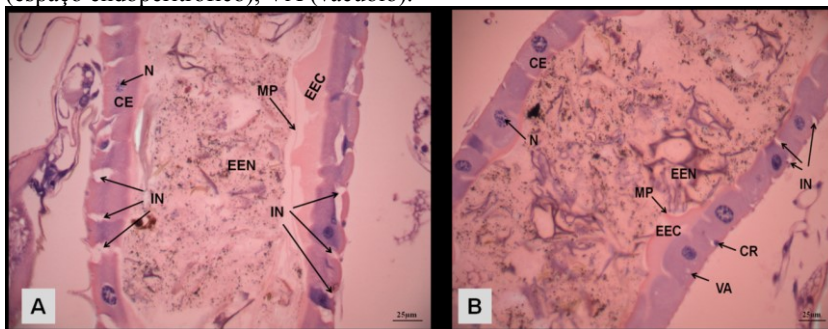
Fonte: A autora, 2015.

Com o aumento do tempo de exposição a solução aquosa, bem como com o aumento da concentração, observamos modificações na posição, aumento do tamanho e quantidade das invaginações da região basal do epitélio intestinal da parte média (Fig. 34 A e B).

As invaginações apresentaram-se bastante profundas e dilatadas, estendendo-se até próximo da metade da altura da parte basal do tecido epitelial (Fig. 34A). Também a regularidade desses espaçamentos ao longo do tecido foram diferentes, inclusive modificando a sua orientação espacial no tecido, como pode ser visto na Figura 34, passando de perpendicular a longitudinal. Esse efeito não foi observado no grupo de larvas controle (Fig. 34B).

Alguns autores como Arruda *et al.* (2003) e Valotto *et al.* (2011) relatam que as invaginações são o aumento do espaço intercelular, sendo um dos principais efeitos de toxicidade.

Figura 34 - Invaginações na região basal do tecido epitelial da parte média do intestino mediano de larvas de *Aedes aegypti*. Coradas com HE, 400x. Concentração 30µg/mL/24 horas de exposição a solução aquosa, controle 24 horas (B). N (núcleo), CE (células epiteliais), IN (invaginações no tecido epitelial), MP (membrana peritrófica), EEC (espaço ectoperitrófico), EEN (espaço endoperitrófico), VA (vacúolo).



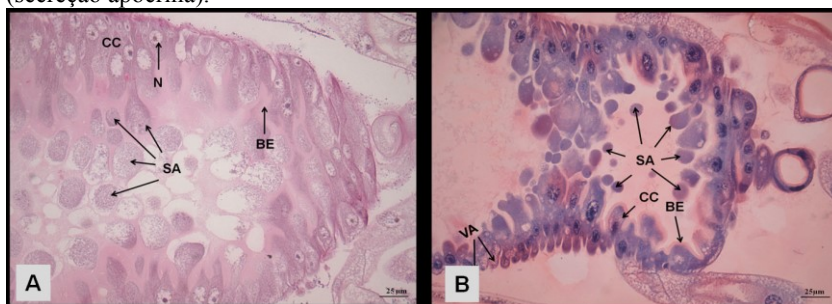
Fonte: A autora, 2015.

Destaca-se, ainda, nas células do intestino mediano, a presença de vacúolos no citoplasma, nas regiões apical e basal destas células, embora mais numerosos na região basal (Fig. 32B e 33B). Tais vacúolos são estruturas fisiologicamente normais e estão envolvidos no transporte e retenção de substâncias necessárias para o processo digestivo ou a serem eliminadas. A alteração do número dessas estruturas, redução ou aumento, pode se constituir num efeito indicativo de toxicidade. No presente estudo, as alterações dessas estruturas não são conclusivas ou, em outras palavras, não exibem relação com a concentração do óleo em estudo. Esses vacúolos foram observados em todos os tempos de exposição a solução aquosa e também no grupo controle. Nesse caso, observamos uma quantidade significativa de vacúolos em 24 horas de jejum, principalmente na parte média e distal (Fig. 32B e 33B).

A vacuolização e mudança no formato das células, provocadas pela exposição das larvas a solução aquosa e verificadas no presente estudo estão de acordo com resultados obtidos para larvas de culicídeos expostas a *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* (KELLEN *et al.*, 1965; LAKTIM-TSROR *et al.*, 1983) e ao extrato de *Magonia pubescens* (ARRUDA, 2003).

Em relação à atividade secretora das células das partes média e distal, foram observadas várias projeções citoplasmáticas apicais e vesículas livres no lúmen, indicando um processo de eliminação de substâncias, mais especificamente denominado de secreção do tipo apócrina (Fig. 35A e B). Essa forma de secreção é fisiologicamente normal, porém não é a preferencial, e a sua intensidade pode indicar uma desregulação do processo, evidente em processos de intoxicação. Esta forma de secreção foi observada em todas as concentrações estudadas, sendo que sua intensidade exibiu correlação com a concentração e tempo de exposição (Fig. 35A e B).

Figura 35 - Secreções apócrinas na parte distal do intestino mediano de larvas de *Aedes aegypti*, PAS (A), HE (B e C), 400x. Concentração 100µg/mL/1h (A) de exposição a solução aquosa de *Eucalyptus staigeriana*, e concentração de 30µg/mL/24h (B). N (núcleo), CC (células colunares), IN (invaginações no tecido epitelial), MP (membrana peritrófica), EEC (espaço ectoperitrófico), EEN (espaço endoperitrófico), VA (vacúolo), BE (borda em escova), SA (secreção apócrina).



Fonte: A autora, 2015.

Especialmente para o grupo de larvas expostas à concentração de 100µg/mL, esse processo foi bastante intenso (Figura 35A). Entretanto, para o grupo controle, esse mecanismo fisiológico foi bastante discreto, sendo especialmente observado no tempo 24 e 48 horas (Fig 33B e D). Destaca-se aqui o fato de que o grupo controle estava em jejum, como determina o protocolo experimental. Esse resultado confirma, como observado para as enzimas, que o óleo induz modificações no sistema digestório, como qualquer alimento provocaria.

As células do intestino mediano liberam produtos de secreção como enzimas, visto que, a função dessa região está primordialmente ligada à produção de enzimas digestivas e a absorção de produtos da digestão. (SNODGRASS, 1935; KING & AKAI, 1984; CRUZ-

LANDIM, 1985; CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE & CRUZ-LANDIM, 1999).

Para King & Akai (1984), o mecanismo de secreção no intestino mediano, pode ser do tipo apócrino, envolvendo o rompimento ou expulsão de parte do citoplasma das células epiteliais junto com o produto secretor, e ainda que rupturas citoplasmáticas possam ocorrer por artefatos de fixação ou em resposta a períodos de jejum. Quando a perda do citoplasma é muito pequena, o mecanismo secretor é chamado de microapócrino. (JORDÃO *et al.*, 1999).

CONCLUSÃO

1 – A solução aquosa do óleo essencial do *E. staigeriana* demonstrou possuir atividade larvicida contra o *A. aegypti*, e a relação dose-resposta foi confirmada. O estudo sobre quais substâncias existentes no óleo e que poderiam ser responsáveis pelos efeitos encontrados não foi realizado.

2- O óleo essencial, em função do tempo de armazenamento, começa a perder sua eficácia, como todo óleo essencial, pois alguns componentes são voláteis e/ou sofrem reações de oxidação.

3 – Os resultados obtidos demonstraram com clareza que para testes de toxicidade cujo parâmetro em avaliação é a mortalidade, larvas de mosquito em processo de transição de instares podem ser utilizadas. Porém, para os ensaios enzimáticos e de estresse oxidativos, as mudanças no metabolismo das larvas associadas às mudanças de instar faz com que os resultados apresentem um alto grau de complexidade e dificuldade na avaliação dos efeitos de toxicidade. Neste caso, usar larvas de um único instar pode ser a estratégia mais adequada.

4 – A falta de alimento nos grupos controles, como preconiza o protocolo da OMS utilizado, deve ser levada em consideração e seus efeitos nos parâmetros em estudo devem ser monitorados. Sem esse controle, o grau de dificuldade na avaliação dos resultados com relação aos grupos expostos a uma substância ou composto pode ser muito elevado e/ou pode levar a conclusões equivocadas.

5- Os parâmetros bioquímicos escolhidos inicialmente para avaliar os possíveis efeitos de toxicidade da solução aquosa do óleo essencial mostraram-se bastante adequados e elucidativos. No entanto, a relação dose resposta para esses parâmetros nem sempre é clara ou elucidativa. Provavelmente, esse efeito se deve ao fato de que o óleo é uma mistura complexa e mais de um componente pode ter efeito, antagônicos ou sinérgicos.

6- Os dados histológicos obtidos nos estudos complementares ou paralelos aos estudos de parâmetros bioquímicos mostraram-se essenciais para confirmar e agregar novas evidências aos mecanismos de toxicidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos, em especial, naqueles em que os resultados não foram conclusivos, obviamente, recomenda-se a continuidade dos estudos. Nesse sentido recomenda-se:

1 – Realizar o estudo químico com isolamento dos principais constituintes do óleo essencial de *E. staigeriana* em combinação com a determinação das atividades individuais destas substâncias sobre as larvas de *A. aegypti*.

2 – Realizar novos testes de avaliação de segurança destas substâncias em organismos bioindicadores tais como peixes e organismos de solo.

3 - Analisar a persistência residual da atividade larvicida, bem como a influência de doses sub-letais da solução aquosa sobre o desenvolvimento de imaturos de *A. aegypti*.

4 - Utilização em testes experimentais de campo para demonstrar na prática a possibilidade do uso eficaz e seguro da solução aquosa.

5 – Realização de pesquisa ampliada e sistemática com outros biomarcadores de estresse oxidativo, tais como Glutathione transferase, glutathione reductase, SOD, TBARs, para elucidar outros aspectos dos mecanismos de toxicidade.

6- Investigar a expressão gênica e seus impactos no metabolismo celular, de possíveis proteínas envolvidas com o metabolismo das larvas. Adicionalmente, usar ferramentas de proteômica para gerar informações sobre quais proteínas podem estar envolvidas nas alterações observadas, em diferentes situações ou tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ABISMAIL, B. et al. **Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability.** Journal Of Histochemistry And Cytochemistry. France. 75-83. 1999.
- ACIOLE, S. D. G.. **Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Humana e Ambiente, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- ALEXANDER, D. R.. **The role of phosphatases in signal transduction.** The New Biologist. Reino Unido. 2(12): 1049. 1990.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C.. **Enciclopédias de Plantas Brasileiras.** Ed. Tres. São Paulo.1998.
- ALMEIDA, J. A. et al. **The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination.** Environment International. São Paulo. 2007.
- ALVES, S.N.; SERRÃO, J.E.; MELO, A.L.. **Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides.** Micron. 41: 592–597. 2010.
- ANDRADE, C.F.S.; MODOLO; M.. **Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control.** Rev. Saúde. Publ. 25: 184-187. 1991.
- ARIAS, A. R. L, et al. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.** Ciência & Saúde Coletiva. 12(1): 61-72. 2007.
- ARMSTRONG, N.R.. **Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases.** Chem. Res. Toxicology. 10 (1): 2–18. 1997.

- ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M. C.; SILVA, I.G.. **Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia Pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti***. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36: 17-25. 2003.
- AUGUSTO, L. G. S.; CÂMARA NETO H. F. O combate químico das pragas domésticas: um problema oculto de saúde pública. In: Augusto LGS, Carneiro RM, Martins PH. **Abordagem ecossistêmica em saúde – ensaios para o controle da dengue**. Recife, Universitária UFPE. 199-212, 2005.
- AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. M. **Metais: Gerenciamento da Toxicidade**. São Paulo. Atheneu. 2003.
- BAGAVAN A.; RAHUMAN, A. Abdul. **Evaluation of larvicidal activity of medicinal plant extracts against three mosquito vectors**. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 29-34. 2011.
- BALDACCHINO, F. et al. **Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review**. Pest Manag Sci. 2015.
- BARATA, E.A.M., et al. **População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil**. Revista de Saúde Pública, São Paulo. 35: 3. 2001.
- BARRERA, R. **Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes**. Ecological Entomology. 21:1:17-127. 1996.
- BARTLETT, A. C.. **Insect sterility, insect genetics, and insect control**. In **Handbook of Pest Management in Agriculture** Vol. II. D. Pimentel Ed., CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.
- BEÇAK, W. ; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos.1976.
- BECKER, N.. **Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies**. In: CHARLES, J-F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LeROUX, C. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer. 383-396.2000.

BENASSI, J. C.. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana.** 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

BENTING, J, NAUEN, R. **Biochemical evidence that an S431F mutation in acetylcholinesterase-1 of *Aphis gossypii* mediates resistance to pirimicarb and omethoate.** Pest Management Science. 60(11):1051-5. 2004.

BERGO, E. S., et al. **Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas.** Revista de Saúde Pública. 24: 95-100. São Paulo. 1990.

BERRIDGE, M. **A structural analysis of intestinal absorption.** Symp R Ent Soc London. 5: 135-151. 1970

BESERRA, E. B., et al. **Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba.** Neotropical Entomology. 35(6). 2006.

BEUTLER, E.; KELLY, B.M.; DURON, O. **Improved method for determination of blood glutathione.** The Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 61: 882-888, 1963.

BEZERRA-SILVA P.C, et al,. **Extract of *Bowdichia virgilioides* and *maackia* as larvicidal agent against *Aedes aegypti* mosquito.** Parasitol.153:160-4. 2015.

BILLINGSLEY, P.F.. **The midgut ultrastructure of hematophagous insects.** Annual Review of Entomology, Palo Alto. 35: 219-248. 1990.

BONALDO, S.M., et al . **Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora defitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*).** Summa Phytopathology. 33: 383-387. 2007.

BORROR, D.J. & DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos.** São Paulo, Ed. Edgard Blücher. 653.1988.

BOUDKO, D.Y., et al. **In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes.** Journal of Experimental Biology. 204: 691-699. 2001.

BOVERIS, A., et al. **The concept of oxidative stress in pathology.** In: Álvarez, S.; Evelson, P. (ed.), Free Radical Pathophysiology. 1-17, Transworld Research Network: Kerala, India, ISBN: 978-81-7895- 311-313. 2008.

BRADFORD, M.M.. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye.** Anal. Biochem. 72: 248-254. 1976.

BRAGA, I. A.; VALLE, D.. ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil.** Epidemiol. Serv.Saúde. Brasília. 16 (2): 113-118. 2007.

BRAGA, I.A, et al.. ***Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 99: 199-203. 2004.

BRASIL (2012). **“Doenças e tratamentos: como o Brasil enfrenta a Dengue”.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em: 01 agosto. 2015.

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; DE-BORTOLI, S.A. **Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae).** Revista de Biologia e Ciências da terra. 6. 2006.

BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. **Insecticide Resistance and Vector Control.** Emerging Infectious Diseases. 4(4): 605-613. 1998.

BROOKER, M.I.H.; KLEINIG, D. A. **Field guide to Eucalyptus** (3rd ed.). Northern Australia Melbourne: Bloomings Books. 3. 2006.

BRUM, L. F. W. . **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos.** 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

- BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado Engenharia de Alimentos. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões, Erechim.
- CAMPBELL, M. K.. **Bioquímica**. 3ed. Porto Alegre: Artmed. 2000.
- CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S.. **Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos**. Rev. Saúde Pública, 35: 232-236. 2001.
- CARDOSO, A. F.. **Vitelogênese do mosquito *Culex quinquefasciatus***. 2009. 27 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.
- CARVALHO, M. S., et al. **Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal**. Rev. Saúde Pública. 38: 623-62. 2004.
- CASSANELLI, S. **Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of thecodling moth *Cydia pomonella* (L.)**. Insect Biochem Mol Biol 36(8):642-53. 2006.
- CATALA, A.. **An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay**. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 38: 1482-1495. 2006.
- CAVALIERE, M. J. et al. **Miotoxicidade por organofosforados**. Revista de Saúde Pública. São Paulo. 30 (3): 267-72. 1996.
- CAVALCANTE, M.F. et al. **Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente à artemia salina leach**. Relatório parcial. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

CAVALCANTE, V. M.; CRUZ-LANDIM, C. **Types of cells present in the midgut of the insects: a review**. *Naturalia*. São Paulo. 24: 19-40. 1999.

CLEMENTS, A.N. **The biology of mosquitoes**. London: Chapman & Hall. Vol 1.1996.

CHAGAS, A.C.S. **Controle de parasitas utilizando extratos vegetais**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 13: 156-160. 2004.

CHAGAS, A.C.S., et al. **Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus spp* em *Boophilus microplus***. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 39: 247-253. 2002.

CHAPAMN, J.W.; GOULSON, D. **Environmental versus genetic influences on fluctuating asymmetry in the house fly, *Musca domestica***. *Biological Journal of the Linnean Society*. 70: 403 -413. 2000.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 770. 1998.

CHARLES, J.F. **Action de la δ endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur cultures de cellules de *Aedes aegypti* L. En microscopie electronique**. *Annals of Microbiology*, London. 134A:365-381. 1983.

CHARLES, J.F. **Histopatologie de l' actino de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur larves d'*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. *Entomophaga*. 26: 203-212. 1981.

CHEN A., ROGAN W.J. **Nonmalarial infant deaths and DDT use for malaria control**. *Emerging Infectious Diseases*. 9(8): 960-964. 2003.

CHENG, S. S. et al. **Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species**. *Bioresour Technol*. 100(1): 452-456. 2009.

CHOWN, S. L.; NICOLSON, S.W.. **Insect Physiological Ecology**. Oxford University. New York. 2004.

COLEMAN, J.E. **Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins.** Annual Review of Biochemistry. 61: 897-946. 1992.

CONNER, D. E.. **Naturally occurring compounds.** In P. Davidson e A. L. Branen (Eds) **Antimicrobials in food.** New York: Marcel Dekker Inc. 441-468. 1993.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. de. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.

Influence of several plant extracts on the oviposition behaviour of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) in the laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz. 84: 47-51. 1998.

COELHO, C.A.A. et al. **Effects of azadirachtin on the development and mortality of *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).** Journal of Medical Entomology. 43: 262-266. 2008.

CUNHA E SILVA, S. L. et al. **Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** Biotemas. 27 (2): 79-85. 2014.

CRISTOFOLETTI, P. T., RIBEIRO, A. F., & TERRA, W. R.. **Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor*.** J. Insect Physiol. 47: 143–155. 2001.

CRUZ, I.. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith).** Embrapa Milho e Sorgo. Documentos. 21: 15p. 2002.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G.. **The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis*.** Crop Protection. 22(1): 39- 44. 2003.

DALHOFF, K.; BUUS, J.K.; ENGHUSEN, P.H. **Cancer and molecular biomarkers of phase 2**. Meth. Enzymol. 400: 618-27. 2005.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O.. **DDT (Dicloro Difeníl Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão**. Quim. Nova. 25: 995- 1002. 2002.

DEHGHANI, H.; et al. **Study of patient's injuries by stingrays, lethal activity determination and cardiac effects induced by Himantura gerrardi venom**. Toxicon.. 54(6): 881-886. 2009.

DEGRAEVE, N.; CHOLLET, M.C.; MOUTSCHEN, J. **Cytogenetic and genetics effects of subchronic treatment with organophosphorus insecticides**. Archives of Toxicology, New York. 56: 66-67. 1984.

DEGRAEVE, N.; MOUTSCHEN, J. **Genetic and cytogenetic effects induced in the mouse by as ornagophosphorus insecticide: Malation**. Environmental Research. New Brunswick. 34: 170-174. 1984.

DHALIWAL, H. J. S.; THIND, T. S.; CHANDER, M., **Relative activity of essential oils from plants against Penicillium digitatum causing post-harvest fruit rot of Kinnow mandarin**. Plant Disease Research. Ludhiana 19(2): 140-143. 2004.

DONALISIO, M. R.; GLASSER, C. M.. **Entomological surveillance and control of dengue fever vectors**. Rev. Bras. Epidemiol..São Paulo. 5(3): 259-272. 2002.

DULOUT, F. N. **Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides**. Mutation Research, Amsterdam. 143: 237-244. 1985.

ELGORBAN, A.M.et al. **In vitro Antifungal Activity of some Plant**. Internacional Journal of Pharmacology. Saudi Arabia. 11(1): 56-61. 2015

El-Sheikh; TAREK, M.Y, et al. **Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (Zygophyllaceae) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae)**. Journal of Saudi Chemical Society. Saudi Arabia. 2012.

EIRAS, Á. E.. **Culicidae: Parasitologia humana**. 11 edição. Rio de Janeiro: Atheneu. cap. 43 355-367. 2005.

ESTANISLAU, A.A., et al. **Composição química e atividade bacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de eucalyptus cultivadas em Goiás**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 11: 95-100. 2001.

EYER, P. **Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review**. Human & Experimental Toxicological. London. 14: 857-864. 1995.

FARBER, J.L., KYLE, M.E., COLEMAN, J.B.. **Mechanisms of cell MDA and antioxidant enzymes may be state markers injury by activated oxygen species**. Lab. Invest. 62: 670-679. 1990.

FERNANDES, Carlo Rivero Moura. **Efeito da densidade, da temperatura e da qualidade da água no ciclo de vida do *Aedes aegypti***. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2006.

FERNLEY, H. N.. **Mammalian alkaline phosphatase**. In, Theenzymes, Vol. 4, edited by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 3rd edition. 41 f-447. 1971.

FFRENCH-CONSTANT, R.H. ; ROUSH, R.T. . **Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays**, p.4-38. In R.T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.), Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall, New York, 303p. 1998.

FILIPPOVA, M; ROSS, L.S.; GILL, S.S. **Cloning of the V-ATPase B subunit cDNA from *Culex quinquefasciatus* and expression of the B and C subunits in mosquitoes**. Insect Molecular Biology. 7: 223-232. 1998.

FORATTINI, O. P.. **Culicidologia Médica: Princípios Gerais, Morfologia, Glossário Taxonômico**. Vol 1. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo, 1996.

_____. **Culicidologia Médica. Identificação, biologia e epidemiologia.** Vol II. Editora da Universidade de São Paulo, 860p. 2002.

FUGUO, X. et al. **Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde .** Food Control. 46: 343-350. 2014.

FUKUTO T.R. **Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.** Environ Health Perspect. 87: 245–254. 1990.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas.** Ministério da Saúde Brasileira. 3ª Edição revisada. 75p. 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue.** Brasília: Funasa; 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Direção do Centro Nacional de Epidemiologia: Jarbas Barbosa da Silva. Plano de intensificação das ações de prevenção e controle da Febre Amarela.** Funasa; Jul. 2002.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. **Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** Neotropical Entomology. 34(5): 843-847. 2005.

FRANCO, O.. **Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*.** Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 21(4):729-731. 1969.

GAO, S.; SINGH, J.. **In vitro percutaneous absorption enhancement of lipophilic drug tamoxifen by terpenes.** Journal of Controlled Release. 51: 193-199. 1998.

GARCIA, C. et al. **Biooxidation of 1,8-cineol by *Aspergillus terreus*.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 59: 173-176. 2009.

GARRETT, V. Genotoxic and carcinogenic potencial of anticholinesterases. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T. (Ed.).

Chemical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates. Oxford: Butterworth. Heinemann. 233-240. 1992.

GHELFI, A. . **Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen*.** 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GIGLIOLLI, A. A. S.; LUCENA, A. L. M.; LAPENTA, A. S.. **Identificação e caracterização das esterases em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).** Revista Saúde e Biologia. 6(1): 25-35. 2011.

GILLES, M., ZHAO, J., A., M.; AGBOOLA, S.. **Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species.** Food Chemistry. 119: 731-737. 2010.

GILL, S. S., COWLES, E.A., PIETRANTONIO, P.V. **The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins.** Annual Review of Entomology, Palo Alto. 37: 616-636, 1992.

GRAF, R., et al.. **Mosquito trypsin: Immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.).** Cell Tissue Res., 245, 19–27.1986.

GULLAN P.J. & CRANSTON P.S. **The Insects.** An Outline of Entomology. Blackwell Publishing. Oxford. 505. 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford: Clarendon Press, 2007.

HEGEDUS, D.; et al.. **New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.** Annual Rev Entomol. 54: 285-302. 2009.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. **Insecticide resistance in insect vectors of human disease.** Annual Review Entomology. Palo Alto. 45: 371–391. 2000.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. **Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*.** American

Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 271(4): R918-R925. 1996.

*HERNÁNDEZ-MORALES, A. et al. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. Journal of Asia-Pacific Entomology. 18(2) 2015.*

HOCHACHKA, P. W.; G. N. SOMERO. **Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution.** Oxford University Press, New York. 2002.

HOLT, E.; MILLER, S. **Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts.** Nature Education Knowledge. 3(10):8. 2011.

HOUK, E. J.; HARDY, J. L. **Alkaline phosphatases of the mosquito, *Culex tarsalis* coquillett.** Comp. Biochem. Physiol. 78B(2): 303-310, 1984.

HUANG, Z.. **Protein metabolism in *Spodoptera litura* (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin.** Pestic Biochem Physiol. 80: 85–93. 2004.

HUCHARD, E.,. **Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies.** Proc Biol Sci. 273(1601): 2595-604. 2006.

HUI, M.; HU, M.; TENENBAUM, H.C.. **Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase.** Cell Tissue Res.. 274: 429-437. 1993.

JACOBS-LORENA, M.; OO, M. M. The peritrophic matrix of insects. In: Beaty, B.; Marquardt, W. **Biology of disease vectors: a molecular, physiological and populational approach.** Denver: University Press of Colorado. 318-443. 1996.

JEFFERIES, H. et al. **Glutathione.** ANZ Journal of Surgery. 73(7): 517-522. 2003.

JESUS, T.B.de; CARVALHO, C.E.V.de. **Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg).** Oecol. Bras.12(4): 680-693. 2008.

JIANG, H. et al.. **Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*.** Insect Biochem Mol Biol. 39(9): 646-53. 2009.

JIRAKANJANAKIT, N., LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J.P.. **The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations.** Inf. Genet. Evol. 8:414-421. 2007.

JONES, D. P. **Redefining oxidative stress.** Antioxid. Redox Signal. 8(9-10): 1865-1879. 2006.

JORDÃO, B. P.; LEHANE, M. J.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. **An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*.** Insect Biocem Mol Biol. 26: 445-453. 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; SILVA, M. D., TORLONI, H. **A simple procedure to obtain one-micrometer sections of routinely embedded paraffin material.** Stain Technol. 64: 39-42. 1989.

KAKANI, E.G. **Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides.** Insect Biochem Mol Biol. 41(3): 150-8. 2011.

KAUSHIK, R.; SAINI, P.. **Larvicidal activity of leaf extract of *Millingtonia hortensis* (Family: Bignoniaceae) against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*.** Journal of Vector Borne Diseases.45: 66-69. 2008.

KELLEN, W.R.; CLARK, T.B.; LINDEGREN, J.E.; HO, B.C.; ROGOFF, M.; SINGER, S. ***Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquito.** Journal of Invertebrate Pathology. 7: 442-448. 1965.

KENTISH, S. et al. **The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation.** Innovative Food Science & Emerging Technologies. 9(2): 170-175. 2008.

KING, M.M.; AKAI, H. **The ultrastructure of the digestive and excretory organs.** In: *Insect ultrastructure*. Plenum Press. New York. 1984.

KLOWDEN, M.J. **Making generalizations about vectors: Is there a physiology of “the mosquito”?** Entomological Research. 37: 1–13. 2007.

KLUMPP, A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. In: (MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELLA, W. Ed.) **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações.** São Paulo: EDUC/COMPED/INEP. 2001.

KNIPLING, E. F. . **Sterile insect technique as a screwworm control measure: The concept and its development.** In Symposium on Eradication of the Screwworm from the United States and Mexico. Misc. Publ. Entomol. Soc. America. O. H. Graham ed., College Park, MD. 62: 4-7. 1985.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. **Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity.** Biochim. Biophys. Acta, Estados Unidos. 924: 509-518. 1987.

KONISHI, T. et al. **A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*.** Biochemistry Journal. 388: 299-307. 2005.

KOODALINGAM, A.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. **Antimosquito activity of aqueous kernel extract of soapnut *Sapindus emarginatus*: impact on various developmental stages of three vector mosquito species and nontarget aquatic insects.** Parasitol Res.. 105:1425–1434. 2009.

_____ **Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Acta Tropica. 118: 27–36. 2011.

KOODALINGAM, A, et al. **Effect of a Bt-based product (Vectobar) on esterases and phosphatases from larvae of the mosquito *Aedes aegypti***. Pesticide Biochemistry and Physiology. 104 (3): 267-272. 2012.

KOVEDAN, K. et al. **Mosquito larvicidal properties of *Orthosiphon thymiflorus* (Roth) Sleesen (Family:Labiatae) against mosquito vectors, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae)**. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 299-305, 2012.

KRISHNAPPA, K.; ELUMALAI, K.. **Mosquitocidal properties of *Basella rubra* and *Cleome viscosa* against *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera:Culicidae)**. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 17: 1273-1277,. (suppl.): 100-101.2013.

LACEY, L.A.; FEDERICI, B.A. **Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae)**. Journal of Invertebrate Pathology. 33 171-182. 1979.

LAHKIM-TSROR, L. et al. **Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serovar H14 in *Aedes aegypti*: histopathological studies**. Journal of Invertebrate Pathology. 41: 104-116. 1983.

LAW, J.H.; RIBEIRO, J.M.; WELLS, M.A. **Biochemical insights derived from insect diversity**. Annual Review of Biochemistry. Palo Alto. 61: 87-111. 1992.

LEHANE, M.J.; MÜLLER, H.M.; CRISANTI, A.. Mechanisms controlling the synthesis and secretion of digestive enzymes in insects. In: LEHANE, M.J; BILLINGSLEY, P. F. (ed.) **Biology of the insect midgut**. London: Chapman. 195-205. 1996.

LEVI, F. et al.. **Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world**. Heart. 88: 119-124. 2002.

- LIMA, P. L. et al. **Time-Course Variations of DNA Damage and Biomarkers of Oxidative Stress in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Effluents From a Swine Industry.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 50(1): 23-30. 2006.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. **Qual a importância da hematofagia extradomiciliar do *Anopheles darlingi* na Amazônia.** Rev Patol Trop. 23 (suppl.): 100-101. 1995.
- LÖWY, I. **Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission (1901-1905): the transfer of science to periphery.** History of Medicine. 34:144-163. 1990.
- LÖWY, I. **Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil.** História, Ciências, Saúde Manguinhos. 5(3): 647-677. 1999.
- LOZOVEI, A. L.. Culicídeos (mosquitos), 59-104. In: MARCONDES, C. B. (ed.). **Entomologia Médica e Veterinária.** Editora Atheneu, 432 p. 2001.
- LUCIA, A., et al. **Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae.** Journal of the American Mosquito Control Association. 23: 299-303.2007.
- LUCIA, A et al. **Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera:Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils.** Bioresource Technology.100: 6083-6087, 2009.
- LUNA J.E.D., et al. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil.** Rev. Saúde Pública. 38: 842-843. 2004.
- MACEDO, M.L.R.. **Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).** Comparative Biochemistry and Physiology. 146: 486–498. 2007.

MACIEL, M.V. et al. **Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*.** Veterinary Parasitology. 167: 1-7. 2010.

MARKET, A. B.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, A.M..
Bioindication and Biomonitors. Editora Elsevier Science. 2003.

MARCONDES, C. B.. **Entomologia Médica e Veterinária.** Ed. Atheneu. São Paulo, 2001.

MARTINS, F. E SILVA, I. G. **Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).** Rev Soc Bras Med Trop 37: 135-138. 2004.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: King, R. C.; Akai, H. **Insect ultrastructure.** New York: Plenum Press. 2: 199-261. 1984

MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J.D. **Efeito de Pós de Origem Vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em Feijão Armazenado.** Neotropical Entomology. 32: 145-149. 2003.

MELO, M. E. B. et al. **Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos.** Revista do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. 67(3): 196-201. 2008.

MODESTO, K. A.. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos.** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Zoologia e Botânica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

MORSY, T.A.; HALIM, A.S.A. **The insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* oil on the development of *Musca domestica* third stage larvae.** Journal of the Egyptian Society of Parasitology. 35: 631-636. 2005.

MOTTA, Valter T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial; Educ, 2003.

NABESHIMA T. et al.. **An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae***. Biochem Biophys Res Commun. 307(1):V15-22. 2003.

NATAL, D.. **Bioecologia do *Aedes aegypti***. Biológico, São Paulo. 64(2): 205-207. 2002.

NAVARRO, V., et al. **Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases**. Journal of Ethnopharmacology. 53: 143-147. 1996.

NELSON, D. L; COX, M. M. Lehninger: **Principles of Biochemistry**. 3a. edição. New York: Worth Publishers. 2000.

NIE, X.; WANG, X.; CHEN, J.; ZITKO, V.; AN, T.. **Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin**. Environmental Research and Chemistry. 27(1): 168-173. 2008.

NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, PL.. Febre Amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 27(Supl. III): 59-66. 1994.

OKEY, A.B.. **Enzyme induction in the cytochrome P-450 system**. Pharmacol Ther 45: 241- 298. 1990.

PAIVA, A. B. de. **Avaliação de risco ambiental utilizando parâmetros físico-químicos e biológicos no rio canoas/SC**. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

PANDEY, R., et al. **Essential oils as potent sources of nematicidal compounds**. Journal Phytopathology. 37: 490-491. 2003.

PAPACHRISTOS, D.P.; STAMOPOULOS, D.C. **Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say)**

(Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research. 40: 517–525. 2004.

PARK, Hye-Mi., et al. **Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue.** Journal of Medical Entomology. 48(2): 405-410. 2011.

PEREIRA, M.. **Formação de população base de *Eucalyptus citriodora*** . Hook. Brasil Florestal. 62: 12-16. 1987.

PETERS, W. **Peritrophic membranes.** Berlin: Springer. 238p. 1992.

PINA, I. G.; FONSECA, A. H. D. A.. **Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) alimentados artificialmente com sangue de diferentes espécies de doadores.** Revista Patologia Tropical 28 (1): 64-71. 1999.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B.. **Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*.** Rev. Saúde Pública 37: 813-816. 2003.

R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. 2013. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<http://www.R-project.org>>.

RAMEZANI, H., et al. **Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*.** Fitoterapia. 73: 261-262. 2002.

REVUELTA L, et al.. **RNAi of *ace1* and *ace2* in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides.** Insect Biochem Mol Biol. 39(12): 913-9.2009.

RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Morphological basis of insect digestion. In: Mellinger, J. (ed.). **Animal nutrition and transport processes. Nutrition in wild and domestic animals.** Basel: Karger. 5: 96-105. 1990

- RICE, P.J.; COATS, J.R. **Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae).** Journal of Economic Entomology. 87: 1172-1179. 1994.
- RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **Imms' general textbook of entomology.** 10th ed., London. Chapman and Hall. 2: 563-571. 1977.
- RODRÍGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; FERNÁNDEZ, D.. **Determinación in vivo del papel de las enzimas esterasas y glutatión transferasa en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Revista Cubana de Medicina Tropical. 59(3): 209- 212. 2007.
- ROCHE, J.,. Phosphatases. In, **The enzymes. chemistry and mechanism of action**, Vol. I, edited by J. B. Sumner & K. Myrbach. 437-510. 1950.
- ROEL, A.R.. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável.** Revista Internacional de Desenvolvimento Local. 1: 43-50. 2001.
- ROZENDAAL, J. A. . **Vector control: methods for use by individuals and communities.** Geneva: World Health Organization.Disponível: http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vectorcontrol/en/index.html (acessado em Maio de 2015).
- SALARI, M.H., et al. **Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders.** Clinical Microbiology and Infection. 12: 178-196. 2006.
- SALGADO, A.P.S.P.. **Estudo dos constituintes químicos e da atividade fungitóxica do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus*.** 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroquímica e Agrobioquímica. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2001.
- SALGADO, A. P. S. P.; et al. **Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*,**

***Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*.** Ciências Agrotécnicas, Lavras. 27: 249-254. 2003.

SALLUM, M. A. M.; FLORES, D.C.. **Ultrastructure of the eggs of two species of *Anopheles* (*Anopheles*) *Meigen* (Diptera, Culicidae).** Revista Brasileira de Entomologia. 48(2): 185-192. 2004.

Sandrini-Neto, L.; Camargo, M. G. GAD: an R package for ANOVA designs from general principles. R Package version 1.1.1 (<http://CRAN.Rproject.org/package=GAD>). 2012.

SANTOS, A.C. dos; MOSTARDEIRO, C.P.. **Padronização de metodologia analítica para avaliação da colinesterase plasmática.** Rev. Contexto & Saúde. Editora Unijuí. 7(15): 23-30. 2008.

SANDI, J.T.T.; BLANCO, R.F. **Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (MYRTACEAE), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: Curculionidae).** Revista de Biologia e Saúde. 1: 93-100. 2007.

SCHONAU, R.F. et al. **Urinary excretion of hydroxy-pyridinium cross-links of collagen reflects skeletal growth velocity in normal children.** Exp Clin Endocrinol. 1994.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). **Normas, orientações e recomendações técnicas para a vigilância e controle de *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo.** São Paulo: 2002.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dados e indicadores selecionados.** Coordenação: Departamento de Análise de Situação de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2003.

SEIZI, Olga; CAMARGO, Márcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. **Fundamentos de Toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

SIES, H.,. **Biochemistry of oxidative stress.** Angew Chem Int Ed Engl 25, 1058-1071.1986.

- SIES, H., STAHL, W. **Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants.** American Journal of Clinical Nutrition. Bethesda. 62(6): 1315-1321. 1995.
- SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.. **Influência no período de quiescência dos ovos sobre o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera Culicidae) em condições de laboratório.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32: 349-355. 1999.
- SILVA, Jr.J.B., et al. **Dengue in Brazil: current situation and control activities.** Epidemiological Bulletin. 23(1): 3-6. 2002.
- SIM, C.; DENLINGER, D.L.. **Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens*.** Journal of Insect Physiology. 57: 628–634. 2011.
- SIMAS, N. K.; LIMA, E. da C.; CONCEIÇÃO, S. da R.. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides.** Química Nova. 27(1): 46-49. 2004.
- SNODGRASS, R.E. The alimentary canal. In: **Principles of Insect Morphology.** New York: McGraw-Hill Book Company, 1935.
- SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Eds.), **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora da UFSC., cap. 18: 467–495. 2010.
- SIVAKUMAR, R.. et al. **Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae).** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 706-710. 2011.
- SOARES, V. A. R. C.; RODRIGUES, W. C.; CABRAL, M. M. de O.. **Estudo das áreas e depósitos preferenciais de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) no município de Paracambi – Rio de Janeiro, Brasil.** EntomoBrasilis. 1(3): 63-68. 2008.

SOHAL, R.S.. **Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and chloroform. Soluble antioxidants in the adult male housefly, *Musca domestica*.** Mechanisms of Ageing and Development. 24: 185-195. 1983.

SOMDA, I.; LETH, V.; SEREME, P.. **Antifungal effect of *Cymbopogon citrateis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Azadirachta indica* oil extracts on Sorghum Feedborne fungi.** Asian Journal of Plant Science. 6: 1182-1189. 2007.

SOPER, F.L.. **The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas.** American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. 14(6): 887- 891. 1965.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S.. *Acetylcholinesterase — new roles for an old actor.* Nature Reviews Neuroscience. 2: 294-302. 2001.

STREB, C. et al. **Biomonitoring based on real time movement analysis of unicellular organisms.** Journal Gravita. Physiol. 9: 345-6. 2002.

SOUZA, L.M.B.de. **Avaliação da ação inseticida de extratos vegetais, óleos essenciais e substâncias sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE), em condições de laboratório.** 2012. 263 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Biológicas, Entomologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

SURYAWANSHI, R.K., et al.. **Mosquito larvicidal and pupaecidal potential of prodigiosin from *Serratia marcescens* and understanding its mechanism of action.** Pesticide Biochemistry and Physiology. 2015.

SVENSSON, B.M. et al. ***Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills.** Environmental Monitoring and Assessment. 102: 309–321. 2005.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. **Antimicrobial activities of *eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate***. Letters in Applied Microbiology. 39: 60–64. 2004.

TELLAM, R. L. The peritrophic matrix. In: **Biology of the insect midgut**. Lehane, M. L.; Billingsley P. F. (eds.), Chapman & Hall, London, p. 86-114.1996.

TAREK, M.Y.; El-Sheikh; ZARRAG, I.A. Al-Fifi, MOHAMED, A. Alabboud.(2012), **Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (*Zygophyllaceae*) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae)**. Journal of Saudi Chemical Society. 20(1): 13- 19. 2012.

TERRA, W. R., FERREIRA, C. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. 1ª ed. 2012.

_____. Digestive system. In V. H. Resh, & R. T. Cardé (Eds.), **Encyclopedia of Insects** (2nd edn, pp. 273–281). San Diego, CA: Academic Press. 2009.

_____. **Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos**. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. **Bioecologia e nutrição de insetos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. cap 4: 175-209. 2009.

_____. **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function**. Comp. Biochem. Physiol. 109B, 1-62. 1994.

TERRA, W. R. **Evolution of digestive systems of insects**. Annual Rev of Entomol. 35: 181-200. 1990.

_____. **Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective**. Braz J Med Bio. Res.. 21: 675-734.1988.

_____. **The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel**. Arch Biochem Physiol. 47: 47-61. 2001.

THREDAGOLD, L. T. **The ultrastructure of the animal cell.** Oxford: Pergamon, 1976.

TORRES, M. et al. **Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review.** *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 71(1): 1-15. 2008.

TYAGI, A.k. et al. ***Eucalyptus* Essential Oil as a Natural Food Preservative: In Vivo and In Vitro Antiyeast Potential.** *Biomed Research International* . 2014

TURK, J.R.; CASTEEL, S.W. Clinical biochemistry in toxicology. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 5. ed. California: Academic Press. 829-843. 1997.

UHLIG, S.; WENDEL, A. **The physiological consequences of glutathione variations.** *Life Science.* 51(14): 1083-1094. 1992.

VALOTTO, C.F.B. **Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e a uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae).** *Rev da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 44(2): 194-200. 2011.

VAN BLADEREN, J.P. **Glutathione conjugation as a bioactivation reaction.** *Chemico-Biological Interactions.* 129: 61–76. 2000.

Walsh S.B., et al. **Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance.** *Biochem J.* 359(1): 175-81. 2001.

WARD, W. W., PRENTICE, H. J., ROTH, A. F., CODY, C. W., & REEVES, S. C. **Spectral perturbations of the Aequorea green-fluorescent protein.** *Photochem. Photobiol.* 35: 803-808. 1982.

Weill M. et al. . **A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*.** *Proc Biol Sci* . 269(1504): 2007-16. 2002.

WHEELOCK, C.E; SHAN, G.; OTTEA, J.. **Overview of carboxylesterase and their role in the metabolism of insecticides.** J. Pestic. Sci. 30: 75–83. 2005.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology.** 7th ed. London. Chapman and Hall. p. 476-552. 1972.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles.** International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155p. 1993.

_____ **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides:** WHO-VBC 81.807; 1-6. 1981.

WU, S., et al.. **Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae).** Insect Biochem Mol Biol. 40(5): 415-24. 2010.

XIE, Q., ALPERS, D. H. **The two isozymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes.** Physiological Genomics. Vol. 3 no. 1, 1-8. 2000.

YAGHOUBI-ERSHADI, M. R., et al. **Repellency effect of Myrtle Essential Oil and DEET against *Phebotomus papatasi*, under Laboratory Conditions.** Iranian. Journal of Public Health. 35: 7-13. 2006.

YANG, Y.C., et al. **Ovicidal and Adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae).** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 2507-2511. 2004.

YANG, H.M., THOME, R.C.A, ESTEVA, L, **Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide.** Mathematical Biosciences. 223: 12-23. 2009.

ZHUANG, Z.; LINSER, P.J.; HARVEY, W.R. **Antibody to H+ V-ATPase subunit with portosomes in alkaline larval midgut of a**

freshwater mosquito (*Aedes aegypti*). Journal of Experimental Biology. 202: 2449-2460. 1999.

ZHANG, J. F. et al. **Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol.** Environmental Toxicology and Pharmacology. 19: 185-190. 2004.

ZHANG, K.; ZHOU, Q. **Toxic effects of Al-based coagulants on *Brassica chinensis* and *Raphanus sativus* growing in acid and neutral conditions.** Environmental Toxicology. 20(2): 179-187. 2005.

ZHUZHNIKOV, D.P. **Permeability of the peritrophic membrane in the larvae of *Aedes aegypti*.** Journal of Insect Physiology. 16: 1193-1202. 1970.