

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

Emanuelle Goellner

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS NO CONTROLE  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Porto Alegre  
2019

Emanuelle Goellner

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS NO CONTROLE  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de doutora em Microbiologia e do Ambiente.

Orientadora: Prof. Dra. Onilda Santos da Silva  
Co-orientador: Prof. Dr. Alcindo Neckel (IMED)

Porto Alegre

2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Goellner, Emanuelle

ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS NO  
CONTROLE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) /  
Emanuelle Goellner. -- 2019.

129 f.

Orientador: Onilda Santos da Silva.

Coorientador: Alcindo Neckel.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. GEORREFERENCIAMENTO DE FOCOS DE *Aedes aegypti* NO  
MUNICÍPIO DE PASSO FUNDO/RS. 2. EFEITO DE SAIS  
IMIDAZÓLICOS SOBRE *Aedes aegypti*. 3. ESTUDO  
HISTOLÓGICO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* TRATADAS COM  
SAIS IMIDAZÓLICOS. 4. EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM  
ALFACE *Lactuca sativa* (ASTERACEAE). I. Santos da  
Silva, Onilda, orient. II. Neckel, Alcindo, coorient.

III. Título

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ao meu esposo e ao meu filho por todo apoio, paciência, compreensão nos momentos de ausência e incentivo recebido durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e pelas lições apreendidas.

À minha mãe, Dinamar Viecelli, à minha tia, Cleude Viecelli, e à minha avó, Adélia Viecelli, que me ajudaram incansavelmente em todos os momentos que precisei nos cuidados com meu filho.

À professora orientadora Dra. Onilda Santos da Silva, pela amizade, pelo incentivo, pelas críticas construtivas e pelos momentos de reflexão sobre a pesquisa científica.

Ao professor coorientador Dr. Alcindo Neckel, do Programa de pós-graduação em Arquitetura Urbanismo (PPGARq) – IMED, pelo apoio e pela dedicação nas práticas de campo.

Ao professor Dr. Henri Stephan Schrekker, pela oportunidade de desenvolver este estudo com os Sais Imidazólicos fornecidos por seu laboratório.

À professora Dra. Josiane Somariva Prophiro, pelo apoio no fornecimento do composto químico Temefós, utilizado para o desenvolvimento de alguns ensaios.

Ao professor Dr. Carlos Eugenio da Silva, pelo apoio na organização dos dados estatísticos.

Aos meus colegas de laboratório Harry Luiz Pilz-Junior, Ademir Tramontini Schmitt, Alessandra Bittencourt de Lemos e a todos que passaram por ele, pela amizade, pela ajuda e pela disponibilidade durante os experimentos e momentos de discussão.

Ao núcleo de Vigilância Epidemiológica do município de Passo Fundo/RS, pelos dados fornecidos para o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio no cuidado com as armadilhas de campo.

À minha amiga Alessandra Bittencourt de Lemos, que nos últimos anos tem sido minha conselheira, dando-me um abrigo durante minhas vindas a Porto Alegre, sempre se dispondo em ajudar sem nada pedir em troca.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo auxílio e pela infraestrutura fornecidos para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de todo este trabalho.

“A vida vira suas páginas  
com linhas rudes e tortas,  
mas não descreve as verdades de uma alma  
quase morta!  
...qual personagem demente  
já sem razão no contexto  
por certo morri no texto,  
ponto final...simplesmente!”

Alcindo Neckel e Luis Lopes de Souza  
(Do poema “Pra Versejar uma Ausência”)

# ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE SAIS IMIDAZÓLICOS NO CONTROLE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)<sup>1</sup>

Autor: Emanuelle Goellner

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Onilda Santos da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Alcindo Neckel (IMED)

## RESUMO

Pesquisas têm demonstrado que alguns inseticidas químicos sintéticos induzem resistência em várias espécies de mosquitos vetores, em especial *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Essa espécie é competente para transmitir vários arbovírus patogênicos ao homem, como dengue, febre amarela, zika e chikungunya. Assim, a busca de novos compostos que possam auxiliar no controle dessa espécie de mosquito é de vital importância. Neste trabalho, o potencial de seis sais imidazólicos candidatos a larvicidas é avaliado sobre *Ae. aegypti* nativos e a cepa de referência (Rockefeller). Inicialmente, faz-se um estudo georreferenciado em Passo Fundo-RS, onde se obtiveram ovos que foram utilizados para comparação com a cepa de referência. São apresentados resultados de testes laboratoriais de suscetibilidade em larvas expostas por até 48 horas, sob 10 diferentes concentrações (0.039 - 20µ/L). Além disso, verificou-se a persistência residual dos sais, bem como a influência de diferentes temperaturas (15, 25, 30 e 40°C) e de luz ultravioleta, na eficácia dos sais sobre as larvas. Como parte complementar, avalia-se a toxicidade dos sais sobre larvas, por meio de cortes histológicos e compara-se a influência dos sais e do inseticida organofosforado Temefós na germinação de sementes de alface *Lactuca sativa* (Asteraceae), bem como no desenvolvimento da plântula. O georeferenciamento identificou focos do vetor em seis bairros do município de Passo Fundo/RS, que conforme dados da vigilância epidemiológica representam os bairros com maior número de focos entre os anos de 2016 e 2017. Os sais apresentaram diferentes graus de atividade. Destes C<sub>16</sub>MImMes e C<sub>18</sub>MImCl foram os mais ativos, em concentrações muito baixas (10-20µg/L), causando mortalidade em 100% das

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.). Abril/2019.

larvas em até 48 horas. Em meio aquoso apresentaram ação residual por até quatorze dias. Em condições ambientais laboratoriais permaneceram ativos por até 12 meses. Nas temperaturas entre 35-40 °C, os sais foram mais ativos para as larvas do que em temperaturas mais baixas (15 e 25 °C). Não houve diferença significativa entre a mortalidade das larvas coletadas no campo, em relação aquelas de laboratório, em todos os testes realizados. Quando expostas a uma dose subletal LC<sub>20</sub> em diferentes estádios, as larvas em 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> ínstaes não se desenvolveram, após três dias, 100% foram inviabilizadas. As larvas de 3<sup>o</sup> instar se desenvolveram até atingirem o estágio de pupa, mas não sobreviveram até a fase adulta. Nenhuma larva chegou ao quarto estágio. Esses resultados indicam que, além de larvicida, os sais parecem servir como inibidor de crescimento. Nas condições em que foram realizados os bioensaios, a luz ultravioleta não interferiu na qualidade do sal, por pelo menos 24 horas de exposição. Talvez quando tetados em ambiente natural, a resposta seja a mesma, indicando que os sais podem ser totalmente utilizados a campo. Embora macroscopicamente as larvas parecem ter sofrido lesões patogênicas quando tratadas com os sais, nos estudos com cortes histológicos não foi possível identificar lesões em tecidos ou órgãos. Apenas observou-se pequena desestruturação celular na parede do intestino de poucas larvas. É necessário que mais estudos sejam conduzidos, com um número maior de larvas, a fim de identificar as lesões, macroscópicas. Com relação aos testes de desenvolvimento de *L. sativa*, os sais induziram à quebra mais rápida da dormência das sementes, estimulando sua germinação e conseqüente crescimento das plântulas. Nos testes com o organofosforado Temefós a germinação das sementes foi retardada inibindo o crescimento das plântulas. Nesse sentido, e nas condições em que os testes foram realizados, os sais imidazólicos não afetaram os organismos não-alvo em condições ambientais. Os sais testados são tóxicos às larvas em doses baixas e por longo período de tempo. Além disso, não são tóxicos para os organismos não-alvos que foram testados. Deste modo, com base nos resultados obtidos, se poderá contribuir futuramente na estratégia de controle de mosquitos e conseqüente impacto nas epidemias de arbovirose.

**Palavras-chave:** Histologia, *Lactuca sativa*, mosquitos, novos inseticidas, temperatura.



# STUDY OF THE USE OF IMIDAZOLE SALTS IN THE CONTROL OF *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)<sup>2</sup>

Author: Emanuelle Goellner

Supervisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Onilda Santos da Silva

Co-supervisor: Prof. Dr. Alcindo Neckel (IMED)

## ABSTRACT

Researches have shown that some synthetic chemical insecticides induce resistance in several species of mosquito vectors, particularly *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). This species is responsible for transmitting various pathogenic arbovirus to humans as: dengue fever, yellow fever, chikungunya and zika. Thus, the search for new compounds that may help in the control of this species of mosquito, is of vital importance. In this thesis, the potential of six imidazole salts candidates as larvicides was evaluated in wild *Ae. aegypti* and laboratory strain (Rockefeller). Initially, a georeferenced study was conducted in Passo Fundo-RS, where collected eggs were used for comparison to the laboratory reference strain. Laboratory tests were conducted in order to verify susceptibility in larvae exposed for up to 48 hours, in 10 different concentrations of imidazole salts (0.039 - 20 $\mu$ /L). In addition, the residual persistence of salts, the influence of different temperatures (15, 25, 30 and 40 ° C), as well as ultraviolet light were evaluated on the effectiveness on the mosquito larvae. As a complementary part the toxicity of salts in larvae was assessed through histological sections. Also, the influence of the same salts and the organophosphate temephos was evaluated on seed germination of lettuce *Lactuca sativa* (Asteraceae), as well as the development of seedling. The georeferencing identified vector foci in six districts of the municipality that, according to epidemiological surveillance data, represent the neighborhoods with the highest number of outbreaks between 2016 and 2017. In relation to salts tested against *Ae. aegypti*, they showed varying degrees of toxicity. The C<sub>16</sub>MImMes and C<sub>18</sub>MImCl were the most toxic in very low concentrations (20  $\mu$ g/L), causing 100% mortality of the larvae within 48 hours. In aqueous solution the salts showed residual action for up to fourteen days. In

---

<sup>2</sup> Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101 pp.) April, 2019.

laboratory conditions remained toxic to 12 months when in storage conditions. At temperatures ranging from 35-40 degrees °C, the salts were more toxic to the larvae, than at lower temperatures (15 and 25 °C). There was no significant difference between the mortality of larvae collected in the field in relation to the laboratory, during all tests conducted until here. When different instars of larvae were exposed to a sublethal dose LC<sub>20</sub>, the larvae in stages 1 and 2 did not develop, and after three days, they were all dead. The third instar larvae develop until they reach the pupa stage, but did not survive to adulthood. No larvae reached the fourth stage. These results indicate that, in addition to larvicidal, the salts seem to serve as a growth inhibitor. Under the conditions in which the bioassays were made, the ultraviolet light didn't seem to interfere with the quality of the salt, for at least 24 hours of exposure. Maybe when tested in natural environment, the results could be the same, indicating that the salts can be fully used in the field. Although macroscopically larvae appear to have suffered pathogenic effects when treated with salts, in studies with histological cuts it was not possible to identify morphological lesions in tissues or organs of exposed larvae. Only small cellular disorganization was observed on the wall of the intestine of a few larvae. There is a need for more studies to be conducted, with a larger number of larvae in order to identify the injuries, that macroscopically appear to be produced. With respect to the development of *L. sativa*, the salts induced positively with the fastest breaking dormancy of seeds by stimulating their germination, and consequent growth of seedlings. In tests with the organophosphate temephos, this chemical delayed seed germination and inhibited the growth of seedlings. Accordingly, to the subject conditions in which the bioassays were done, imidazole salts do not appear to affect non-target organisms in environmental conditions. The studies conducted here helped to understand the possible mechanisms of toxicity of imidazole salts throughout the process larvicidal/insecticide, as well as to estimate possible environmental impacts during their use. The salts tested are toxic to the larvae in very low doses and for long period of time. In addition, do not appear to be toxic to non-target organisms that have been tested. Thus, on the basis of the results, we can contribute in the future on mosquito control strategy and the consequent impact on epidemics of Arboviruses.

**Key words:** histology, *Lactuca sativa*, mosquitoes, new insecticides, temperature.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Geral .....	3
2.2 Específicos .....	3
<b>3.REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
3.1 Distribuição e biologia de <i>Aedes aegypti</i> .....	4
3.2 Estratégias de controle do vetor.....	11
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I - GEORREFERENCIAMENTO DE FOCOS DE <i>Aedes aegypti</i> NO MUNICÍPIO DE PASSO FUNDO/RS .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 Distribuição de armadilhas e coleta de ovos de <i>Aedes aegypti</i> nativos no município de Passo Fundo/RS.....	22
2.2 Estabelecimento e manutenção dos mosquitos nativos em laboratório.....	25
<b>3.RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Levantamento dos focos de <i>Ae. aegypti</i> .....	25
<b>4.DISSCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO II - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
2.1 Triagem de sais imidazólicos com atividade larvicida .....	47
2.2 Atividade Toxicidade dos sais imidazólicos selecionados sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> linhagem Rockefeller e Nativos .....	48

2.3 Persistência residual e estabilidade química dos sais.....	49
2.4 Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas em diferentes temperaturas .....	50
2.5 Avaliação do desenvolvimento larval em doses subletal LC <sub>20</sub> .....	50
2.6 Interferência de luz ultravioleta sobre os sais imidazólicos e o efeito sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	51
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
3.1 Sais imidazólicos com potencial larvicida para <i>Aedes aegypti</i> .....	51
3.2 Atividade dos sais imidazólicos selecionados sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	52
3.3 Efeito tóxico residual de soluções aquosas dos sais imidazólicos .....	56
3.4 Efeito residual letal após exposição do sal imidazólico a condições ambientais.	57
3.5 Efeito dos sais imidazólicos e do Temefós sobre larvas em diferentes temperaturas.....	59
3.6 Desenvolvimento de larvas de Rockefeller expostas a uma dose subletal LC <sub>20</sub> .	61
3.7 Efeito da luz ultravioleta na eficácia qualidade dos sais imidazólicos .....	62
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
4.1 Sais imidazólicos com potencial larvicida para <i>Aedes aegypti</i> .....	63
4.2. Atividade dos sais imidazólicos selecionados sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	64
4.3 Efeito tóxico residual dos sais imidazólicos em soluções aquosas e secas .....	65
4.4 Efeito dos sais imidazólicos e do Temefós sobre larvas em diferentes temperaturas.....	66
4.5 Desenvolvimento de larvas de <i>Ae. aegypti</i> cepa Rockefeller expostas a uma dose subletal LC <sub>20</sub> .....	68
4.6 Efeito da luz ultravioleta na eficácia qualidade dos sais imidazólicos .....	69
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO III - ESTUDO HISTOLÓGICO DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> TRATADAS COM SAIS IMIDAZÓLICOS .....</b>	<b>75</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>

<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>
3.1 Avaliação histológica das larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	84
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>CAPÍTULO IV - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM ALFACE <i>Lactuca sativa</i> (ASTERACEAE) .....</b>	<b>91</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>95</b>
2.1 Avaliação de sais imidazólicos em sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	95
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
3.1 Comparação do tamanho da radícula e do hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> .....	97
3.2 Comparação do tamanho da radícula e do hipocótilo de <i>Lactuca sativa</i> .....	99
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM *Aedes aegypti*

**Tabela 1:** Efeito de seis sais imidazólicos na mortalidade larval de *Aedes aegypti* após 24 e 48 horas. ....52

**Tabela 2:** Concentrações letais dos sais imidazólicos (LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>, LC<sub>99</sub>) na mortalidade larval de *Ae.aegypti* linhagem Rockefeller após 24 e 48 horas de exposição, e seu intervalo de confiança e Pearson's chi-square. ....53

**Tabela 3:** Concentrações letais dos sais imidazólicos (LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>, LC<sub>99</sub>) na mortalidade larval de *Ae.aegypti* nativo após 24 e 48 horas de exposição, e seu intervalo de confiança e Pearson's chi-square. ....53

### CAPÍTULO IV - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM ALFACE *Lactuca sativa* (ASTERACEAE)

**Tabela 4:** Concentrações de sais imidazólicos e do organofosforado Temefós utilizados para determinar sua toxicidade em sementes de *Lactuca sativa*. ....95

**Tabela 5:** Média do número de sementes germinadas, tamanho de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* quando tratadas com cada composto testado (sais imidazólicos e Temefós), em comparação ao grupo-controle (água). **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I - GEORREFERENCIAMENTO DE FOCOS DE *Aedes aegypti* NO MUNICÍPIO DE PASSO FUNDO/RS

**Quadro 1:** Quantificação do número de focos de *Aedes aegypti* encontrados nos pontos do estudo em comparação ao número de focos encontrados pela Vigilância epidemiológica, identificando a temperatura média e média pluviométrica nas diferentes estações do ano de 2016 .....27

**Quadro 2:** Quantificação do número de focos de *Aedes aegypti* encontrados nos pontos do estudo em comparação ao número de focos encontrados pela Vigilância epidemiológica, identificando a temperatura média e média pluviométrica nas diferentes estações do ano de 2017 .....28

### CAPÍTULO III - ESTUDO HISTOLÓGICO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* TRATADAS COM SAIS IMIDAZÓLICOS

**Quadro 3:** Etapas do processo de impregnação das larvas de *Aedes aegypti* em solução resinada .....82

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - GEORREFERENCIAMENTO DE FOCOS DE *Aedes aegypti* NO MUNICÍPIO DE PASSO FUNDO/RS

- Figura 1:** Distribuição em um banco de dados de ocorrência por *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B) plotadas na superfície subjacente de previsão. Os pontos pretos representam relatos de populações dos mosquitos, por órgãos de saúde pública.....6
- Figura 2:**Comparativo dos casos de Dengue segundo classificação, RS, 2010 a 2018 (até SE 52)\* .....6
- Figura 3:** Municípios Infestados por *Aedes aegypti*, RS, 2000-2018\* (até SE 51) .....7
- Figura 4:**Mapa dos municípios infestados e com casos de Dengue, Chikungunya e Zika Vírus notificados e confirmados, RS, SE01 a 52/2018. ....8
- Figura 5:** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. O ciclo compreende uma fase aquática (larvas, pupas) e uma fase terrestre (ovos, adultos). ....9
- Figura 6:** Morfologia externa da larva do mosquito *Aedes aegypti*. .... 10
- Figura 7:** *Aedes aegypti* adulto. .... 11
- Figura 8:** Formação e representação da Rede Triangular Irregular (TIN) no município de Passo Fundo/RS. ....23
- Figura 9:** Localização dos 20 pontos selecionados para a identificação de focos de *Aedes aegypti* no município de Passo Fundo/RS. ....23
- Figura 10:** Armadilha ovitrampa utilizada para coleta de ovos de *Aedes aegypti*. ....24
- Figura 11:** Mapa de localização dos focos de *Ae. aegypti* em cada um dos bairros selecionados no estudo nos anos de 2016 (A) e 2017 (B). Os pontos representam os focos do vetor. ....30
- Figura 12:** Mapa de localização dos focos de *Ae. aegypti* em cada um dos bairros selecionados no estudo nos anos de 2016 (A) e 2017 (B). Os pontos representam os focos do vetor. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13:** Mapa em 3D representando a quantidade total de focos de *Aedes aegypti* encontrados nos anos de 2016 (A) e 2017 (B) nos seis bairros do estudo, no município de Passo Fundo/RS. ....32
- Figura 14:** Mapa de representação da densidade populacional nos bairros do ensaio a campo onde foram encontrados focos de *Aedes aegypti* em 2016 (A) e 2017(B). 33
- Figura 15:** Mapa de representação da densidade demográfica nos bairros do ensaio a campo onde foram encontrados focos de *Ae. aegypti* em 2016 (A) e 2017(B). ....34



**Figura 16:** Distribuição no relevo dos focos de *Ae. aegypti* encontrados pela Vigilância epidemiológica e no ensaio de campo nos anos de 2016 e 2017.....35

## CAPÍTULO II - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM *Aedes aegypti*

**Figura 17:** Sais utilizados no estudo: MIm = methylimidazoliumcation; Cl = chlorideanion; MeS = methanesulfonateanion; NTf<sub>2</sub> = bis(trifluoromethane)sulfonimide. ....48

**Figura 18:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 24h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /-→ desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0.312 µg/L), 8 (0.156 µg/L), 9 (0.078 µg/L) e 10 (0.039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle. ....54

**Figura 19:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 48 h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /-→ desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0.312 µg/L), 8 (0.156 µg/L), 9 (0.078 µg/L) e 10 (0.039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle. ....54

**Figura 20:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* nativo após 24 h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /-→ desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0.312 µg/L), 8 (0.156 µg/L), 9 (0.078 µg/L) e 10 (0.039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle. ....55

**Figura 21:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* nativo após 48 h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /-→ desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0.312 µg/L), 8 (0.156 µg/L), 9 (0.078 µg/L) e 10 (0.039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle. ....55

**Figura 22:** Larvas de *Aedes aegypti*: Lado esquerdo: larva controle. No meio: larva tratada com o sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl após 24h de exposição. Lado direito: larva tratada com o sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl após 48h de exposição. Aumento = 12X. ...56

**Figura 23:** Efeito tóxico residual de uma solução aquosa de C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆) sobre larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. Cada ponto representa a mortalidade larval média ± desvio padrão. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.....57

- Figura 24:** Efeito tóxico residual do sal imidazólio C<sub>18</sub>MImCl após 24 e 48 horas, que foi mantido em condições ambientais durante 12 meses (Setembro 2017-Agosto 2018) sobre as larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.\* p<0,05 em relação a Setembro de 2017 (quando inicio o experimento) em 24 horas. # p<0,05 em relação a Setembro de 2017 em 48 horas. ....58
- Figura 25:** Efeito tóxico residual do sal imidazólio C<sub>16</sub>MImMeSapós 24 e 48 horas, que foi mantido em condições ambientais durante 12 meses (Setembro 2017-agosto 2018) sobre as larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.\* p<0,05 em relação a Setembro de 2017 (quando inicio o experimento) em 24 horas. # p<0,05 em relação a Setembro de 2017 em 48 horas. ....58
- Figura 26:** Efeito dos sais sobre larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 24 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós.\* p<0,05, representa diferença significativa em relação ao controle.....59
- Figura 27:** Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 48 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas, em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \* p<0,05, representa diferença significativa em relação ao controle.....60
- Figura 28:** Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas nativonativos de *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas, em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \* p<0,05, representa diferença significativa em relação ao controle.....60
- Figura 29:** Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas nativonativos de *Aedes aegypti* após 48 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas, em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \* p<0,05, representa diferença significativa em relação ao controle.....61
- Figura 30:** Desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* em 1º instar (A), 2º instar (B) e 3º instar (C) após a exposição a uma dose subletal LC<sub>20</sub> do sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl. \* Diferença significativa em relação ao controle pelo teste t (P<0,001). ..62
- Figura 31:** Efeito dos sais imidazólicos em larvas de *Aedes aegypti*, linhagem Rockefeller em três diferentes tempos (horas)de exposição à luz ultravioleta.\* p<0,05, representa diferença significativa em relação ao controle.....63

### CAPÍTULO III - ESTUDO HISTOLÓGICO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* TRATADAS COM SAIS IMIDAZÓLICOS

- Figura 32:** Diferenciação de instares larvais de *Aedes aegypti*. (A) Primeiro instar recém eclodida. (B) Primeiro instar inicial. (C) Primeiro instar final. (D) Segundo instar inicial. (E) Segundo instar final. (F) Terceiro instar inicial. (G) Terceiro instar final. (H) Quarto instar. ....79

<b>Figura 33:</b> Divisão do corpo de uma larva de <i>Aedes aegypti</i> . A: 40X. Coloração: HE. .....	80
<b>Figura 34:</b> Larvas de <i>Aedes aegypti</i> : Lado esquerdo: larva controle. No meio: larva tratada com o sal imidazólico C <sub>18</sub> MImCl após 24 h de exposição. Lado direito: larva tratada com o sal imidazólico C <sub>18</sub> MImCl após 48 horas de exposição. Aumento = 12X.....	81
<b>Figura 35:</b> Larvas de <i>Aedes aegypti</i> previamente tratadas com sal imidazólico C <sub>18</sub> MImCl. (A) Microtubos contendo larvas fixadas em Bouin (B); Microtubos contendo larvas lavadas e fixadas em etanol 70%. .....	82
<b>Figura 36:</b> Larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com sal imidazólico C <sub>18</sub> MImCl e posteriormente fixadas em moldes de blocos contendo resina. ....	83
<b>Figura 37:</b> Visão geral de uma larva de <i>Aedes aegypti</i> saudável. Coloração: PAS. A: 200X. BF (Bomba Faringiana). PV (Proventrículo), CG (Corpo Gorduroso), CGT (Cecos Gástricos).....	85
<b>Figura 38:</b> Cortes longitudinais da região posterior do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , (A) larva sadia. Coloração HE. A: 200X. (B) Corte longitudinal de uma larva de <i>Aedes aegypti</i> exposta ao sal imidazólico por um período de 24 horas. Coloração: HE. A: 400X. BE (Borda em escova), EEnd (Espaço endoperitrófico), EECT (Espaço ectoperitrófico), CE (Células epiteliais), MU (Músculo).....	86
<b>Figura 39:</b> Corte longitudinal da região posterior do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao sal imidazólico, após 24 horas. Coloração HE. A: 400X. CE (Células epiteliais desorganizadas). ....	87
<b>Figura 40:</b> Região do intestino médio de larva de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao sal imidazólico. Coloração PAS. (A) larva exposta após 6 horas. A: 200X. MB (Membrana basal) MP (Membrana periférica) CI (Conteúdo intestinal). (B) larva exposta após 36 horas. A: 400x. CI (Conteúdo intestinal). <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>Figura 41:</b> Corte longitudinal da região mediana do intestino médio de uma larva de <i>Aedes aegypti</i> . Coloração HE. A:1000X. (A) larva controle, CE (Células epiteliais) (B) Larva exposta após 36 horas, EI (Espaços intercelulares). ....	88

#### CAPÍTULO IV - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM ALFACE *Lactuca sativa* (ASTERACEAE)

<b>Figura 42:</b> Placas de Petri contendo papel filtro e 10 sementes de <i>Lactuca sativa</i> , testadas em diferentes concentrações de sais imidazólicos .....	96
<b>Figura 43:</b> Esquema representando a radícula e o hipocótilo de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> . ....	97

**Figura 44:** Placas de Petri com as plântulas de *Lactuca sativa*, germinadas após sete dias de exposição aos sais imidazólicos . .....97

**Figura 45:** Exemplo de medição da radícula e do hipocótilo das plântulas de *Lactuca sativa*. .....99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
±	mais ou menos
<	menor que
>	maior que
%	por cento
LC	letal concentration (concentração letal)
µm	micrômetro
Cl	chlorideanion;
C <sub>16</sub> MImCl	cloreto de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio
C <sub>18</sub> MImCl	cloreto de 1-n-octadecil-3-metilimidazólio
C <sub>4</sub> MImCl	cloreto de 1-n-butil-3-metilimidazólio
C <sub>10</sub> MImCl	cloreto de 1-n-decilo-3-metilimidazólio
C <sub>16</sub> MImMeS	metanossulfonato de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio
C <sub>16</sub> MImNTf <sub>2</sub>	bis (trifluorometilsulfonyl) imida de 1-n-hexadecil-3-metilimidazólio
cm	centímetro
DEET	Dietiltoulamida
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
h	hora
MeS	methanesulfonateanion
µg/L	migrograma por litro
MIm	methylimidazoliumcation
mm	milímetros
NTf <sub>2</sub>	bis(trifluoromethane)sulfonimide
PAS	Ácido Periódico de Schiff
ppm	parte por milhão
RS	Rio Grande do Sul
SI	sais imidazólicos
SIG	Sistema de Informação Geográfica
TIN	Rede Triangular Irregular
UR	Unidade relativa
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume

Na+	Íon sódio
K+	íon potássio
Cl-	íon cloreto

## 1. INTRODUÇÃO

O espaço ambiental em que o homem atual encontra-se inserido deveria proporcionar-lhe qualidade de vida, salubridade e equilíbrio (Lapinski, Funk & Moccia, 2015). Contudo, as suas ações antrópicas sobre o ambiente estão alterando o ciclo natural de algumas espécies de plantas e de animais. Esse comportamento tem levado a sérias consequências, as quais têm afetado diretamente a saúde humana. Como exemplo de ação antrópica nociva está o acúmulo de lixo ou de entulhos nos arredores das residências, que, uma vez que contenham água, podem servir como criadouros de mosquitos vetores (Lapinski, Funk & Moccia, 2015) Entre estes esta o *Ae. aegypti* que transmite os arbovírus causadores de doenças como dengue, febre amarela, chikungunya e zika, ocasionando grande impacto a saúde humana. A família Culicidae possui várias espécies de mosquitos de importância médica e veterinária, que apresentam grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes, desde florestas até áreas estritamente urbanizadas, que sofrem constante degradação (Beerntsen et al., 2000; Forattini, 2002).

No Brasil, o principal transmissor dos arbovírus citados acima é o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). Essa espécie é extremamente antropofílica e de hábitos diurnos, com ocorrência quase que exclusivamente em áreas urbanas, podendo ser encontrada no intra e no peridomicílio (WHO, 2012).

Para um melhor manejo e para o controle adequado desse vetor, é necessário que se identifiquem os locais de ocorrência de focos, buscando por suas larvas, que normalmente são encontradas em locais como o lixo que se acumula no peridomicílio e até em vasos de plantas intradomicílio. Uma vez encontrados focos de mosquitos em cidades, é importante que seus pontos sejam identificados, de preferência na forma de georreferenciamento. Assim, pode-se contribuir com órgãos de saúde pública no sentido de adotar medidas de controle necessárias para o combate ao mosquito, principalmente com o uso de larvicidas.

O controle de larvas desses mosquitos normalmente é feito a partir da eliminação de criadouros de larvas com o uso de produtos químicos ou biológicos diretamente nestes locais (Ministério da Saúde, 2019). Entretanto, o uso desses inseticidas, em longo prazo, pode induzir a resistência nesta espécie de mosquito, como já se observa em várias regiões do Brasil (Garcia et al., 2018), além de contaminar o ambiente (Lushchak et al., 2018). Portanto, a identificação de novos

candidatos a inseticidas poderá dar subsídios a novas alternativas de controle químico, eliminando indivíduos resistentes aos inseticidas em uso.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012), para que um larvicida/inseticida seja eficiente, deve ser letal para mais do que 50% das larvas em 24 horas e 90% em 48 horas. Além disso, deve ter um período longo de persistência residual no ambiente e influenciar negativamente o desenvolvimento de larvas, a eclosão de pupas e a emergência de mosquitos adultos, quando existem doses sub-letais nos criadouros. Além disso, a concentração utilizada deve ser ínfima, para que interfira o mínimo possível no ambiente de organismos não alvos, incluindo plantas de importância agrícola.

Devido à ampla distribuição de *Ae. aegypti* mundialmente e ao conhecimento de que várias populações são resistentes aos inseticidas mais utilizados, é necessário que estudos voltados à descoberta de outros produtos sejam conduzidos. Nesse sentido, os sais imidazólicos, surgem como alternativa para o controle de *Ae. aegypti*. Estes sais têm sido amplamente estudados com os mais variados objetivos industriais e farmacêuticos por apresentarem características químicas importantes, como estabilidade e não volatilidade (Scherkker et al., 2007; Donato et al., 2010).

Neste trabalho o leitor encontrará uma Introdução geral ao tema e quatro capítulos conforme segue:

- I) Uma revisão geral relacionada à biologia de *Ae. aegypti* e estratégias de controle deste vetor;
- II) Um capítulo abordando georreferenciamento em Passo Fundo/RS;
- III) Um capítulo relacionado a experimentos com sais imidazólicos para o controle de *Ae. aegypti*;
- IV) Um capítulo em que se estudam os tecidos de larvas tratadas com sais imidazólicos;
- V) Um capítulo relacionado à avaliação dos sais em um organismo não alvo.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a potencialidade de sais imidazólicos para o controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

### 2.2 Específicos

2.2.1. Verificar a distribuição de *Aedes aegypti* em a área urbana na cidade de Passo Fundo.

2.2.2. Estabelecer uma colônia desses mosquitos em laboratório, visando à realização comparativa de bioensaios com a cepa de referência Rockefeller;

2.2.3. Selecionar Sais Imidazólicos e avaliar sua toxicidade sobre larvas;

2.2.4. Determinar a concentração letal dos sais (LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> e LC<sub>99</sub>) para cada população exposta (referência e nativonativo);

2.2.5. Verificar a persistência residual dos sais imidazólicos e sua estabilidade química;

2.2.6. Verificar o efeito dos sais sobre larvas em diferentes temperaturas;

2.2.7. Verificar, em doses subletais LC<sub>20</sub>, o desenvolvimento larval;

2.2.8. Avaliar a interferência da à luz ultravioleta no efeito dos sais sobre as larvas;

2.2.9. Determinar, através de cortes histológicos, possíveis alterações morfológicas causadas pelos sais sobre as larvas;

2.2.10 Verificar o efeito dos sais imidazólicos no desenvolvimento da alface *Lactuca sativa*, como um organismo não alvo.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Distribuição e biologia de *Aedes aegypti*

Algumas espécies de *Aedes* são mundialmente consideradas como as principais vetoras de agentes de doenças como dengue, febre amarela, chikungunya, e, mais recentemente, zika. No Brasil, as espécies transmissoras desses arbovírus são *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894). De fato, há poucos anos Kraemer et al. (2015) mapearam as ocorrências globais de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de 1960 a 2014, e destacam a importância do Brasil como o responsável pela maior distribuição dessas espécies de mosquitos no mundo. As espécies são encontradas de norte a sul do país, com altos índices de infestação (Figura 01).

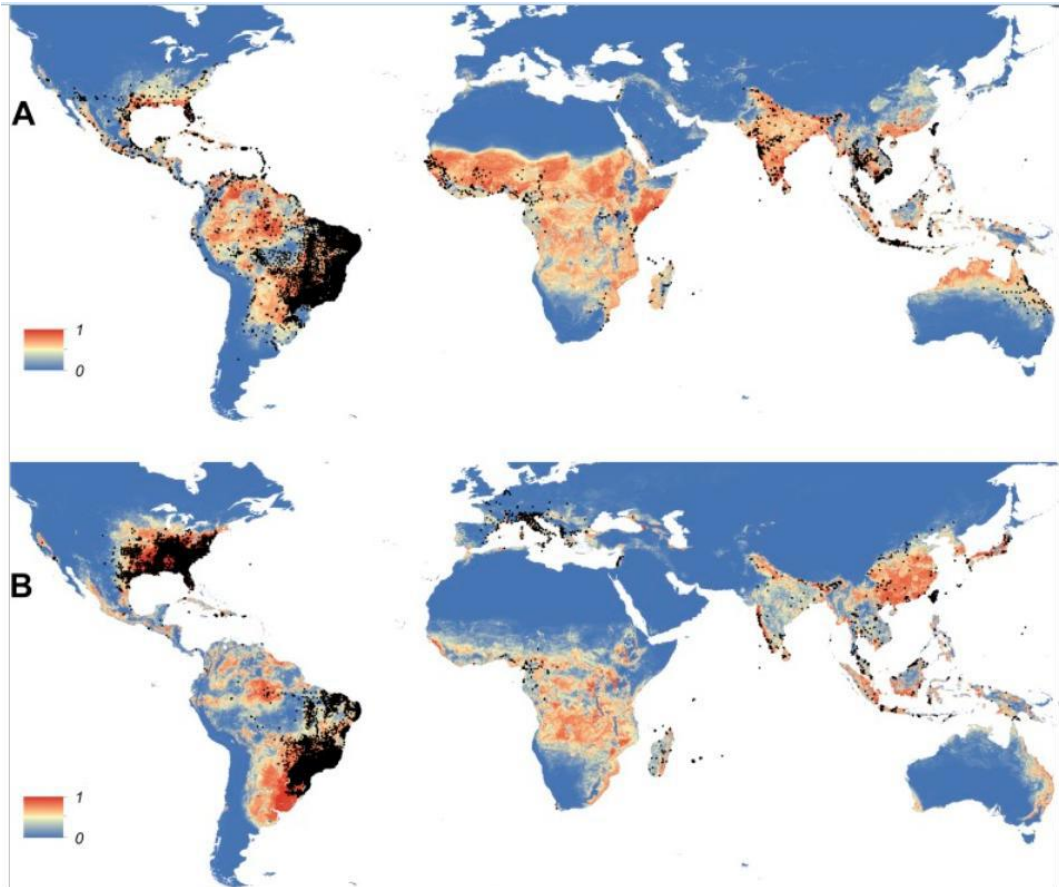
Dentre as arboviroses, a dengue destaca-se como a principal causa de mortes em regiões tropicais e subtropicais (Tolle, 2009; Rodrigues et al., 2016; Paixão, Teixeira & Rodrigues, 2018). O principal vetor do vírus da dengue no Brasil é *Ae. aegypti*, um mosquito de hábitos diurnos que prefere principalmente água limpa e parada para depositar seus ovos. Essa espécie é de origem africana, primeiramente descrita no Egito, o que lhe conferiu seu nome específico *Aedes aegypti* (Christophers, 1960). Acredita-se que sua introdução em outras regiões ocorreu através de embarcações (Nelson, 1986).

O primeiro registro dessa espécie de mosquito no Brasil ocorreu em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas (Franco, 1969). Por volta de 1930, a espécie de mosquito já ocupava uma área considerável do país. Em 1940, o Brasil iniciou uma campanha de controle de mosquitos, com o objetivo de combater a febre amarela. Em razão disso, a partir de 1955, não se registraram mais casos de dengue e febre amarela no território nacional. De acordo com Gubler (1998), a partir deste momento não houve mais controle sobre a espécie, pois havia sido considerada erradicada em 1970. Contudo, o mosquito reapareceu e hoje está presente em todos os estados brasileiros.

Além da dengue (Dos Santos et al., 2017), o aumento da distribuição e densidade populacional de *Ae. aegypti* em praticamente todo o território nacional está resultando em uma alta incidência de outras arboviroses no Brasil, como chikungunya e zika (Azevedo et al., 2015; Vega-Rúa et al., 2015; Kotsakiozi et al.,

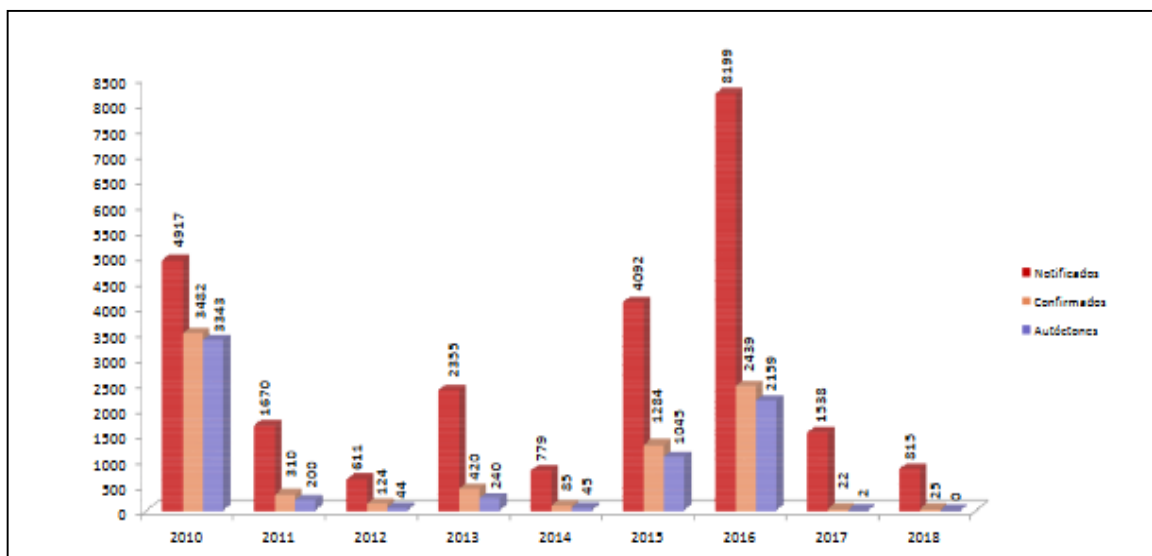
2017; Gregianini et al., 2017). Entretanto, a maior preocupação relaciona-se à microcefalia, que é associada ao vírus zika (Akiner et al., 2016; Tilak et al., 2016; Zé-Zé et al., 2016; Heukelbach et al., 2016). No Brasil, em 2017, foram confirmados 3.356 casos de zika vírus (CEVS, 2017). Em 2018 houve um aumento significativo, foram 8.791 casos confirmados, havendo um aumento bem significativo (CEVS, 2018). No Rio Grande do Sul, em 2019, foram registrados seis casos suspeitos de zika vírus ainda não confirmados. Mas, de forma geral, observou-se uma queda importante na circulação do vírus na região em comparação com o ano de 2018, quando havia 134 casos suspeitos (CEVS, 2019).

A Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (SES/RS) vem registrando vários casos suspeitos de dengue desde 2010 (Figura 2). Desde esta época, a Secretaria observa, também, o aumento significativo de focos de *Ae. aegypti* em todo o Estado (Figura 3), o que vem contribuindo para o aumento de casos da doença, incluindo casos autóctones. Paralelamente, a SES/RS vem observando que, devido à ampla distribuição dessa espécie de mosquito, o Estado tem apresentado vários casos de chikungunya e zika (Figura 4).



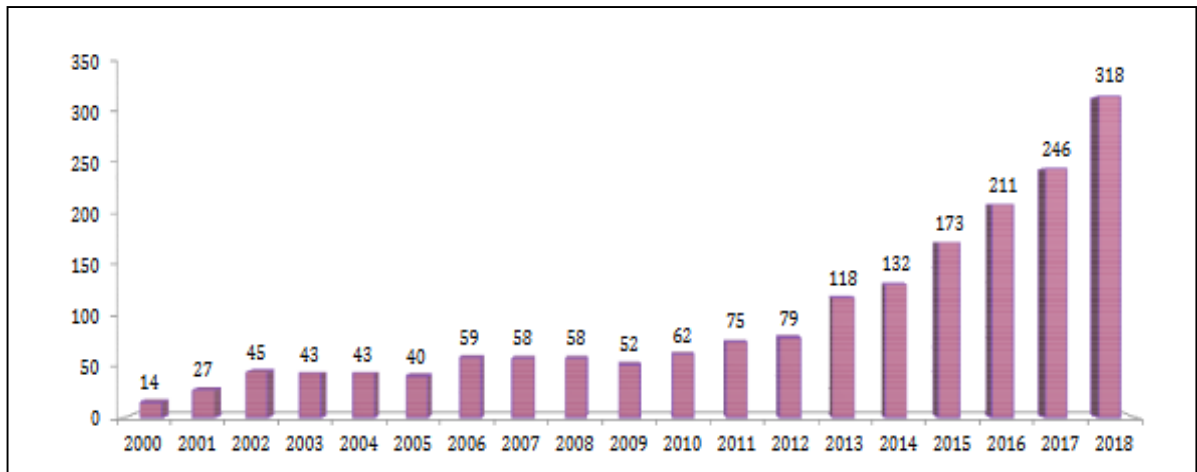
**Figura 1:** Distribuição em um banco de dados de ocorrência por *Aedes aegypti* (A) e *Aedes albopictus* (B) plotadas na superfície subjacente de previsão. Os pontos pretos representam relatos de populações dos mosquitos, por órgãos de saúde pública.

Fonte: Moritz et al. (2015).



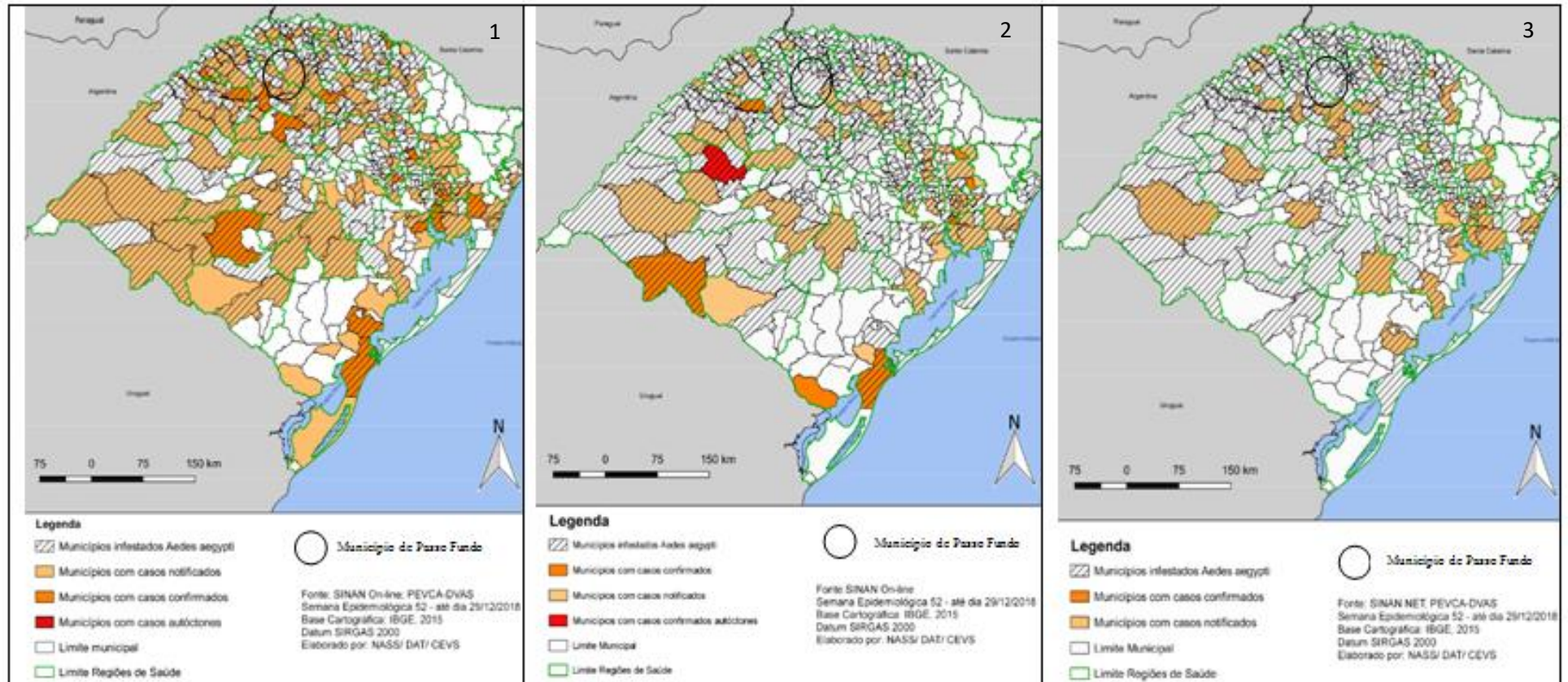
**Figura 2:** Comparativo dos casos de Dengue segundo classificação, RS, 2010 a 2018 (até SE 52)\*

Fonte: SINAN (2018).



**Figura 3:** Municípios Infestados por *Aedes aegypti*, RS, 2000-2018\* (até SE 51)

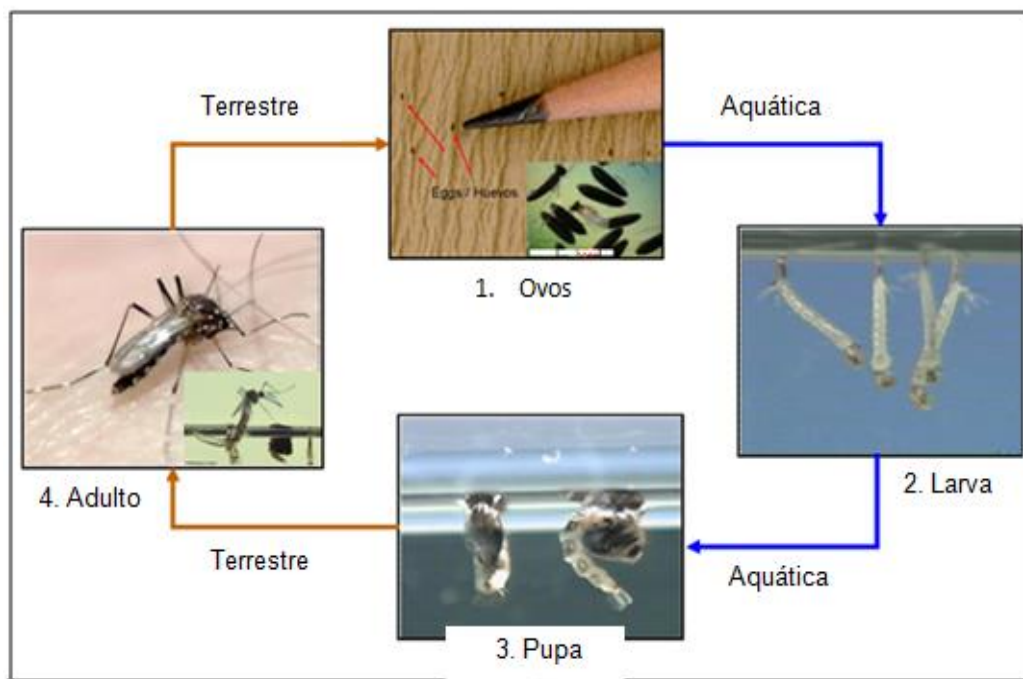
Fonte: SISPNDC-RS (2018).



**Figura 4:** Mapas dos municípios infestados e com casos de Dengue (1), Chikungunya (2) e Zika Vírus (3) notificados e confirmados, RS, SE01 a 52/2018.

Fonte: SINAN (2018).

Em regiões tropicais, o *Ae. aegypti* possui um curto ciclo biológico com duração de 15 a 30 dias, que compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Beserra et al., 2006) (Figura 05). Seu ciclo aquático é influenciado pelo tipo e pela qualidade dos reservatórios de água. Em relação a esse aspecto, esse inseto prefere reproduzir-se em reservatórios de águas limpas, embora possa adaptar-se às novas situações impostas pelo homem (Chitolina et al., 2016). Essa espécie ocorre, em áreas urbanas, intra e peridomicílio (Consoli & Oliveira, 1994).



**Figura 5:** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. O ciclo compreende uma fase aquática (larvas, pupas) e uma fase terrestre (ovos, adultos).

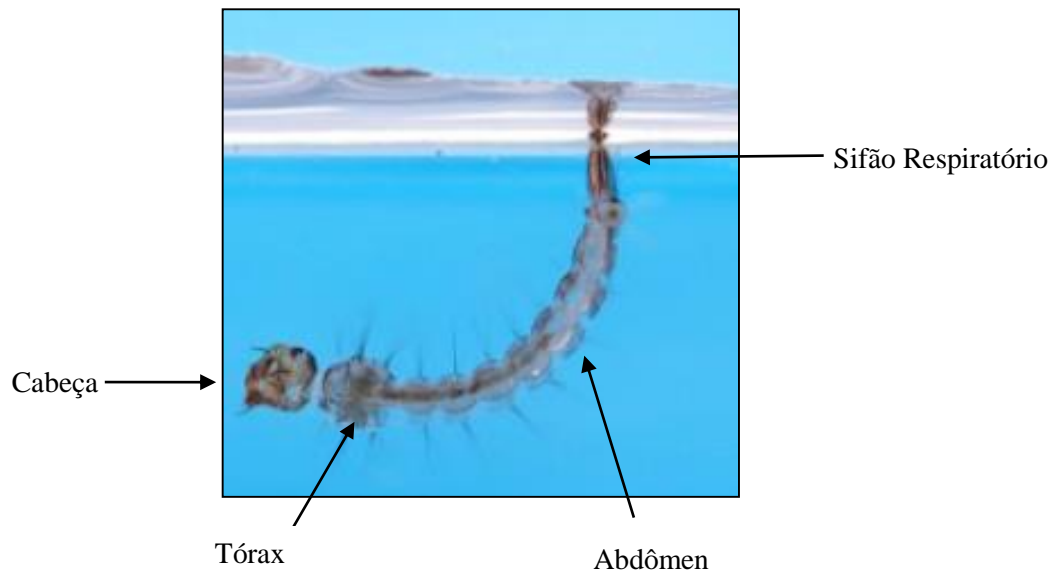
Fonte: CDC (2019).

O período do ciclo em que o mosquito mais se alimenta e se desenvolve é a fase larval. As larvas alimentam-se principalmente de material orgânico presente nas paredes dos criadouros (Brasil, 2001). Essa fase dura em torno de cinco dias e é influenciada por temperatura, luz e disponibilidade de alimentos. As larvas são sensíveis a movimentos bruscos e possuem fotofobia (Forattini, 2002).

As larvas são divididas em três regiões: cabeça, tórax e abdômen (Figura 06), sendo este último composto por oito segmentos. O último segmento do



abdômen possui quatro brânquias utilizadas para regulação osmótica e um sifão respiratório (Consoli & Oliveira, 1994).



**Figura 6:** Morfologia externa da larva do mosquito *Aedes aegypti*.

Fonte: Adaptado de CDC (2019).

As fêmeas possuem hábito hematofágico diurno e podem alimentar-se com sangue de vários hospedeiros, caso venham a ser interrompidas ou perturbadas. Quando infectadas, esse comportamento é o que de fato possibilita a transmissão de agentes de doenças a muitas pessoas (Forattini, 2002). Após completar seu repasto sanguíneo e maturar seus ovos, estes são depositados preferencialmente na parede de recipientes artificiais contendo água com pouca matéria orgânica. Grande parte dos recipientes que servem como criadouros são pequenos, descartáveis e se apresentam como habitat temporário, devido à possibilidade de serem esvaziados, eliminados ou destruídos (Forattini, 2002).

De acordo com Consoli e Oliveira (2002) as fêmeas adultas, depois de fecundadas, escondem-se em algum local escuro e úmido, no ambiente urbano, até serem estimuladas à alimentação sanguínea. Após o repasto e a digestão, estando os óvulos maduros, as fêmeas depositam-nos. Ao descenderem pelo oviduto, dá-se a fecundação, de modo que os ovos serão depositados no ambiente, na sua grande maioria, como ovos férteis (Lozovei, 2001). Os ovos de *Ae. aegypti* medem, aproximadamente, 1 mm de comprimento, de contorno alongado e fusiforme. No momento da postura, apresentam-se com uma coloração branca, mas rapidamente adquirem a cor negra brilhante (Funasa, 2001). Os ovos apresentam elevada



viabilidade com percentual de eclosão das larvas variando de 61,9% a 78,6% (Beserra et al., 2006).

Os adultos de *Ae. aegypti* podem ser facilmente identificados pela coloração escura, com tórax apresentando escamas branco-prateadas e lembrando uma lira (Figura 07). No abdômen e nas pernas, observam-se ainda manchas branco-prateadas e, no clipeo, dois tufos de escamas também branco-prateadas Forattinni (2002).



**Figura 7:** *Aedes aegypti* adulto.

Fonte: BVSMS (2018).

### **3.2 Estratégias de controle do vetor**

O controle do vetor, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ser considerado uma operacionalização do controle integrado, que se baseia na escolha de metodologias levando em consideração a realidade local, o levantamento das informações necessárias e a forma de aplicação. O controle feito a partir de produtos químicos é uma das tecnologias mais empregadas para o controle de vetores em saúde pública (Lounibos, 2002). Contudo, para que se estabeleça o tipo de inseticida utilizado, é necessário um estudo aprofundado sobre a distribuição dos vetores. O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por grande período de tempo tem sido um dos avanços nesta área. O primeiro inseticida com propriedade residual foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Este produto age nos canais de sódio, impedindo a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e em mamíferos. Seu efeito é inversamente proporcional à

temperatura: quanto mais baixa a temperatura, mais tóxico é o DDT para os insetos (Lounibos, 2002).

Compostos a base de Dietiltoulamida (DEET) são encontrados no mercado com ação repelente e inseticida. Atualmente, mais de 225 produtos são feitos à base de DEET (Weeks & Nikiforov, 2011). No entanto, seu uso em excesso pode ser prejudicial à saúde humana, causando desde problemas respiratórios a cutâneos (Bidwel et al., 2010). Além disso, resíduos de DEET têm sido encontrados nestes últimos anos em águas das mais variadas fontes, incluindo águas tratadas, o que demonstra a persistência do composto no ambiente (Tay et al., 2010). Existem preocupações ambientais em relação ao DEET, as quais se concentram mais nas prováveis acumulações do produto em água, o que poderia causar danos a diversos organismos aquáticos (Weeks & Nikiforov, 2011).

O inseticida organofosforado Temefós é o principal larvicida utilizado contra larvas do mosquito transmissor da dengue e da febre amarela no Brasil, desde a metade da década de 80. Contudo, relatos de resistência a esse inseticida são anteriores a 1995 (Chediak, 2016). A disseminação da resistência ao Temefós em populações brasileiras de *Ae. aegypti* vem comprometendo muito o esforço para um controle efetivo. Assim, verifica-se a urgente necessidade de se estudarem inseticidas alternativos para a eliminação preventiva de focos potenciais do mosquito (Chediak, 2016). Devido à ampla resistência e aos efeitos negativos no ambiente, esses produtos, ao longo dos anos, passaram a ser substituídos. O Plano Nacional de Combate a Dengue (PNCD) iniciou, em todo o território nacional, a substituição de compostos com Temefós pelos Hormônios Reguladores de Crescimento, como Diflubenzuron e Novarulon. Esses hormônios atuam sobre as larvas quando ingeridos, impedindo o processo de ecdise ou muda, inibindo, assim, o processo de pupação (Garcia Neto, 2011).

O uso dos inseticidas, em longo prazo, pode desenvolver resistência em mosquitos e alguns estudos associam essa taxa de resistência a processos metabólicos causados pela ação de enzimas específicas (Braga et al., 1999). A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos a tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte. Sendo assim, estima-se que uma determinada população de insetos tenha a capacidade de desenvolver geneticamente algum fator que lhe permita tolerar aquele composto químico. No caso do inseticida, ele não causa a alteração

genética, mas seu uso constante pode selecionar indivíduos resistentes. Os inseticidas químicos conhecidos como o Temefós atuam diretamente no sistema nervoso central em diferentes sítios. A alteração desses sítios causaria de fato a resistência, o que dificultaria a ação do produto (Lounibos, 2002).

A diminuição na sensibilidade aos larvicidas e aos inseticidas utilizados atualmente deve-se a diferentes mecanismos, como: a) mudanças comportamentais, a partir das quais o inseto reconhece a presença do inseticida e evita contato com ele (Mbogo et al., 1996; Mathenge et al., 2001), b) redução na penetração cuticular, associada a modificações na sua composição (Stone & Bronw, 1969), c) resistência metabólica, por aumento da capacidade de metabolização desses produtos, através de enzimas de detoxificação (Hemingway, 2000) d) modificação nos sítios alvos dos inseticidas (Ffrench-Constant, Daborn&Goff, 2004).

A busca por inseticidas ou larvicidas mais seguros e mais seletivos no seu modo de ação, e com menos riscos para os organismos não alvos e para o meio ambiente tem se intensificado (Altstein, Aharonson & Menn, 1993). Assim, são importantes que se estudem novas alternativas para o combate do vetor e não apenas medidas preventivas sobre a população. A identificação de novos inseticidas pode ser uma maneira de superar os mecanismos de resistência existentes em *Ae. aegypti* e de contribuir para o controle de doenças arbovirais como dengue, zika, chikungunya e febre amarela, as quais têm assolado nosso país nos últimos anos.

## REFERÊNCIAS

- Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. 2016. Correction: Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. PLoS Negl Trop Dis. 27(10):5.
- Altstein M, Aharonson N, Menn JJ. 1993. Overview: New targets for insect management in crop protection. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22: 5-12.
- Azevedo RS, Oliveira CS, Vasconcelos PF. 2015. Chikungunya risk for Brazil. Rev Saúde Públ. 49:58.
- Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. 2000. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:115-13.
- Beserra EB, Castro-Junior FP, Santos JW, Santos TS, Fernandes C. 2006. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. Neotrop Entomol. 35(6): 853–860.

- Bidwel JR Fau; Becker CBFH, Steve HSF, Stark R, Starck RFM, Michael T, Meyer MT. 2010. Occurrence of organic wastewater and other contaminants in cave streams in northeastern Oklahoma and northwestern Arkansas. Arch Environ Contam Toxicol. n.1432-0703 (Eletronic), p.286-98.
- BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em <<https://www.bvsms.saude.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- Braga IA, Galardo AKR, Machado Filho MR, Zimmerman R, Braga IL. 1999. **Controle seletivo de vetores da Malária: guia para o nível municipal**. Brasília: Ministério da Saúde: 120p.
- BRASIL. 2001. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. FUNASA. Brasília: Ministério da Saúde: 84 p.
- CEVS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Disponível em:<[https://www.ufrgs.br/rscontraaedes/documents/boletim\\_informativo\\_epidemiologico\\_dengue\\_14\\_de\\_janeiro\\_2018.pdf](https://www.ufrgs.br/rscontraaedes/documents/boletim_informativo_epidemiologico_dengue_14_de_janeiro_2018.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m\\_lifecycle.html#stages](https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html#stages)>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- Consoli R, Oliveira L. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz. 228p.
- Chediak MG, Pimenta FJR, Coelho GE, Braga IA, Lima JB, Cavalcante KR et al. 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 11:311–321.
- Chitolina RF, Anjos FA, Lima TS, Castro EA, Costa-Ribeiro MCV. 2016. Raw sewage as breeding site to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, culicidae). Acta Trop.164:290-296. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.07.013.
- Christophers SR. 1960. ***Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure**. London: Cambridge University Press. 738 p.
- Donato RK, Benvegnú MA, Furlan LG, Mauler RS and Scherkker HS. 2010. Imidazolium salts as liquid coupling agents for the preparation of polypropylene-silica composites. J Appl Polymer Sci 1:304–307.
- Dos Santos TP, Cruz OG, da Silva KAB, de Castro MG, de Brito AF, Maspero RC, de Alcântara R, Dos Santos FB, Honorio NA, Lourenço-de-Oliveira R. 2017. Dengue serotype circulation in natural populations of *Aedes aegypti*. Acta Trop. 176:140-143.
- Forattini OP. 2002. O pensamento epidemiológico sobre infecções. Rev Saúde Públ. 36:257–262.
- FUNASA- Fundação Nacional de Saúde. 2001. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5. ed. Brasília. 842p.

- Franco O.1969. Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*. Rev. bras. Malariol. e Doenças Tropicais.21(4):729-731.
- Ffrench-Constant RH, Daborn PJ, GoffGLE. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends in Genetics.20 (3):163–170.
- Garcia Neto LJ. 2011. **Efeito residual do Diflubenzuron sobre larvas de *Aedes aegypti* em condições simuladas de campo, no laboratório.** Universidade Estadual do Ceará- Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza, Ceará.
- Garcia GA, David MR, Martins AJ, Maciel-de-Freitas R, Linss JGB, Araújo SC, Lima JBP, Valle D. 2018. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions.PLoSNeglTropDis.12;12(2):e0006227.doi:10.1371/journal.pntd.0006227.
- GublerDJ.1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin Microbiol Rev. 11(3):480-496.
- Gregianini TS, Ranieri T, Favreto C, Nunes ZMA, Tumoto Giannini GL, Sanberg ND, da Rosa MTM, da Veiga ABG. 2017. Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil: Chikungunya and Zika outbreaks, 2014-2016. Rev Med Virol. 27(6).
- Heukelbach J, Alencar CH, Kelvin AA, de Oliveira WK, Pamplona de Góes Cavalcanti L. 2016. Zika virus outbreak in Brazil. J Infect Dev Ctries. 10(2):116-20.
- HemingwayJ. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochem Mol Biol. 30(1):1009-15.
- Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barkercm, et al. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*.ELife. 4: 18.
- Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, Martins AJ, Powell JR. 2017.Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. PLoS Negl Trop Dis. 25(11):7.
- Lapinski MK, Funk JA, Moccia LT. 2015. Recommendations for the role of social science research in One Health. Soc Sci Med. Yaoundé, 129:51-60.
- Lozovei AL. 2001. Microhabitats de mosquitos (Diptera, Culicidae) em internódios de taquara na Mata Atlântica, Paraná, Brasil. Iheringia, Série Zoologia. 90: 3-13.
- Lounibos LP. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol. 47(1): 233–266.
- Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB. 2018. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. EXCLI J. 8;17:1101-1136. doi: 10.17179/excli2018-1710

- Mathenge EM, Gimnig JE, Kolczak M & Cols. 2001. Effect of permethrinim-pregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J. Med. Entomol.* 38: 531-536.
- Ministério da Saúde. 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue.** (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: Ministério da Saúde, 160 p.
- Mbogo CN, Baya NM, Ofulla AV, Cols. 1996. The impact of permethrinim-pregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10:251-259.
- Moritz UG Kraemer, Marianne E Sinka, Kirsten A Duda, Adrian QN Mylne, Freya M Shearer, Christopher M Barker et al. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *ELife - Ecology, epidemiology and Global Health.* 4:e08347 DOI: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347.008>
- Nelson MJ. 1986. ***Aedes aegypti: biologia y ecologia.*** Washington, DC, Organización Panamericana de La Salud, 80p.
- Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. 2018. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health.* 4:3.
- Rodrigues NC, Lino VT, Daumas RP, Andrade MK, O'Dwyer G, Monteiro DL, Gerardi A, Fernandes GH, Ramos JA, Ferreira CE, Leite ID. 2016. Temporal and Spatial Evolution of Dengue Incidence in Brazil, 2001-2012. *PLoS One.* 11:11.
- SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2018. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/SINAN>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- SISPND-RS. Informativo Epidemiológico de Arboviroses Janeiro de 2019. Semana Epidemiológica 50. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20190139/03093955-informativo-epidemiologico-dengue-chik-zika-e-fa-se-52-2018.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2018.
- Schrekker HS, Gelesky MA, Stracke MP, Schrekker mL, Machado G, Teixeira SR et al. 2007. Disclosure of the imidazolium cation coordination and stabilization mode in ionic liquid stabilized gold nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 316:189-195.
- Stone BF, Brown AW. 1969. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. *Bulletin of the World Health Organization, Geneva,* 40:401-408.
- Tay KSR., N.A; Abas MR. 2009. Degradation of DEET by ozonation in aqueous solution. *Chemosphere.*, v. 76,p.1296-302.
- Tilak R, Ray S, Tilak VW, Mukherji S. 2016. Dengue, chikungunya and the missing entity - Zika fever: A new emerging threat. *Med J Armed Forces India.* 72(2):157-63.

- TolleMA. 2009. **Mosquito-borne Diseases**. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care. 39: 97-140.
- Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Mousson L, Vazeille M, Fuchs S, Yébakima A, Gustave J, Girod R, Dusfour I, Leparç-Goffart I, Vanlandingham DL, Huang YJ, Lounibos LP, Mohamed Ali S, Nougairède A, de Lamballerie X, Failloux AB. 2015. Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. PLoS Negl Trop Dis. 9(5):20.
- Weeks JAGPD; Nikiforov AI. 2011. Assessment of the Environmental Fate and Ecotoxicity of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET). Integr Environ Assess and Manag. 8(1):120-134.
- WHO-World Health Organization. 2012. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva.
- Zé-Zé L, Prata MB, Teixeira T, Marques N, Mondragão A, Fernandes R, Saraiva da Cunha J, Alves MJ. 2016. Zika virus infections imported from Brazil to Portugal. ID Cases. 7(4):46-9.

## **CAPÍTULO I - GEORREFERENCIAMENTO DE FOCOS DE *Aedes aegypti* NO MUNICÍPIO DE PASSO FUNDO/RS**

### **RESUMO**

As arboviroses tornaram-se um grande problema de saúde pública nas últimas décadas. *Aedes aegypti* tem sido o vetor de maior propagação dessas doenças. Identificar os principais locais de focos do vetor em um município com o auxílio de ferramentas como o geoprocessamento, o georreferenciamento tem ganhado cada vez mais destaque. Dentre essas ferramentas, a utilização do georreferenciamento, permite realizar o levantamento de dados e a geração de mapas que identifiquem e relacionem os focos a fatores abióticos tem se tornado de fundamental importância para a prevenção e para o controle do mosquito. O objetivo deste estudo é realizar um georreferenciamento de focos de *Ae. aegypti* no município de Passo Fundo/RS. Foram selecionados 20 pontos, utilizando uma Rede Triangular Irregular. Depois, foram distribuídas armadilhas ovitrampa nos pontos amostrados, durante todas as estações dos anos de 2016 e 2017. A partir dos ovos coletados, estabeleceu-se uma colônia de *Ae. aegypti* nativos e os ovos provenientes dessa colônia foram armazenados para ensaios futuros. O levantamento dos focos forneceu informações sobre a distribuição do vetor, relacionando com fatores abióticos como temperatura, precipitação, densidade populacional e relevo. Com o auxílio do georreferenciamento, foram gerados mapas para cada fator de influência na existência dos focos. A maior quantidade de focos ocorreu no outono, com temperatura média de 18°C e 350mm de chuvas, e no verão, com temperatura média de 22°C e 300mm de chuvas, seguidos da primavera e do inverno, quando as temperaturas são mais baixas, 16°C e 17°C respectivamente. Os locais que se destacaram no estudo foram o Bairro Vila Luíza e o Centro. Neles, observou-se um número mais elevado de habitantes e a presença de pouca vegetação. O diagnóstico dos bairros no estudo revelou uma leve diminuição dos focos do ano de 2016 para 2017. Os dados relatados pela vigilância epidemiológica do município conferem com os dados levantados pelo estudo. Existe uma relação entre os diferentes fatores abióticos envolvidos no estudo e a presença de focos do vetor. O georreferenciamento mostra-se uma ferramenta de grande importância para relacionar todos esses possíveis fatores de influência.



**Palavras-chave:** diagnóstico, geoprocessamento, mosquitos.

## GEORREFERENCING OF *Aedes aegypti* FOCUS IN THE MUNICIPALITY OF PASSO FUNDO / RS

### ABSTRACT

Arboviruses have become a major public health problem in the last decades. *Aedes aegypti* has been the vector of the greatest spread of these diseases. Identifying the main vector spot locations within a municipality with the aid of geoprocessing tools has gained increasing prominence. Among these tools, the use of georeferencing by performing data collection and generation of maps that identify and relate these foci to abiotic factors has become of fundamental importance for the prevention and control of the mosquito. The objective of this study was to perform a georeferencing of *Ae. aegypti* in the municipality of Passo Fundo / RS. Twenty points were selected using an Irregular Triangular Network. Afterwards, ovitrampa traps were distributed at the sampling points during all the seasons of the years 2016 and 2017. From the collected eggs a colony of *Ae. aegypti* and the eggs from this colony were stored for future trials. The survey of the outbreaks provided information on the distribution of the vector, relating to abiotic factors such as temperature, precipitation, population density and relief. With the aid of georeferencing, maps were generated for each influence factor in the existence of focus. The highest number of outbreaks was in autumn with average temperature of 18°C and 350 mm of rainfall and summer with average temperature of 22°C and 300 mm of rainfall, followed by spring and winter where temperatures are lower 16° C and 17° C respectively. The neighborhoods that stood out in the study were Vila Luíza and Centro. In these districts a greater number of inhabitants and the presence of little vegetation were observed. The diagnosis of the neighborhoods in the study showed a small decrease in the outbreaks of the year 2016 to 2017. The data reported by the epidemiological surveillance of the municipality match with the data collected by the study. There is a relationship between the different abiotic factors involved in the study and the presence of vector focus. Georeferencing has proved to be a very important tool to relate all these possible factors of influence.

**Keywords:** diagnosis, geoprocessing, mosquitoes.

## 1. INTRODUÇÃO

Por meio de modelos de estudo georreferenciados, podem-se obter diferentes dados e informações sobre saúde/doença. As variáveis, como riscos de patologias quantificadas com o tempo, contribuem para a compreensão epidemiológica de várias doenças hoje existentes (Barbosa, 2014).

O avanço tecnológico ocorrido nas últimas décadas provocou mudanças nas pesquisas científicas e está cada vez mais relacionado com o uso de geotecnologias, dentre elas o geoprocessamento, que engloba Sistema de Informação Geográfica (SIG). A necessidade de levantamento de dados cada vez mais detalhados faz com que o pesquisador tenha que trabalhar com diferentes tecnologias. Na área da saúde, por exemplo, o SIG pode relacionar dados contidos em bancos de dados com diferentes ambientes como florestas, rios, cidades, bairros, etc. As análises obtidas com o uso do SIG podem ser utilizadas para planejar uma pesquisa utilizando pontos específicos. Em uma pesquisa entomológica, é possível determinar locais de criadouros, focos de vetores (Gurgel, 2003).

O SIG pode ser utilizado com base em equipamentos e em programas computacionais que possibilitam a criação de mapas e de gráficos, resultando em uma base cartográfica que facilita a análise dos resultados (geoinformações) coletados (Cavalcante, 2010).

Além disso, pode-se dizer que o geoprocessamento está associado a um conjunto de ferramentas de representação do espaço geográfico. Destacam-se, dentre essas ferramentas, o Global Position System (GPS), ou Sistema de Posicionamento Global, os sistemas Computer Aided Design - Desenho Assistido por Computador (CAD), os Bancos de Dados Geográficos (BDG), além da Cartografia Digital e do Sensoriamento Remoto (Cruz, 1994).

A utilização das técnicas de geoprocessamento para a análise espacial em avaliações epidemiológicas de doenças aumentou nos últimos anos, caracterizando-as como ferramentas importantes na vigilância e no controle. Apresentam como maior vantagem o fato de tratarem o município como um mosaico de várias realidades, que merecem, portanto, abordagens diferenciadas (Cruz, 1994).

Com o rápido avanço dos casos de arboviroses no Brasil, surge, na saúde pública, a necessidade de ferramentas que avaliem, de forma rápida e confiável, possíveis focos e locais que possam contribuir para a criação de *Ae. aegypti*. O geoprocessamento mostra-se um instrumento para o planejamento e a avaliação de programas de controle de arboviroses (Medronho, 1995).

Assim, no presente estudo, faz-se uso do georreferenciamento para identificação de focos de *Ae.aegypti* na cidade de Passo Fundo/RS, avaliando a distribuição da espécie e possíveis fatores abióticos que estejam influenciando a surgimento dos focos.

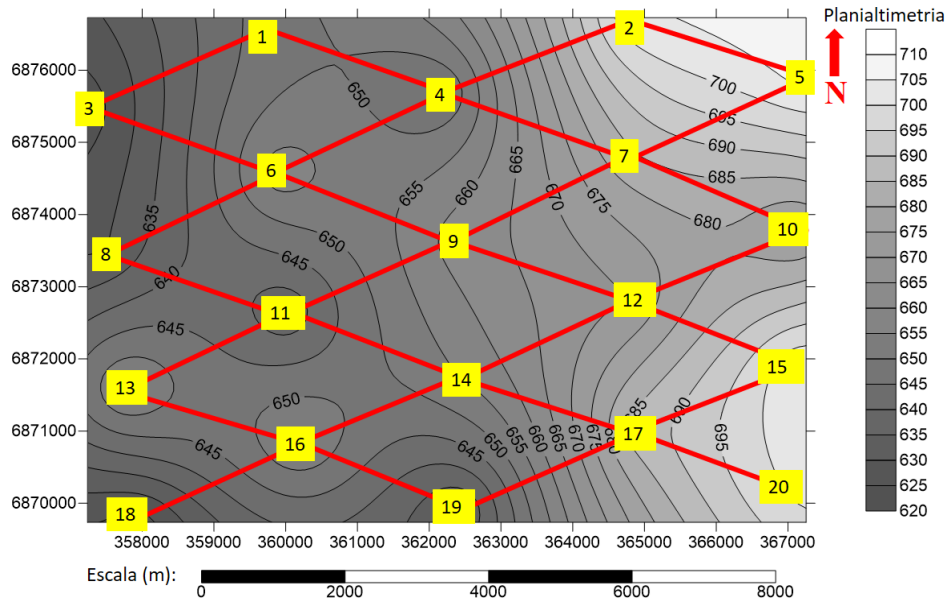
## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Distribuição de armadilhas e coleta de ovos de *Aedes aegypti* nativonativos no município de Passo Fundo/RS**

Para o cálculo amostral, considerou-se o total de 61.754 domicílios na cidade de Passo Fundo (IBGE, 2016), adotado um nível de confiança de 90% e um erro amostral de 15.5%. Para o estudo, foram identificados 20 pontos. Esses locais de amostragem foram distribuídos utilizando-se o Método de Rede Triangular Irregular (TIN) para a definição da localização dos pontos amostrados, considerando-se a distância de cada ponto de 2.500 metros. Segundo Almeida Filho et al. (2016), Piovezan et al. (2017), Jonusaite, Donini e Kelly (2017), essa é a distância que as fêmeas de *Ae. aegypti* costumam percorrer, voando geralmente a menos de 1 metro de altura.

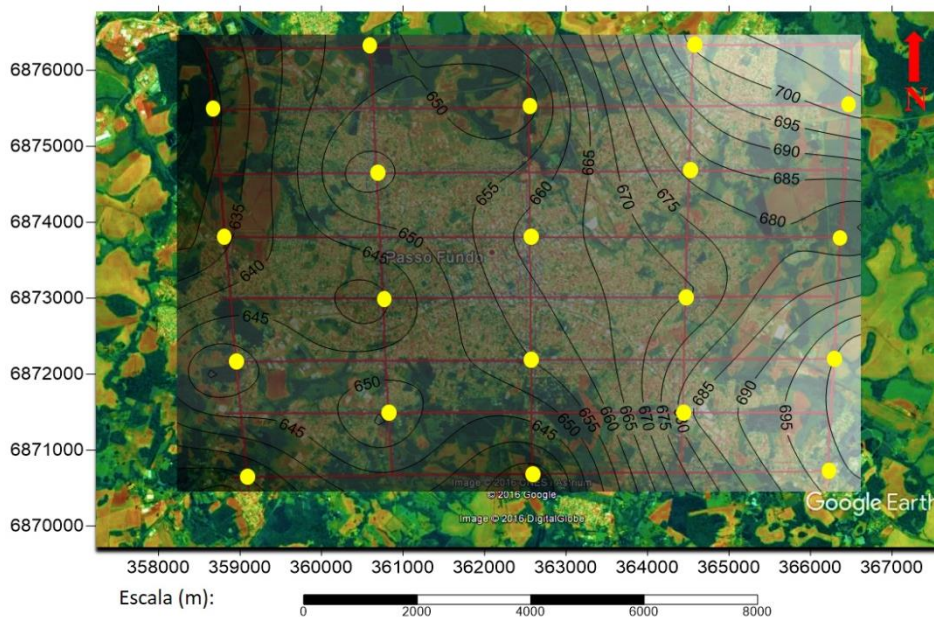
Posteriormente, foram cruzadas cinco linhas, formando assim, a grade para definição da Rede Triangular Irregular (TIN) (Figura 08). A localização precisa dos pontos amostrados (Figura 09) só foi possível com o uso de GPS de Precisão, controlando o erro máximo de até 40cm em cada ponto amostrado. Por meio dessas coordenadas geográficas extraídas a campo, e através do software Surfer 12, utilizando-se das funções “Grid”, “Math” e selecionando o “input grid file A” que consiste no arquivo que contém o mapa com os valores krigados e atribuir ao “input grid file B” “o arquivo que contém o mapa de tendência. Para a função  $C = f(A, B)$  estabelecer  $C = A + B$ ”, e a sobreposição dos resultados planialtimétricos, pelo software Surfer 12, utilizando o comando “Overlay Maps”. Nas Figuras 8e 9 podem

ser visualizadas as localizações dos 20 pontos de coleta de dados (uso de armadilhas), distribuídos, conforme o Método de Rede Triangular Irregular (TIN) na cidade de Passo Fundo/RS.



**Figura 8:** Formação e representação da Rede Triangular Irregular (TIN) no município de Passo Fundo/RS.

Fonte: Autora (2018).



**Figura 9:** Localização dos 20 pontos selecionados para a identificação de focos de *Aedes aegypti* no município de Passo Fundo/RS.

Fonte: Autora (2018).

Para a coleta de ovos dos mosquitos, foram distribuídas armadilhas do tipo ovitrampa durante o ano de 2016 e 2017. O método de ovitrampa é considerado simples, barato e não agride o meio ambiente. É muito seguro para estimar a distribuição espacial do mosquito adulto em determina área. Basicamente, consiste em um recipiente de cor escura, parcialmente preenchido com água. Nele, adere-se um material áspero (pedaço de Eucatex e papel filtro) que permite a fixação dos ovos depositados pelas fêmeas do mosquito (Figura 10). As armadilhas foram instaladas a 80cm do chão, em residências localizadas nos pontos, e deixadas nos locais durante cinco dias. Semanalmente, foram escolhidos cinco pontos para a colocação das armadilhas, até completar 20 pontos dentro do período mensal.



**Figura 10:** Armadilha ovitrampa utilizada para coleta de ovos de *Aedes aegypti*.

Fonte: Autora (2018).

No começo do estudo, os recipientes de captura dos ovos (armadilhas) foram bem recebidos pelos proprietários, com a devida autorização. Mas, no decorrer do estudo, a presença das armadilhas começou a causar certos incômodos, e sua presença fixa começou a ser desautorizada pelos proprietários. A solução para isso foi passar para a residência mais próxima. Segundo Neckel et al. (2017), numa Rede de Triangulação Irregular não é necessário trabalhar com pontos fixos, que podem ser deslocados em até 500 metros, com permanência interna da rede, à medida que o objeto é analisado, não atrapalhando nos resultados de coleta da amostra.

## **2.2 Estabelecimento e manutenção dos mosquitos nativos em laboratório**

Os ovos coletados foram colocados em uma bacia com água e armazenada em uma incubadora (ELETROlab 132FC), a 28°C, 80± 10% UR e fotoperíodo claro/escuro de 12h. As larvas foram alimentadas com ração para filhote de gatos (Purina® CatChow®). A partir desses ovos, foi estabelecida uma colônia de *Ae. aegypti* nativo em abril de 2017, mantida no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os ovos provenientes da colônia estabelecida foram utilizados em trabalhos futuros.

Na colônia, os adultos foram mantidos em gaiolas de criação 30X30X30cm, à temperatura de 25°C e alimentados com uma solução de glicose (10% v/v). Para o desenvolvimento de ovos, as fêmeas de *Ae. aegypti* foram alimentadas com sangue de roedores, fornecido pelo Biotério da UFRGS, por pelo menos dois dias na semana. Copos de plástico pretos contendo papel de filtro foram colocados dentro das gaiolas, para a oviposição das fêmeas.

## **3.RESULTADOS**

### **3.1 Levantamento dos focos de *Ae. aegypti***

Dos 20 pontos estudados, foram encontrados focos de *Ae. aegypti* em seis pontos durante os dois anos do estudo e em todas as estações do ano. Segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Município de Passo Fundo, esses pontos representam os bairros do município onde desde 2015 são encontrados o maior número de focos. Nos dois anos do estudo, o que se destaca é uma pequena diminuição de focos em 2017 em comparação com 2016 (Quadro 01) para o ano de 2017 (Quadro 02). Está quantificado nos Quadros 1 e 2 o número de focos, a média de temperatura e a média pluviométrica por estações do ano nos bairros onde foram encontrados os mosquito. As informações foram disponibilizadas pelo Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC/IMPE), responsável pelo monitoramento do clima no Brasil. Durante o ano de 2016, nas estações de outono, com médias de temperatura de 17°C e 350mm de chuvas e verão com a temperatura média de 24°C e 300mm de chuvas, foi quando se identificou maior

número de focos, tanto no ensaio como pela vigilância epidemiológica. Na primavera e no inverno, observou-se um número menor de focos. Em 2017, o maior número de focos encontrados, tanto na presente pesquisa assim como pela vigilância epidemiológica, também foi no outono e no verão, seguidos pela primavera e pelo inverno.



**Quadro1:** Quantificação do número de focos de *Aedes aegypti* encontrados nos pontos do estudo em comparação ao número de focos encontrados pela Vigilância epidemiológica, identificando a temperatura média e a média pluviométrica nas diferentes estações do ano de 2016

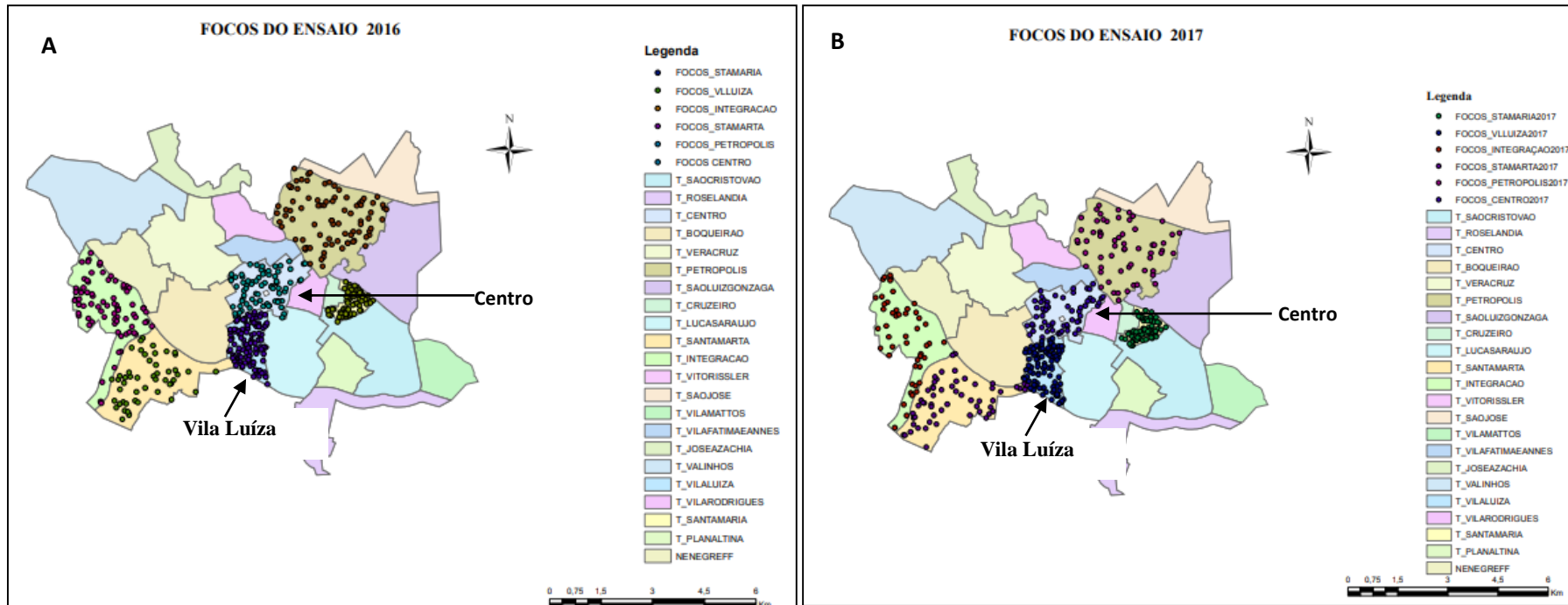
Estação do ano- 2016	Temperatura média	Pluviometria média	Ponto de estudo (Bairro)	Quantidade de focos da Vigilância Epidemiológica	Quantidade de focos do ensaio
Outono	17	350mm	Centro	37	20
Outono	17	350mm	Petrópolis	32	30
Outono	17	350mm	Santa Marta	20	18
Outono	17	350mm	Integração	30	32
Outono	17	350mm	Vila Luíza	40	33
Outono	17	350mm	Santa Maria	30	23
Inverno	15	250mm	Centro	5	4
Inverno	15	250mm	Petrópolis	4	3
Inverno	15	250mm	Santa Marta	2	1
Inverno	15	250mm	Integração	1	1
Inverno	15	250mm	Vila Luíza	2	3
Inverno	15	250mm	Santa Maria	1	0
Primavera	19	400mm	Centro	12	10
Primavera	19	400mm	Petrópolis	15	17
Primavera	19	400mm	Santa Marta	10	9
Primavera	19	400mm	Integração	8	5
Primavera	19	400mm	Vila Luíza	15	11
Primavera	19	400mm	Santa Maria	4	2
Verão	24	300mm	Centro	50	40
Verão	24	300mm	Petrópolis	40	35
Verão	24	300mm	Santa Marta	20	22
Verão	24	300mm	Integração	43	39
Verão	24	300mm	Vila Luíza	100	78
Verão	24	300mm	Santa Maria	57	48

**Quadro2:** Quantificação do número de focos de *Aedes aegypti* encontrados nos pontos do estudo em comparação ao número de focos encontrados pela Vigilância epidemiológica, identificando a temperatura média e a média pluviométrica nas diferentes estações do ano de 2017

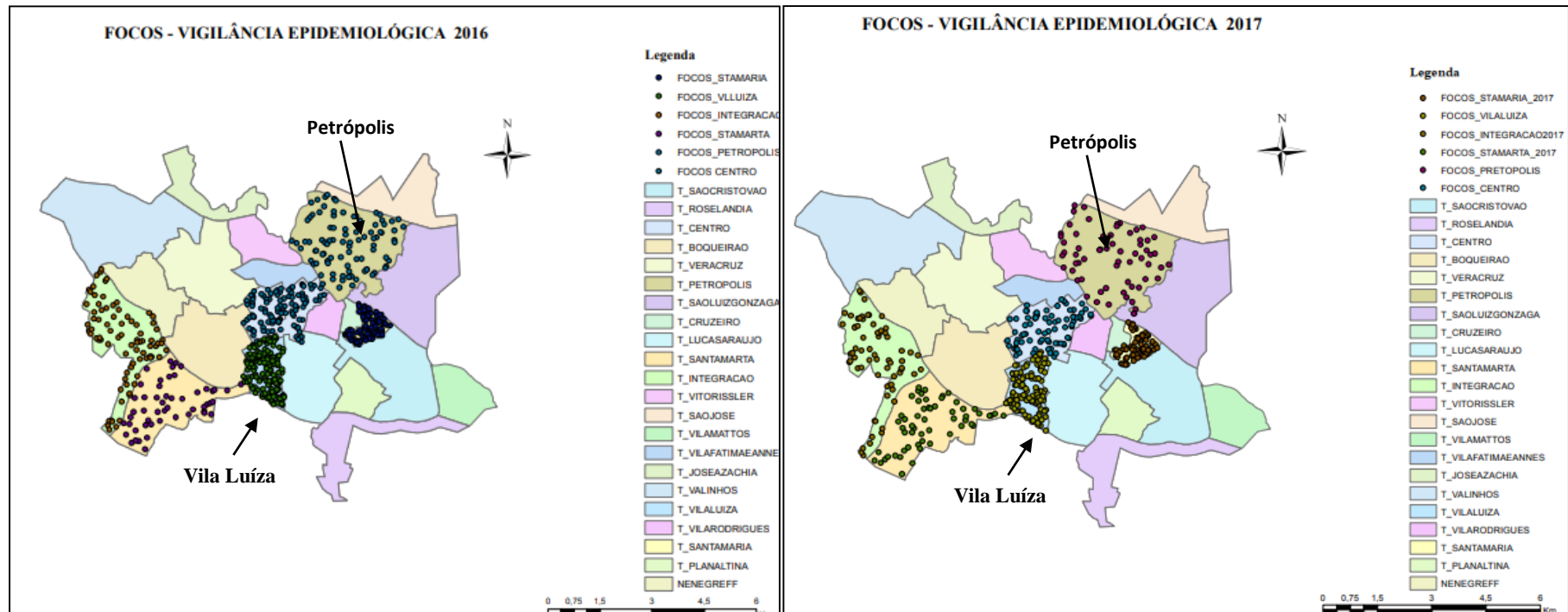
Estação do ano- 2017	Temperatura média	Pluviometria média	Ponto de estudo (Bairro)	Quantidade de focos da Vigilância Epidemiológica	Quantidade de focos do ensaio
Outono	18	350mm	Centro	30	15
Outono	18	350mm	Petrópolis	25	20
Outono	18	350mm	Santa Marta	15	15
Outono	18	350mm	Integração	22	10
Outono	18	350mm	Vila Luíza	23	20
Outono	18	350mm	Santa Maria	15	9
Inverno	16	300mm	Centro	3	2
Inverno	16	300mm	Petrópolis	2	2
Inverno	16	300mm	Santa Marta	3	1
Inverno	16	300mm	Integração	5	1
Inverno	16	300mm	Vila Luíza	1	2
Inverno	16	300mm	Santa Maria	1	0
Primavera	17	250mm	Centro	10	10
Primavera	17	250mm	Petrópolis	12	14
Primavera	17	250mm	Santa Marta	10	11
Primavera	17	250mm	Integração	6	8
Primavera	17	250mm	Vila Luíza	10	10
Primavera	17	250mm	Santa Maria	5	4
Verão	22	300mm	Centro	35	33
Verão	22	300mm	Petrópolis	25	25
Verão	22	300mm	Santa Marta	30	30
Verão	22	300mm	Integração	33	29
Verão	22	300mm	Vila Luíza	78	76
Verão	22	300mm	Santa Maria	55	53

Por meio dos dados coletados, o geoprocessamento gerou, mapas comparativos que representam, entre os anos de 2016 e 2017, os focos de *Ae. aegypti* encontrados nos pontos amostrados. Primeiramente, foi possível identificar a diminuição dos focos do ano de 2016 para o ano de 2017 nos locais em que foram distribuídas as armadilhas e identificados focos do mosquito (Figura 11a). Segundo os dados fornecidos pela vigilância epidemiológica do Município (Figura 11b), houve uma diminuição significativa dos focos do vetor do ano de 2016 para o ano de 2017 em todos os bairros. Os focos estão bem distribuídos dentro de cada bairro, atingindo uma região mais central do município e as áreas adjacentes. O bairro Vila Luíza destacou-se dos demais do estudo pela grande quantidade de focos. No bairro Petrópolis, essa diminuição fica bem evidente (Figura 12). Sendo assim, os dados coletados no estudo estão em conformidade com os dados coletados pela vigilância epidemiológica.

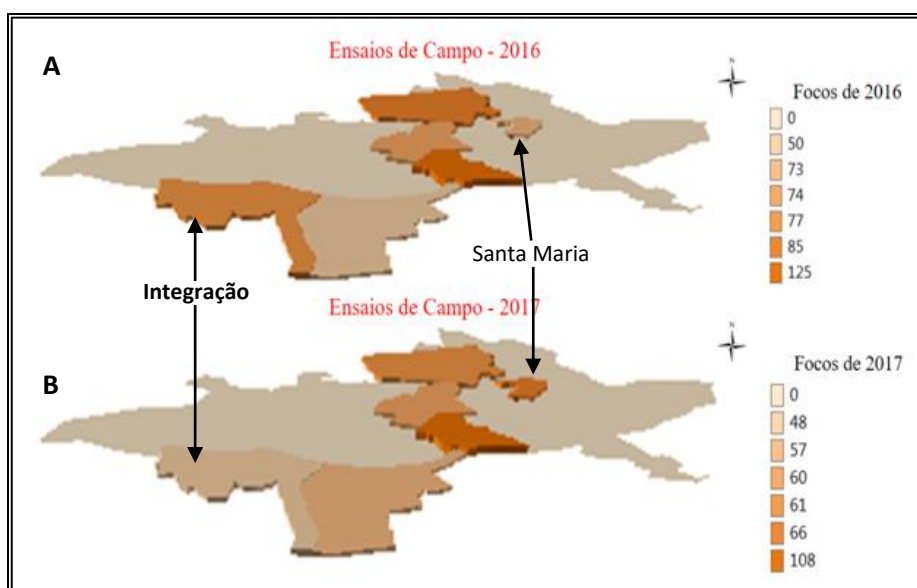
A Figura 13 representa a quantidade total de focos encontrados em cada bairro pelo uso das armadilhas a campo. Sugere-se que esses focos formam um corredor ao longo do Município. O bairro Vila Luíza, embora tenha apresentado uma leve diminuição nos focos do mosquito de 2016 para 2017, ainda se destaca dos demais, chegando a um total de 125 focos em 2016 e 108 em 2017. O bairro Integração teve uma diminuição média de 77 focos em 2016 para 48 em 2017, enquanto o Bairro Santa Maria apresentou um pequeno aumento nos focos de um ano para outro.



**Figura 11:** Mapa de localização dos focos de *Aedes aegypti* em cada um dos bairros selecionados no estudo nos anos de 2016 (A) e 2017 (B). Os pontos representam os focos do vetor.



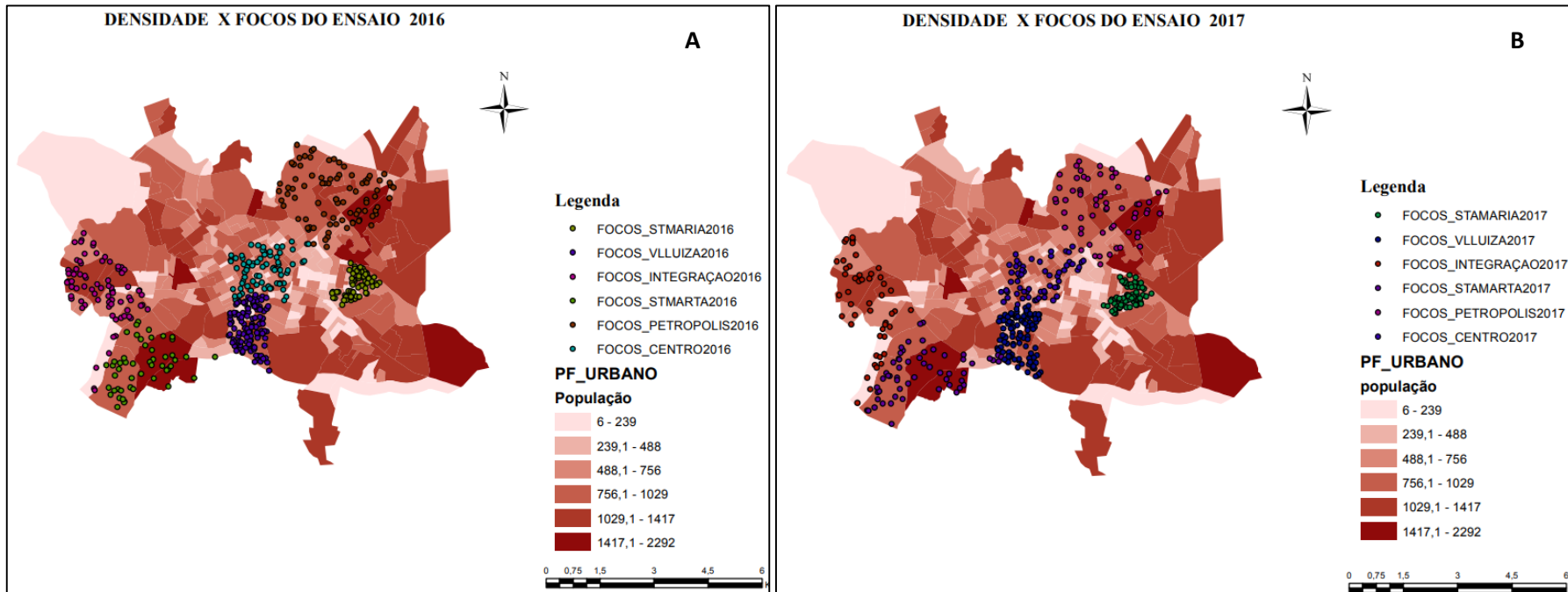
**Figura 12:** Mapa de localização dos focos de *Aedes aegypti* em cada um dos bairros selecionados no estudo nos ano de 2016 (A) e 2017 (B). Os pontos representam os focos do vetor.



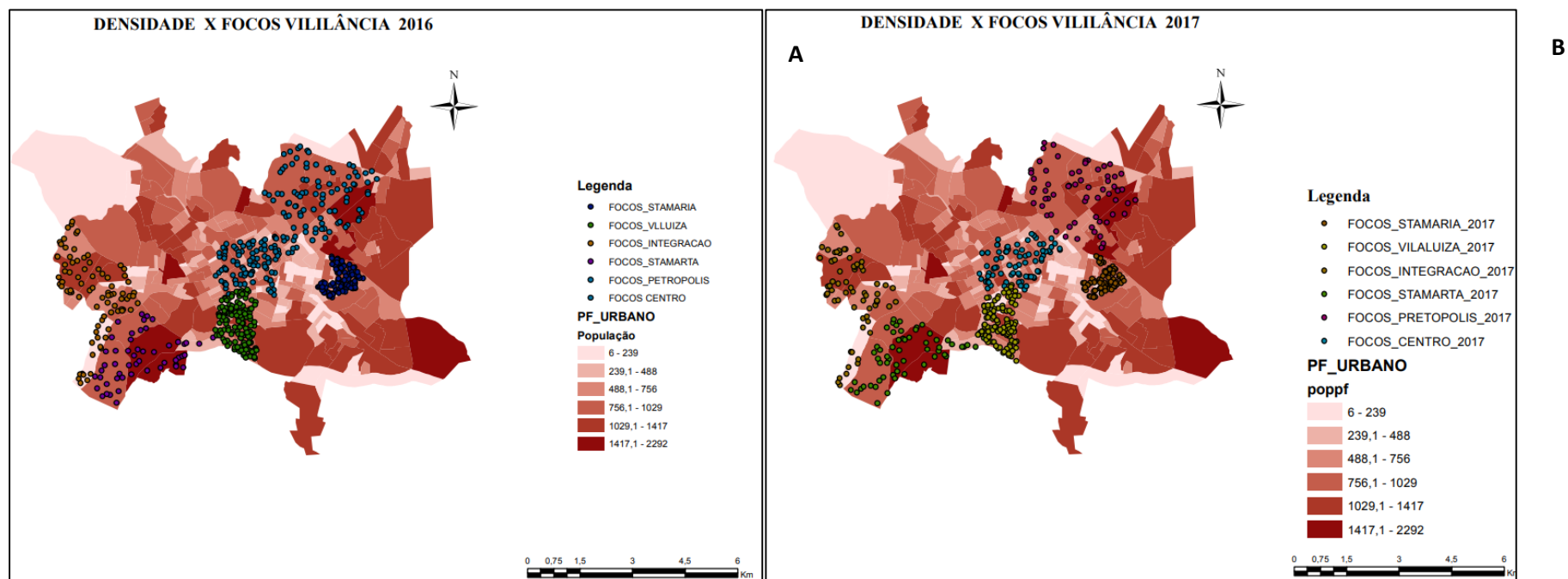
**Figura 13:** Mapa em 3D representando a quantidade total de focos de *Aedes aegypti* encontrados nos anos de 2016 (A) e 2017 (B) nos seis bairros do estudo, no município de Passo Fundo/RS.

Quando comparada a densidade populacional no raio dos pontos demarcados no ano de 2016 (Figura 14) e 2017 (Figura 15), os locais com número mais elevado de focos nos dados coletados a campo e no levantamento realizado pela vigilância epidemiológica são os bairros que apresentam a maior população.

Nesses seis pontos (bairros), a falta de vegetação fica bem evidente, principalmente na região mais central. Mesmo em áreas mais adjacentes, a presença de vegetação é bastante reduzida (Figura 16).

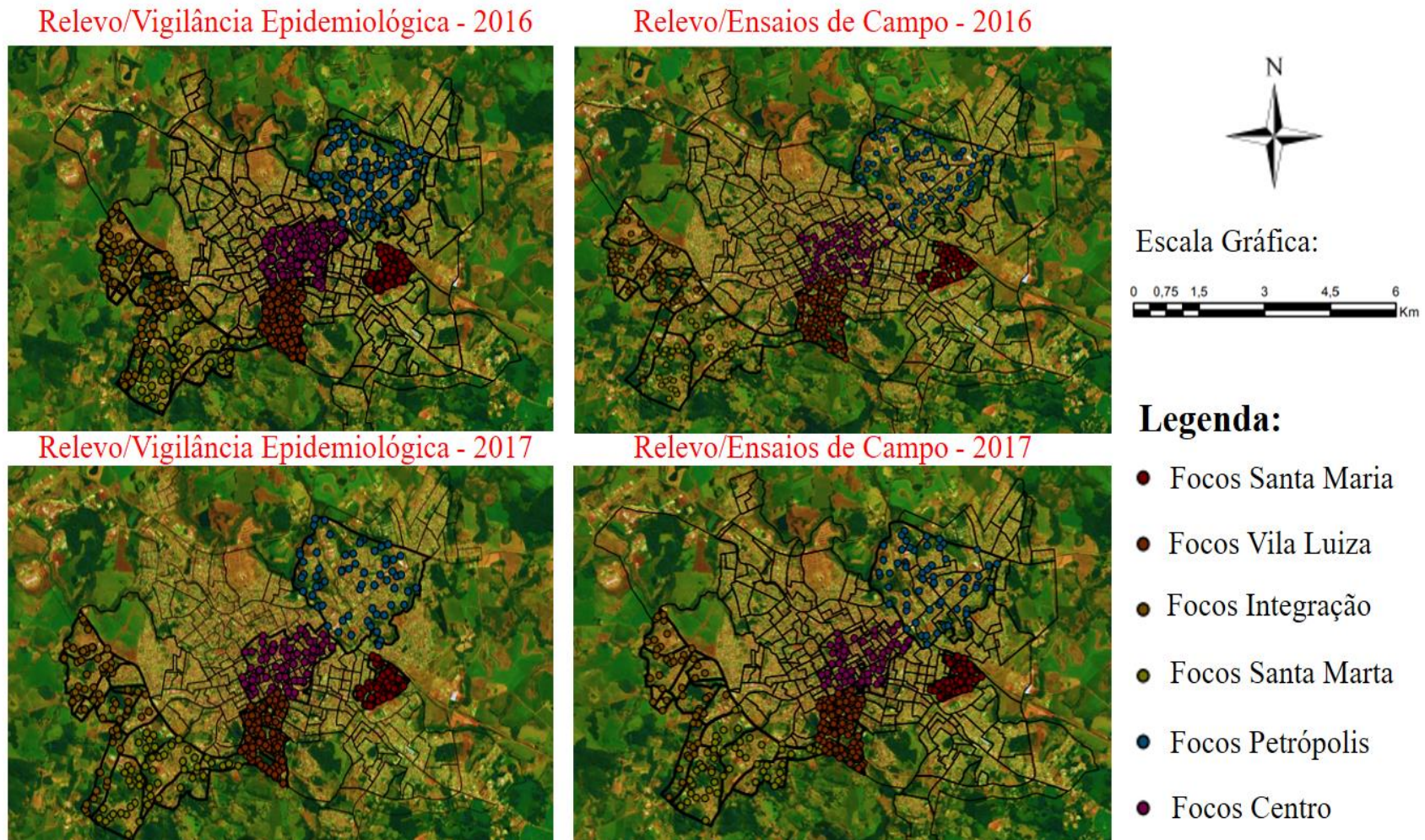


**Figura 14:** Mapa de representação da densidade populacional nos bairros do ensaio a campo onde foram encontrados focos de *Aedes aegypti* em 2016 (A) e 2017(B).



**Figura 15:** Mapa de representação da densidade demográfica nos bairros do ensaio a campo onde foram encontrados focos de *Aedes aegypti* em 2016 (A) e 2017(B).





**Figura 16:** Distribuição no relevo dos focos de *Aedes aegypti* encontrados pela Vigilância epidemiológica e no ensaio de campo nos anos de 2016 e 2017.

#### 4.DISCUSSÃO

As estações do ano do município de Passo Fundo em que se obteve a maior média de chuvas foram a primavera em 2016 e o outono em 2017. Segundo Watts et al. (1987), a incidência de dengue pode ter uma forte associação com as estações chuvosas, assim como as altas temperaturas. A chuva pode ser o fator que mais tem influência no surgimento de focos de *Ae. aegypti*, mas ambos precisam estar associados para que o surgimento de novos focos seja possível. Em países tropicais como a Tailândia e a Indonésia, o pico da ocorrência de casos de dengue hemorrágico coincide com os meses de maior pluviosidade. No entanto, outros fatores podem estar associados, como as diferentes temperaturas (Czuy et al., 2001).

O *Aedes aegypti* tem sua densidade populacional diretamente influenciada pela presença de chuvas, podendo manter uma população considerável durante as estações menos chuvosas, devido aos criadouros semipermanentes (latões, pratos de vasos, pneus etc), mas é durante a estação chuvosa que sua população alcança níveis elevados (Czuy et al., 2001).

Nas estações do ano durante o estudo, a média da temperatura associada às médias de precipitação correlacionam-se, uma vez que o período em que foi encontrado o maior número de focos do vetor foi durante o verão, quando as temperaturas variaram de 22°C a 24°C, com média de precipitação de 300mm. Em São Paulo, observou-se que a temperatura foi o principal fator do processo de infestação de *Ae. aegypti* em várias regiões (Tun-Lin, 1995). Em estudos epidemiológicos realizados no México, a média de temperatura (22°C) durante a estação chuvosa foi quando se encontrou o maior número de focos do vetor. Para *Ae. aegypti*, o aumento da temperatura aumenta as chances de completar seu período de incubação, contribuindo para a presença de ovos no ambiente (Focks & Chadee, 1997).

De acordo com Beserra et al. (2007), temperaturas abaixo de 18°C causam efeitos que impedem o desenvolvimento do vetor e o aparecimento de novos focos. Em nosso estudo, alguns poucos focos foram encontrados no inverno, quando a média de temperaturas não ultrapassou dos 17°C. Glasser (1997)

constatou que quanto menor a temperatura, mais lento é o processo de expansão da espécie.

Outros fatores também estão associados ao surgimento de novos focos. Aspectos como alta densidade populacional, alta densidade habitacional e a urbanização não planejada propiciam as condições para a reprodução do vetor. As regiões onde existem problemas de saneamento básico e a produção de resíduos sem uma destinação correta, também contribuem para o aumento proliferação de focos (Donalísio & Glasser, 2002).

Comparando os dados da vigilância epidemiológica com os dados do estudo em ambos os anos (2016-2017), os números mais elevados de focos ocorreram nos bairros com os maiores índices de habitantes. Na zona urbana de Passo Fundo, a população encontra-se mais densamente concentrada nessa região central, que também é a zona mais populosa da cidade, e compreende mais especificamente o setor do Centro e os setores adjacentes, com o Bairro Vila Luíza, onde foram encontrados os maiores números de focos. Segundo o Plano Municipal de Saneamento Básico de Passo Fundo (PMSB), até 2014 não haviam sido identificados focos de *Ae. aegypti* no município. A densidade populacional desses bairros, somada às condições socioeconômicas e culturais das populações, além de fatores ambientais, interferem no cuidado com o saneamento doméstico. De 2014 até 2018, o número de focos do mosquito só aumentou, contribuindo, assim, para a presença do vetor na região (PMSB, 2014).

Para que o vetor consiga completar seu ciclo, colocar seus ovos, é necessário que um conjunto de fatores abióticos se relacionem: temperatura, precipitação, densidade demográfica, relevo e composição vegetal. Passo Fundo é um município que apresenta uma altitude média de 690 metros. O relevo do Município possui formas onduladas e bastante homogêneas, com colinas suaves, bem arredondadas, conhecidas por coxilhas (PMSB, 2014). As regiões que possuem condições favoráveis ao desenvolvimento do mosquito são aquelas situadas abaixo dos 1000m de altitude (Teixeira, Barreto & Guerra, 1999).

Nos levantamentos a campo, o bairro Vila Luíza e o Centro destacaram-se dos demais pelo número mais elevados de focos. Ambos os locais possuem uma pequena parcela de vegetação. A predominância maior é de construção civil, com concentração de comércio nessas áreas, ocasionando boa perda da vegetação. Os

maiores índices de infestação são registrados em bairros com alta densidade populacional e baixa cobertura vegetal, onde o mosquito encontra alvos para alimentação mais facilmente.

Em Passo Fundo, a Lei Municipal nº 5.173, de 29 de dezembro de 2015, estabelece normas para a prevenção da multiplicação das larvas do mosquito, prevendo multas leves, moderadas e graves aos proprietários e aos moradores de imóveis que não cumprirem com as obrigações de prevenção. Em 2017, foram 18 notificações de irregularidade de moradores que possuíam criadouros potenciais em seus terrenos. Em 2018, foram aplicadas quatro multas.

De acordo com o Levantamento Rápido do Índice de Infestação do *Aedes aegypti* (LIRAA) de 2018, o índice estava em 5,4, o que indicava risco alto para epidemias para o município. Em 2019, até o momento, o índice de Infestação Predial manteve-se em 0,2%, ou seja, a cada 100 casas visitadas, 0,2 casas tem a presença do mosquito, classificando o município em risco baixo para epidemias (PMPF, 2019).

Nos estudos de campo, as armadilhas de oviposição têm sido utilizadas em vários municípios, contribuindo muito para a identificação de ovos e de larvas do mosquito, particularmente em situações com índices de infestação predial. Porém não fornecem informações sobre a distribuição e sobre os tipos de criadouros predominantes (Brito & Forattini, 2004).

Segundo Pesini, Neckel e Rosa (2012), o geoprocessamento conceitua-se como uma ferramenta que utiliza de técnicas matemáticas para representação de objetos, e, portanto, torna-se indispensável, pois possibilita a representação desses tipos de estudo. Os resultados obtidos em pesquisa de campo são mais representativos com mapas que apresentam as variações dos resultados na área de estudo. Este estudo pode, por meio do geoprocessamento, relacionar os bairros onde foram encontrados focos de mosquito com os mais diversos fatores como chuvas, temperaturas, etc que podem estar associados para a proliferação do vetor.

## 5. CONCLUSÕES

- I. Nos seis bairros selecionados no estudo, todos apresentaram focos de *Ae. aegypti*. Uma diminuição no número de focos foi observada do ano de 2016 para o ano de 2017 em todos os bairros;
- II. O Bairro Vila Luíza e o Centro da cidade foram os que mais se destacaram na quantidade de focos durante os dois anos do estudo;
- III. Fatores abióticos: temperatura, precipitação, densidade populacional e relevo influenciaram no surgimento dos focos no município;
- IV. O georreferenciamento mostrou-se uma ferramenta de grande importância para o levantamento dos dados.

## REFERÊNCIAS

- Almeida Filho, Luiz CP, Souza T, Tabosa PMS, Soares NG. 2016. Trypsin inhibitor from *Leucaenaleucocephala* seeds delays and disrupts the development of *Aedes aegypti*, a multiple-disease vector. **Pest Management Science**. 73(1):181-187.
- Barbosa GL.2014. **Distribuição Espacial dos Indicadores Entomológicos de *Aedes Aegypti* e associação com a ocorrência de casos de Dengue em Município de Médio Porte do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva). Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.
- Beserra EB, Castro Jr FP, Santos JW, Santos TS, Fernandes CRM. 2007. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, Londrina, PR, v. 35, n. 6, p. 853-860.
- Brito M., Forattini OP. 2004. Produtividade de criadouros de *Ae. albopictus* no Vale do Paraíba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 38:209-15.
- Cavalcante MPR. 2010. **Distribuição espacial da dengue nas áreas urbanas e peri urbanas de Palmas de 2008-2010, Segundo Ótica Geomédica**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Brasília.
- Cruz CBM.1994. **Modelagem de Entidades Urbanas e Aplicação em Sistemas de Informações Geográficas**. Dissertação (Mestrado) IME- Rio de Janeiro.
- Czuy DC, Baldo MC, Martins MLO, Nery JT. 2001. A incidência do *Aedes aegypti* no município de Maringá associados às condições climáticas. In: Congresso

Brasileiro de Biometeorologia, 3. 2001, Maringá, PR. Anais. Maringá, PR: Sociedade Brasileira de Biometeorologia.

Donalísio MR, Glasser CM. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 5:259-279.

Focks DA, Chadee DD. 1997. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Ae. aegypti*: an example using data from Trinidad. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 56:159-67.

Glasser CM. 1997. **Estudo da infecção do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***. São Paulo, SP, Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), USP, Faculdade de Saúde Pública. 93 p.

Gurgel HC. 2003. **A utilização das geotecnologias em estudos epidemiológicos: o exemplo da relação entre a malária e o NDVI em Roraima**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (SBSR), 11. Belo Horizonte. Anais.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2003. **Censo demográfico 2000: Metodologia do Censo demográfico 2000. Série relatórios metodológicos**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, volume 25.

Jonusaite S, Donini A, Kelly SP. 2017. Salinity alters snakeskin and mesh transcript abundance and permeability in midgut and Malpighian tubules of larval mosquito, *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. 205:58-67.

Medronho RA. 1995. **Geoprocessamento em Saúde: Uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/CICT/NECT. 135p.

Neckel A, Costa C, Mario DN, Sabadin CES, Bodah, ET. Environmental damage and public health threat caused by cemeteries: a proposal of ideal cemeteries for the growing urban sprawl. **Urbe. Revista Brasileira de Gestão Urbana**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.216-230, 13 fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2175-3369.009.002.ao05>.

Pesini F, Neckel A, Rosa DPD. 2012. **Aplicabilidade do geoprocessamento: um estudo de caso em dois loteamentos populares da cidade de Ilópolis-RS**. In: Workshop de Geoprocessamento do Planalto Médio, Universidade de Passo Fundo. Anais. Passo Fundo: ICG. p. 1-3.

Piovezan R, Acorinthe JPO, Souza JHT, Visockas A, Azevedo TS, Zuben CJ. 2017. Spatial distribution of Culicidae (Diptera) larvae, and its implications for Public Health, in five areas of the Atlantic Forest biome, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. 1:1-13.

Plano Municipal de Saneamento básico de Passo Fundo (PMSB). 2014. Prefeitura municipal de Passo Fundo. Disponível em: <<http://www.pmpf.rs.gov.br/servicos/geral/multimidia/PMSB-RELATORIO-SINTESE.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

- Prefeitura Municipal de Passo Fundo (PMPF). 2019. Disponível em<<http://www.pmpf.rs.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2019.
- Teixeira GM, Barreto LB, Guerra Z. 1999. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do SUS 8:5-33.
- Tun-Lin W, Kay BH, Barnes A. 1995. Understanding productivity, a key to *Ae. aegypti* surveillance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 53:595-601.
- Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. 1987. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 36(1):143-52.



## CAPÍTULO II - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS SOBRE *Aedes aegypti*

### RESUMO

*Aedes aegypti* é o principal transmissor de várias arboviroses em todo o mundo, sendo as principais dengue, febre amarela, zika e chikungunya. Um aumento considerável de casos tem ocorrido principalmente pela dificuldade de controle dessa espécie de mosquito e de várias populações terem-se tornado resistentes aos inseticidas químicos mais utilizados. Assim, o estudo de novos compostos é fundamental para ampliar o controle desse vetor. Neste trabalho, o potencial de seis sais imidazólicos candidatos a larvicidas foi avaliado em *Ae. aegypti* nativos e Rockefeller. Foram feitos testes laboratoriais de suscetibilidade em larvas expostas por até 48 horas, em 10 diferentes concentrações. Além disso, verificou-se a persistência residual dos sais em condições líquidas e secas, bem como a influência de diferentes temperaturas (15, 25, 30 e 40°C) e de luz ultravioleta na sua eficácia. Os sais apresentaram diferentes graus de toxicidade. Desses, C<sub>16</sub>MImMes e C<sub>18</sub>MImCl foram os mais tóxicos, em concentrações muito baixas (10-20µg/L), causando mortalidade em 100% das larvas em até 48 horas. Em meio aquoso, apresentaram ação residual por até quatorze dias. Em condições ambientais, permaneceram tóxicos por até 12 meses em condições de armazenamento. Nas temperaturas de 30 e 40°C, os sais foram mais tóxicos para as larvas, em comparação a condições sob temperaturas mais baixas (15 e 25°C). Não houve diferença significativa entre a mortalidade das larvas coletadas no campo com relação àquelas de laboratório, em todos os testes realizados. Quando expostas a uma dose subletal LC<sub>20</sub> em diferentes estádios, as larvas em 1º e 2º instares não se desenvolveram, pois, após três dias, estavam todas mortas. As larvas de 3º instar desenvolveram-se até atingirem o estágio de pupa, mas não sobreviveram até a fase adulta. Nenhuma larva chegou ao quarto estágio. Esses resultados indicam que, além de larvicida, os sais servem como inibidores de crescimento. Nas condições em que foram feitos os bioensaios, a luz ultravioleta não interferiu na qualidade do sal, por pelo menos 24 horas de exposição. É possível que quando testados em ambiente natural, a resposta seja a mesma, indicando que os sais podem ser totalmente utilizados a campo. Os sais imidazólicos, nas condições em



que foram testados, são muito eficientes para o controle de larvas de *Ae. aegypti*, e apresentam, portanto, grande potencial para o desenvolvimento de inseticidas.

**Palavras-chave:** efeito residual, inibidor de crescimento, inseticida, temperatura.

## **EFFECT OF IMIDAZOLE SALTS ABOUT *Aedes aegypti***

### **ABSTRACT**

*Aedes aegypti* is the main transmitter of several Arboviruses in the world, being the main dengue fever, yellow fever, chikungunya and zika. The increase in outbreaks worldwide has happened mainly because of the difficulty of control of this species and mosquito populations have become resistant to most chemical insecticides used. Thus, the study of new compounds is essential to extend this control vector. In this thesis, the six potential imidazole salts candidates to larvicides were evaluated against *Ae. aegypti* wild and Rockefeller strain. Laboratory tests were conducted and susceptibility in larvae was made by exposing them for up to 48 hours, in 10 different concentrations. In addition, the residual effect of salts in liquid and dry conditions, as well as the influence of different temperatures (15, 25, 30 and 40 °C) and ultraviolet light on the effectiveness of those salts. The salts tested against *Ae. aegypti*, showed varying degrees of toxicity. The C<sub>16</sub>MImMes and C<sub>18</sub>MImCl were the most toxic in very low concentrations (10-20 µg/L), causing 100% mortality of the larvae within 48 hours. In aqueous solution the salts showed residual action for up to fourteen days. In laboratory conditions remained toxic to 12 months when in storage conditions. At temperatures ranging from 35-40degrees °C, the salts were more toxic to the larvae, than at lower temperatures (15 and 25 °C). There was no significant difference between the mortality of larvae collected in the field in relation to the laboratory, during all tests conducted until here. When different instars of larvae were exposed to a sublethal dose LC<sub>20</sub>, the larvae in stages 1 and 2 did not develop, and after three days, they were all dead. The third instar larvae develop until they reach the pupa stage, but did not survive to adulthood. No larvae reached the fourth stage. These results indicate that, in addition to larvicidal, the salts seem to serve as a growth inhibitor. Under the conditions in which the bioassays were made, the ultraviolet light

didn't seem to interfere with the quality of the salt, for at least 24 hours of exposure. Maybe when tested in natural environment, the results could be the same, indicating that the salts can be fully used in the field. Imidazole salts, in accordance with the conditions which have been tested, are very effective for the control of larvae of *Ae. aegypti*, and feature, therefore, great potential for the development of insecticides in the future.

**Keywords:** growth inhibitor, insecticides, residual effect, temperature.

## 1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é um importante vetor de arboviroses no mundo, como dengue, chikungunya, zika e febre amarela urbana (Powell & Tabachnick, 2013). A busca pela erradicação dessas doenças baseia-se nas formas de controle do vetor. A Organização Mundial de Saúde indica que sejam usados diversos métodos (biológicos e mecânicos) em conjunto para o controle eficaz do mosquito, porém os mais utilizados são os inseticidas químicos. Quando se trata de controle de vetores, a utilização de apenas uma estratégia não garante a total remoção do agente. É importante que se encontre uma combinação de diferentes alternativas que se enquadrem com a realidade local (WHO, 2012).

O controle de *Ae. aegypti* pode ser realizado de três formas: mecânica, que visa à vigilância e o manejo ambiental, por meio da eliminação do vetor, seus focos e criadouros artificiais; biológica, com o uso de predadores, parasitas e organismos patogênicos para o controle populacional; e química, nas formas de repelentes e inseticidas para o controle das formas larvais e adultas. No entanto, a forma de controle que mais vem sendo utilizada ao longo dos anos é a química. Dos vários inseticidas existentes, a OMS recomenda a utilização de quatro classes principais: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides. Esses compostos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos, levando-os à morte (Braga & Valle, 2007).

No Brasil, há muitos anos vêm-se estudando as consequências do uso exagerado desses compostos, pois um dos grandes fatores que levam à dificuldade de controle dessa espécie de mosquito é o surgimento de populações resistentes a inseticidas químicos. Dos inseticidas, o mais utilizado é o Temefós. Relatos sobre resistência de *Ae. aegypti* a esse organofosforado têm sido descritos em Goiás (Macoris et al., 1995), Manaus (Pinheiro & Tadei, 2002), São Paulo (Macoris et al., 2003), Rio de Janeiro e Espírito Santo (Lima et al., 2003), Brasília (Carvalho et al., 2004), Curitiba (Duque et al., 2004), Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas (Braga et al., 2004), Ceará (Lima et al., 2006), Paraíba (Beserra et al., 2007), além de outras regiões no país (Montella et al., 2007). Em uma pesquisa realizada entre os anos de 2010 e 2011, mosquitos nos estados de Rondônia, Paraná e Santa Catarina apresentaram resistência ao organofosforado Temefós (Chediak et al.,

2016). Recentemente, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) realizou um levantamento entre alguns estados brasileiros para identificar locais onde já se registram um avanço dessa resistência. O efeito residual é outro aspecto que deve ser avaliado para qualquer inseticida ou larvicida. Essa avaliação consiste em medir diariamente a mortalidade larval durante determinado período de tempo e que seja mais longo do que os testes de toxicidade (Pontes et al., 2005). A variação de efeito residual pode ocorrer devido à formulação, bem como a forma como o composto é aplicado. O efeito residual é considerado um ótimo indicador dos ciclos de tratamento no controle dos insetos (Garcia Neto, 2011).

Devido à ampla distribuição de *Ae. aegypti* mundialmente e ao conhecimento de que várias populações são resistentes aos inseticidas mais utilizados, é necessário que estudos voltados a outros produtos sejam conduzidos. Nesse sentido, sais imidazólicos podem ser usados no controle de focos de mosquitos, uma vez que vários desses sais têm sido amplamente estudados com os mais variados objetivos industriais e farmacêuticos, por apresentarem características químicas importantes, como estabilidade e não volatilidade (Schrekker et al., 2007; Donato et al., 2010).

O Imidazol é um composto orgânico aromático heterocíclico que possui estrutura de anel similar, mas que pode apresentar vários substituintes. A estrutura do imidazol é formada por anel de cinco membros, e é solúvel em água e outros solventes. É classificado como aromático devido à presença de um sexteto de ligações. Pode ser sintetizado por meio de diversos métodos que são classificados de acordo com a forma e o número de ligações que são feitas para formar o anel imidazólico (Schrekker et al., 2007; Donato et al., 2010).

Sais de imidazol são formados por protonação ou substituição no nitrogênio do imidazol. Os sais imidazólicos (SI) são derivados iônicos do imidazol (Borowieck et al., 2013). Possuem um ponto de fusão de  $\leq 100^{\circ}\text{C}$  são classificados como líquidos iônicos. As propriedades físico-químicas dos SI incluem alta estabilidade térmica, ampla faixa de temperatura do líquido, ampla janela eletroquímica, alta condutividade e mobilidade iônica, fácil reciclagem e ajustável solubilidade, com uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Essas características permitem o desenvolvimento de uma ampla variedade de

aplicações inovadoras. Sua toxicidade depende basicamente de sua estrutura (Schrekker et al., 2007; Donato et al., 2010).

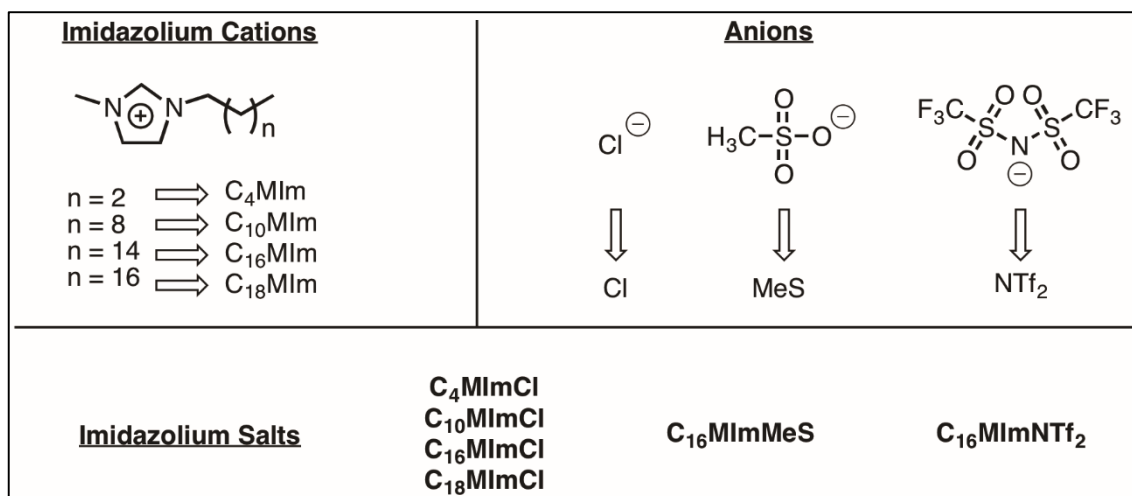
Atualmente, várias atividades biológicas e aplicações de sais imidazólicos têm sido identificadas, como antimicrobiana (Riduan& Zhang, 2013; Pendleton&Gilmore, 2015; Smiglak et al., 2014), antifúngica (Smiglak et al., 2014; Liu et al., 2013; McCann et al., 2013), antitumor (Riduan& Zhang, 2013), antioxidante (Riduan& Zhang, 2013), antifibrosa (Riduan& Zhang, 2013), bioengenharia (liberação droga/gene ou biosensores) (Riduan&Zhang, 2013; Pendleton&Gilmore, 2015; Smiglak et al., 2014), anti-inflamatória, dentre outras (Fang et al., 2010).

Neste trabalho, o potencial de sais imidazólicos como possíveis larvicidas foi avaliado em *Ae. aegypti* de referência Rockefeller e nativoNativo. Foram feitos testes laboratoriais de suscetibilidade e de influência no desenvolvimento dos mosquitos. Além disso, verificou-se a persistência residual e a influência da temperatura e de luz ultravioleta na eficácia dos sais e possíveis danos histopatológicos em larvas a eles expostas.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Triagem de sais imidazólicos com atividade larvicida**

A atividade larvicida de seis sais imidazólicos (SI)(Figura 17) foi avaliada após 24 e 48h, determinando a mortalidade larval. Concentrações iniciais de SI de 0,512, 1,024, e 5,20 µg/L foram utilizados para testar a toxicidade em larvas. Como nenhuma concentração de referência estava disponível, as doses testadas inicialmente nos bioensaios foram baseadas nos valores de MIC<sub>50</sub> (concentração mínima inibitória) relatados para estes sais contra dermatofitos resistentes a múltiplos fármacos (Dalla Lana, 2015). Esses bioensaios foram realizados com quatro repetições de 25 larvas saudáveis (3 grupos testados de larvas Rockefeller + grupo de controle). Após a determinação da toxicidade dos SI, os que causaram mortalidade larval superior a 80% após 48 horas de exposição foram selecionados para estudos futuros. Como não foi possível atingir mortalidades superiores a 90% com as concentrações inicialmente testadas, foram aplicadas doses mais elevadas para atingir 99% da mortalidade.



**Figura 17:** Sais utilizados no estudo: MIm = metilimidazolium cation; Cl = chloride anion; MeS = methanesulfonate anion; NTf<sub>2</sub> = bis(trifluoromethane)sulfonimide.

O cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio (C<sub>16</sub>MImCl) e o cloreto de 1-*n*-octadecil-3-metilimidazólio (C<sub>18</sub>MImCl) foram adquiridos de CJC CHINA JIE CHEMICAL; Cloreto de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (C<sub>4</sub>MImCl) e cloreto de 1-*n*-deciolo-3-metilimidazólio (C<sub>10</sub>MImCl) foram adquiridos na Sigma-Aldrich; e metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio (C<sub>16</sub>MImMeS) e bis (trifluorometilsulfonil) imida de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio (C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub>) foram sintetizados de acordo com um procedimento previamente relatado e os dados espectrais estavam de acordo com os publicados (Schrekker et al., 2007; Cassol et al., 2010). Antes da utilização, os SI foram secos sob vácuo durante 5h a 60°C para remover a água residual. A solubilidade em água dos SI C<sub>16</sub>MImCl (86,2 mg / mL), C<sub>18</sub>MImCl (43,2 mg/mL), C<sub>16</sub>MImMeS (137,8 mg/mL) e C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub> (<1,92 mg/mL) foi determinada pela adição de água a uma massa conhecida de SI a 20-22°C, até a dissolução completa.

## 2.2 Atividade Toxicidade dos sais imidazólicos selecionados sobre larvas de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller e Nativos

Para os bioensaios, foram avaliadas 10 diferentes concentrações de cada SI. Os sais foram colocados separadamente em tubos do tipo Eppendorf de 2 mL e diluídos em 1 mL de água destilada, formando assim a solução principal de cada correspondente: C<sub>16</sub>MImMeS (60,0 µg/mL) e C<sub>18</sub>MImCl (187.0 µg/mL). Das principais

soluções, duas alíquotas foram retiradas: 266.67 µl e 85.56 µl, respectivamente. Essas alíquotas foram adicionadas a 800 mL de água filtrada para formar a primeira diluição, correspondente a 1 (20,0 µg/L). Diluições em série resultaram em 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0.312 µg/L), 8 (0.156 µg/L), 9 (0.078 µg/L) e 10 (0.039 µg/L).

Estes bioensaios foram realizados em triplicata, com quatro repetições (3 grupos testados de larvas + 1 grupo-controle), e para cada concentração utilizaram-se 300 larvas saudáveis entre as 3ª ou 4ª instares da linhagem Rockefeller e de mosquitos nativos (obtidas de coletas de georreferenciamento em Passo Fundo-RS). Todos os experimentos foram conduzidos em câmara germinadora climatizada BOD (Tecnal TE-401) a 28°C, com fotoperíodo claro/escuro de 12h. A mortalidade larval foi analisada após 24 e 48 horas. As larvas foram consideradas como mortas, quando não responderam a estímulos mecânicos. Todos os bioensaios foram baseados no protocolo da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981). Larvas testadas e usadas como controles foram fotografadas em um estereomicroscópio Meije EMZ13TR para análise de possíveis danos macroscópicos

### **2.3 Persistência residual e estabilidade química dos sais**

Para avaliar a persistência residual da atividade larvicida de ambos os sais, utilizaram-se 500 mL de uma solução aquosa de 20,0 µg/L de SI correspondente a dose letal LC<sub>99</sub>. Foram utilizadas larvas da linhagem Rockefeller, sendo cem (100) por réplica. Os experimentos foram realizados em triplicata, juntamente com um grupo de controle.

A mortalidade larval foi avaliada diariamente e todas as larvas, vivas ou mortas, foram descartadas após a observação. Em seguida, as soluções foram filtradas em rede fina, para remover resíduos de larvas. Após, 100 larvas saudáveis novas foram adicionadas em cada réplica. Esse processo foi repetido diariamente até que não houvesse mais mortalidade larval. O mesmo procedimento foi realizado com um grupo-controle, expondo-se as larvas apenas à água filtrada.

Para verificar a estabilidade química e a evaporação dos SI, 100 mL de uma solução 20,0 µg/L de cada um dos sais C<sub>18</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MimMeS foram transferidos para uma quantidade grande de copos plásticos. Esses copos foram

deixados em temperatura ambiente (20-25°C) e à luz ambiente, permitindo que a água evaporasse ao longo do armazenamento. Assim, os copos contendo o sal foram sendo usados mensalmente, até o período de um ano. Três copos contendo a quantidade mencionada de cada sal foram preenchidos com 100 mL de água filtrada e 25 larvas foram adicionadas. Outro copo com água filtrada e 25 larvas foi usado como controle. As larvas foram deixadas com a solução à temperatura ambiente (20-25°C) e a mortalidade larval foi avaliada após 24 e 48h.

#### **2.4 Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas em diferentes temperaturas**

Para avaliar o efeito tóxico dos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MImMeS em diferentes temperaturas, foram selecionadas larvas da linhagem Rockefeller e larvas nativas. Quatro temperaturas diferentes foram selecionadas para o ensaio (15°C, 20°C, 35°C, 40°C). Foram realizadas quatro repetições, cada uma com três réplicas e um grupo-controle negativo contendo somente água filtrada e um grupo-controle positivo exposto ao Temefós. Vinte e cinco larvas (25) foram adicionadas a cada copo plástico contendo 100 ml de água filtrada e 20µg/L da concentração de cada sal. Os ensaios foram realizados em sequência, iniciando aos 15°C e finalizando aos 40°C. As repetições foram mantidas em BOD com fotoperíodo claro/escuro de 12h. A mortalidade larval foi analisada após 24 e 48 horas.

#### **2.5 Avaliação do desenvolvimento larval em doses subletal LC<sub>20</sub>**

Para a avaliação do seu desenvolvimento, as larvas foram divididas em grupos por instares larvais (1<sup>o</sup> instar, 2<sup>o</sup> instar, 3<sup>o</sup> instar), em que foram realizadas triplicatas + grupo-controle (contendo água filtrada). Foram utilizadas 200 larvas da linhagem Rockefeller para cada grupo, sendo 25 para cada copo contendo a solução e 25 para o copo controle. As larvas foram expostas a uma solução de 4µg/L referente à dose subletal (LC<sub>20</sub>). O seu desenvolvimento foi acompanhado diariamente por um período de até cinco dias. Nesse período, foi fornecido alimento para o grupo exposto e para o grupo-controle. Foi realizada uma contagem diária



observando quantidade de larvas vivas, quantidade de larvas mortas e quantidade de pupas e adultos.

## **2.6 Interferência de luz ultravioleta sobre os sais imidazólicos e o efeito sobre larvas de *Ae. aegypti***

Com o objetivo de verificar se a luz ultravioleta causaria alguma alteração na ação dos sais imidazólicos e, conseqüentemente, efeito nas larvas de *Ae. aegypti*, foram feitos três grupos em triplicatas com 25 larvas da linhagem Rockefeller onde foram adicionadas 20 µg/L da concentração de cada sal aos copos plásticos que continham 100 ml de água filtrada. Como grupo-controle, 25 larvas foram adicionadas a copos contendo somente água filtrada. Os três grupos de triplicatas e controle foram armazenados em Capela de Fluxo Laminar + UV (MA 1550) por três diferentes períodos: 6 horas, 12 horas e 24 horas. Em seguida, foram analisados os índices de mortalidade larval para ambos os sais C<sub>18</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MImMeS.

O efeito dos sais em condições de luz ultravioleta na mortalidade de larvas foi determinado por análise de variância (Anova), usando o programa BioEstat, versão 5.0, e o programa GraphPad. Diferenças entre os valores médios foram determinadas pelo teste de Tukey a nível de significância de P < 0,05.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 Sais imidazólicos com potencial larvicida para *Aedes aegypti***

Inicialmente, o potencial larvicida de seis sais foi testado contra *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller e os resultados estão resumidos na Tabela 1. Considerando as três concentrações testadas, dois sais, C<sub>18</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MImMeS, mostraram os melhores níveis de atividade, com porcentagens de mortalidade das larvas superiores a 70% após 48h usando uma concentração de 5,12 µg/L. A letalidade de C<sub>18</sub>MImCl e de C<sub>16</sub>MImMeS foi 50% de 1,024 µg/L e 40% em 0.512 µg/L, respectivamente.

**Tabela 1:** Efeito de seis sais imidazólicos na mortalidade larval de *Aedes aegypti* após 24 e 48 horas.

SI	Concentração de Sal Imidazólico ( $\mu\text{g/L}$ )					
	5.120		1.024		0.512	
	Mortalidade larval (%) de <i>Aedes aegypti</i> após					
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>C<sub>4</sub>MImCl</b>	40	00	00	00	00	00
<b>C<sub>10</sub>MImCl</b>	40	60	00	00	00	10
<b>C<sub>16</sub>MImCl</b>	30	50	20	50	10	20
<b>C<sub>18</sub>MImCl</b>	70	90	20	50	10	30
<b>C<sub>16</sub>MImMeS</b>	80	90	70	70	30	40
<b>C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub></b>	0	00	00	00	00	00

### 3.2 Atividade dos sais imidazólicos selecionados sobre larvas de *Ae. aegypti*

A atividade toxicidade dos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl e C<sub>16</sub>MImMeS foi testada em 10 concentrações na faixa de 20,0-0.039  $\mu\text{g/L}$ , em que um total de 3.300 larvas da linhagem Rockefeller (Tabela 2) e 3.300 larvas nativonativos (Tabela 3) foram utilizadas para cada SI. Em geral, a mortalidade larval foi reduzindo conforme a concentração dos sais foi decrescendo. Para as três maiores concentrações de SI, a toxicidade do C<sub>18</sub>MImCl foi menor do que C<sub>16</sub>MImMeS após 24h. Após 48h de exposição das larvas aos SI, níveis de toxicidade semelhantes foram obtidos com essas concentrações, mostrando porcentagens de mortalidade de  $\geq 80\%$  tanto para a linhagem Rockefeller como para a nativanativo. Contudo não houve diferença significativa na mortalidade após 24 e 48 horas. Abaixo, está representada a mortalidade das larvas causadas por diferentes concentrações de

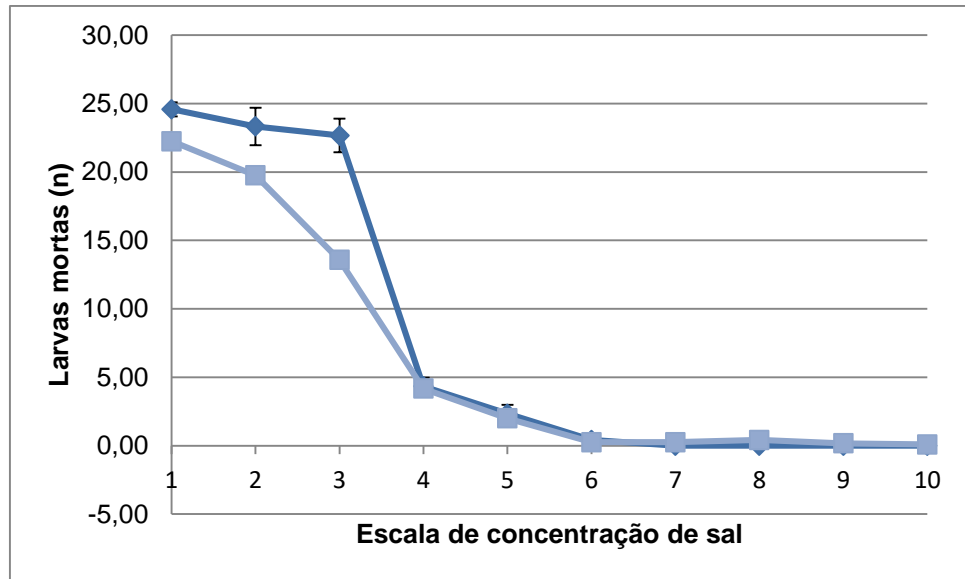
ambos os sais após 24 (Figura 18) e 48h (Figura 19) na linhagem Rockefeller, e 24 (Figura 20) e 48h (Figura 21) nas larvas nativonativas.

**Tabela 2:** Concentrações letais dos sais imidazólicos (LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>, LC<sub>99</sub>) na mortalidade larval de *Ae.aegypti* linhagem Rockefeller após 24 e 48 horas de exposição, seu intervalo de confiança e Qui-Quadrado de Pearson.

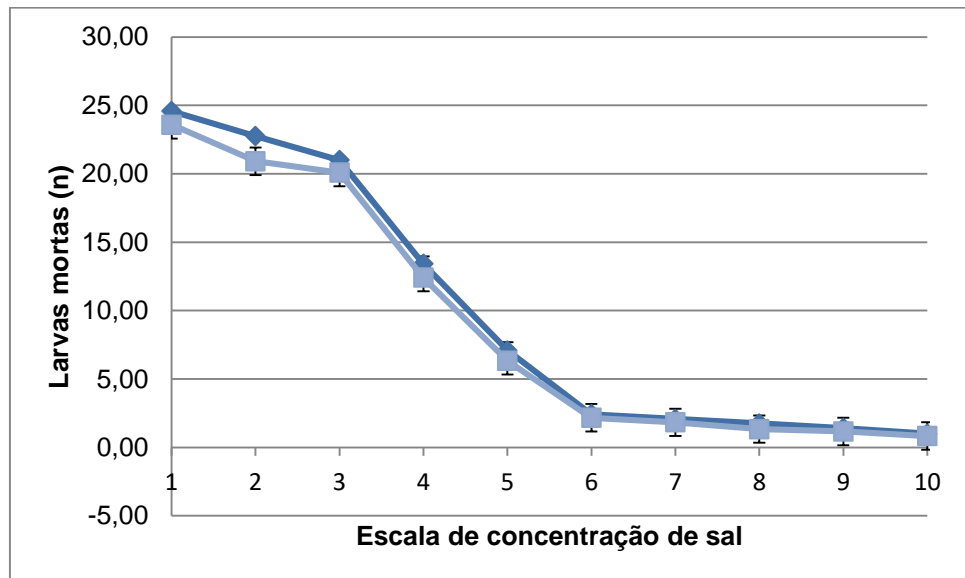
	C <sub>16</sub> MImMeS (24 h) µg/L	C <sub>16</sub> MImMeS (48 h) µg/L	C <sub>18</sub> MImCl (24 h) µg/L	C <sub>18</sub> MImCl (48 h) µg/L
LC <sub>50</sub>	7.347 6.045-8.649	6.040 4.813-7.267	9.104 8.588-9.620	9.263 9.112-9.415
LC <sub>90</sub>	13.330 11.173-15.487	12.862 10.715-15.008	17.070 16.131-18.008	17.350 17.073-17.627
LC <sub>99</sub>	14.676 12.288-17.065	14.396 11.979-16.813	18.862 17.816-19.907	19.170 18.861-19.478
Pearson's Chi-square	2672.1	2144.6	1772.6	2199.6
DF	9	9	9	9
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

**Tabela 3:** Concentrações letais dos sais imidazólicos (LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>, LC<sub>99</sub>) na mortalidade larval de *Ae.aegypti* nativonativo após 24 e 48 horas de exposição, seu intervalo de confiança e Qui-quadrado de Pearson..

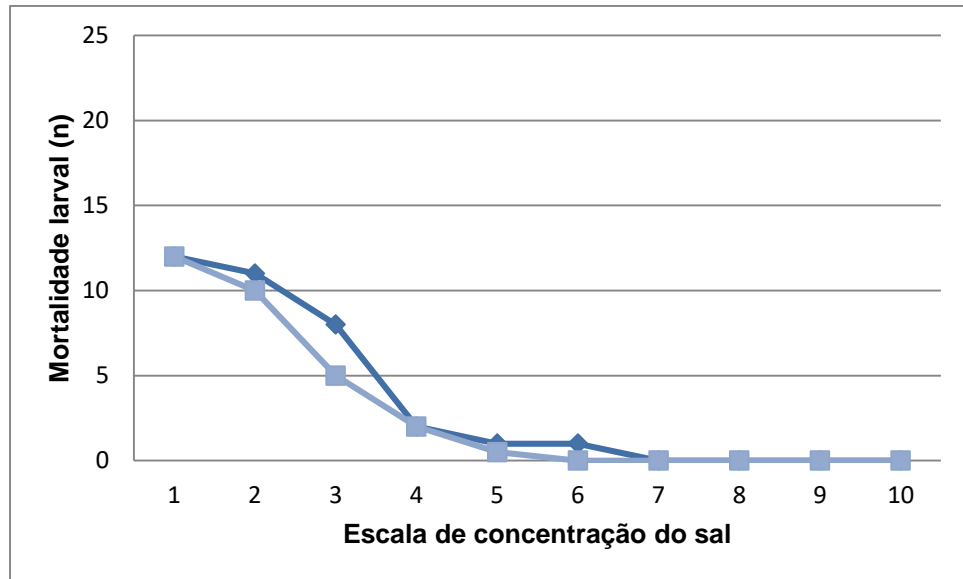
	C <sub>16</sub> MImMeS (24 h) µg/L	C <sub>16</sub> MImMeS (48 h) µg/L	C <sub>18</sub> MImCl (24 h) µg/L	C <sub>18</sub> MImCl (48 h) µg/L
LC <sub>50</sub>	8,477 6.909-1010	7.604 5.403-8.201	8.500 7.971-9000	9.123 9.115-9.315
LC <sub>90</sub>	15.856 12.345-15.677	12.505 10.632-15.001	18.037 17.100-19.110	17.550 17.100-17.554
LC <sub>99</sub>	16.999 14.456-15.167	14.234 11.876-16.500	18.824 17.716-19.905	19.200 18.864-19.353
Pearson's Chi-square	2989,1	2865	1672.8	2202.3
DF	8	8	8	8
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001



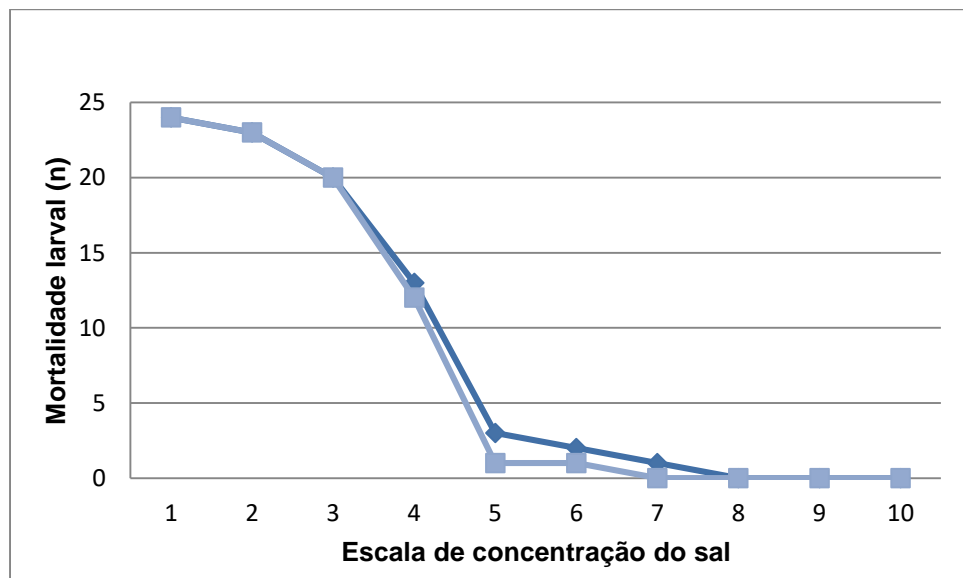
**Figura 18:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 24h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /- desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0,312 µg/L), 8 (0,156 µg/L), 9 (0,078 µg/L) e 10 (0,039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.



**Figura 19:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 48 h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /- desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0,312 µg/L), 8 (0,156 µg/L), 9 (0,078 µg/L) e 10 (0,039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.



**Figura 20:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* nativonativo após 24 h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /- desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0,312 µg/L), 8 (0,156 µg/L), 9 (0,078 µg/L) e 10 (0,039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.



**Figura 21:** Mortalidade larval de *Aedes aegypti* nativonativo após 48 h de exposição aos sais imidazólicos C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆). O número de larvas mortas representa a média + /- desvio-padrão. Cada número representa a concentração de sal aplicada nos bioensaios: 1 (20,0 µg/L), 2 (10,0 µg/L), 3 (5,00 µg/L), 4 (2,50 µg/L), 5 (1,25 µg/L), 6 (0,625 µg/L), 7 (0,312 µg/L), 8 (0,156 µg/L), 9 (0,078 µg/L) e 10 (0,039 µg/L). Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.

Pelo menos 50% das larvas mortas da linhagem Rockefeller e nativo, nas concentrações mais elevadas ( $LC_{99}$ ) de  $C_{18}MImCl$  e  $C_{16}MImMeS$ , parecem ter algum tipo de dano em seu interior, quando comparadas com as larvas do controle (Figura 22). Possíveis danos foram estudados em cortes histológicos e são descritos no capítulo III.

Dos sais testados,  $C_{18}MImCl$  e  $C_{16}MImMeS$  foram eficazes para o controle de larvas de *Ae. aegypti* Rockefeller e nativo. A aplicação de soluções aquosas com estes sais em concentrações de 10,0 e 20,0  $\mu g/L$  resultou em mortalidade de 90% após 48 horas. Esses resultados são muito promissores, uma vez que uma relativa baixa dosagem foi necessária para matar as larvas.



**Figura 22:** Larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller. Lado esquerdo (A): larva controle. No meio (B): larva tratada com o sal imidazólico  $C_{18}MImCl$  após 24h de exposição. Lado direito (C): larva tratada com o sal imidazólico  $C_{18}MImCl$  após 48h de exposição. Aumento = 12X.

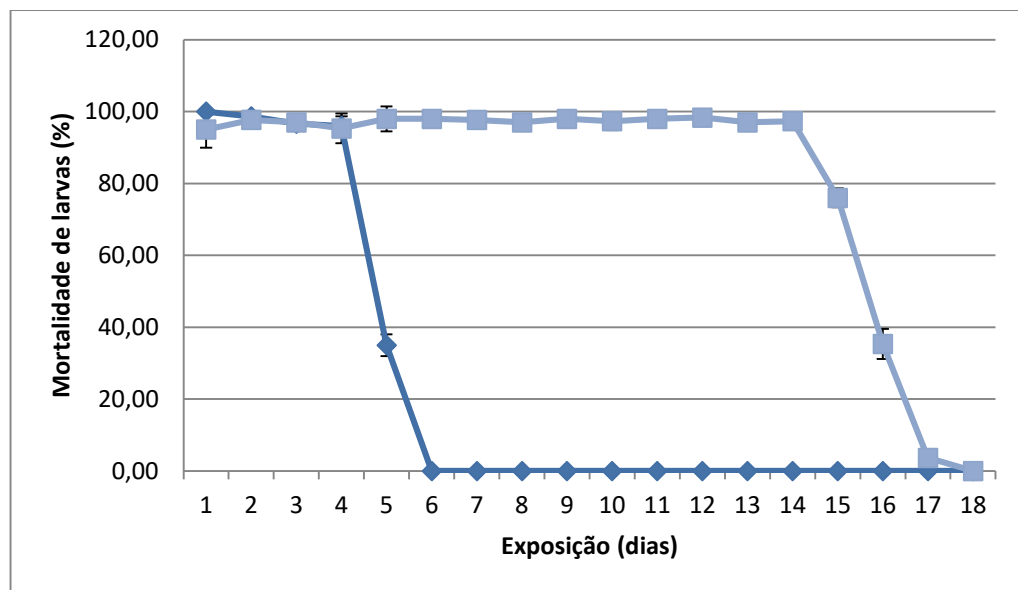
Fonte: Autora (2017).

### 3.3 Efeito tóxico residual de soluções aquosas dos sais imidazólicos

De acordo com Pontes et al. (2005), o efeito residual é definido como a capacidade de manter a atividade letal de doses larvicidas para um organismo alvo por um determinado período de tempo. A Figura 23 mostra os resultados obtidos com os sais  $C_{18}MImCl$  e  $C_{16}MImMeS$  ao longo de 18 dias. O sal  $C_{16}MImMeS$  foi muito eficaz até o quarto dia, fazendo com que houvesse 98% de mortalidade de larvas

após 24 horas. No quinto dia, houve um declínio abrupto da mortalidade, que alcançou apenas a 30%. A atividade da solução C<sub>16</sub>MImMeS foi completamente perdida no sexto dia.

A solução contendo o sal C<sub>18</sub>MImCl causou quase 100% de mortalidade nas larvas de *Ae. aegypti* e este efeito foi mantido até o 14º dia. Após esse período, houve um declínio da percentagem de mortalidade, e, no 18º dia, não foi observado nenhum efeito tóxico sobre as larvas.

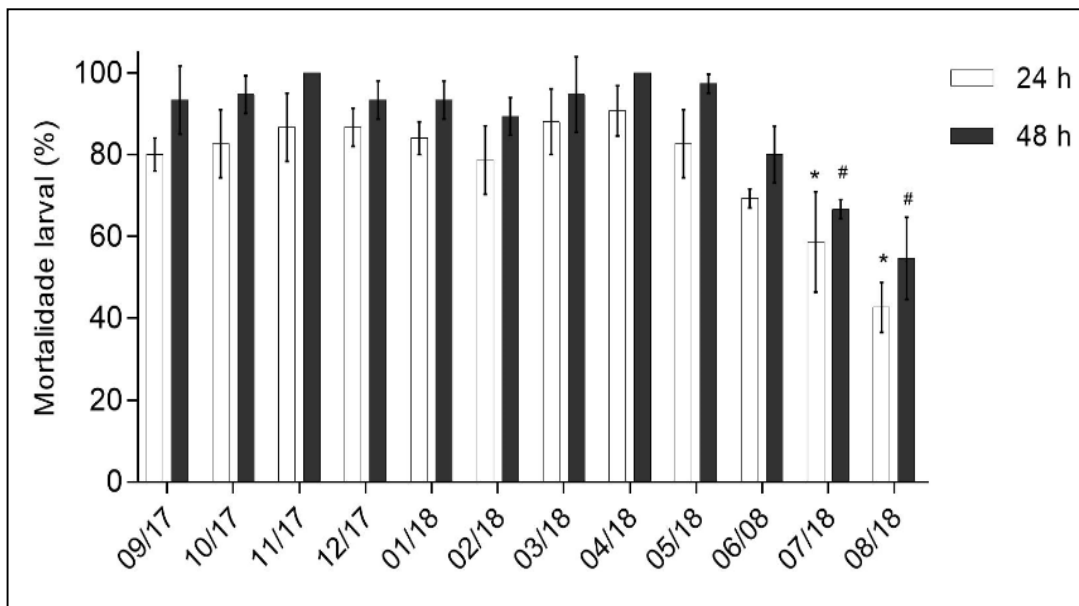


**Figura 23:** Efeito tóxico residual de uma solução aquosa de C<sub>18</sub>MImCl (■) e C<sub>16</sub>MImMeS (◆) sobre larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. Cada ponto representa a mortalidade larval média ± desvio padrão. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.

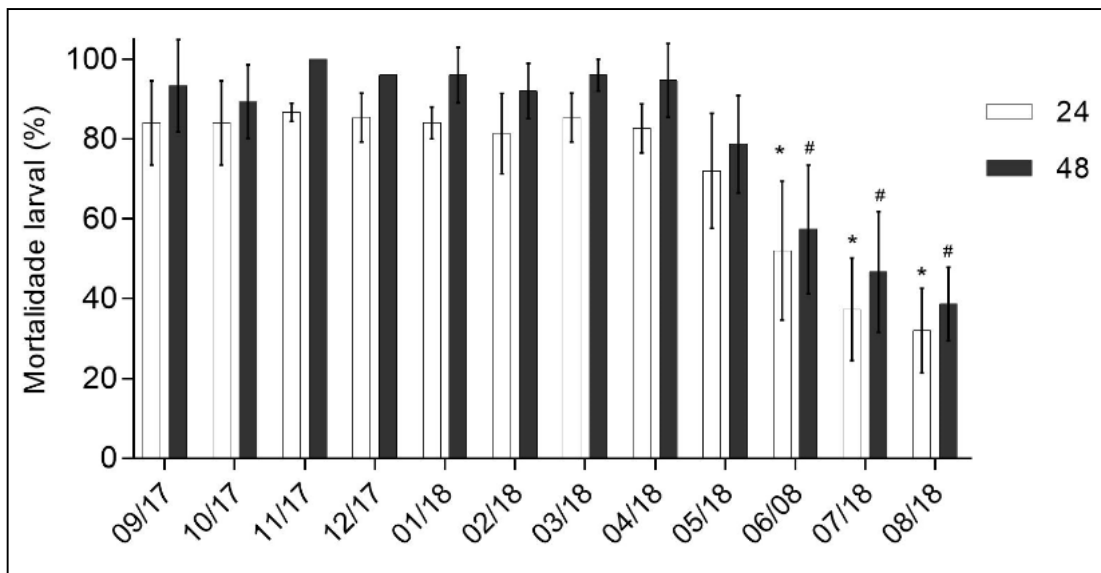
### 3.4 Efeito residual letal após exposição do sal imidazólico a condições ambientais

Com relação ao efeito residual após 12 meses em condições ambientais, foi possível observar que a toxicidade inicial de ambos os sais imidazólicos não foi afetada pelo método de aplicação: os sais que foram mantidos secos durante esse tempo, quando diluídos em qualquer período, mantiveram-se tóxicos para as larvas de *Ae. aegypti*. Durante o período de testes, o sal C<sub>18</sub>MImCl (Figura 24) apresentou taxas de mortalidade larval de até 90% nos dez primeiros meses, mostrando uma queda mais significativa nos meses de julho e agosto, quando então o experimento

foi interrompido. O mesmo ocorreu com o sal  $C_{16}MImMeS$  (Figura 25) que começou a apresentar uma diminuição na mortalidade no mês junho.



**Figura 24:** Efeito letal residual do sal imidazólio  $C_{18}MImCl$  após 24 e 48 horas, que foi mantido em condições ambientais durante 12 meses (Setembro 2017-Agosto 2018) sobre as larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.\*  $p < 0,05$  em relação a Setembro de 2017 (quando inicio o experimento) em 24 horas. #  $p < 0,05$  em relação a Setembro de 2017 em 48 horas.



**Figura 25:** Efeito letal residual do sal imidazólio  $C_{16}MImMeS$  após 24 e 48 horas, que foi mantido em condições ambientais durante 12 meses (Setembro 2017-agosto 2018) sobre as larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller. Nenhuma mortalidade foi observada no grupo-controle.\*  $p < 0,05$  em

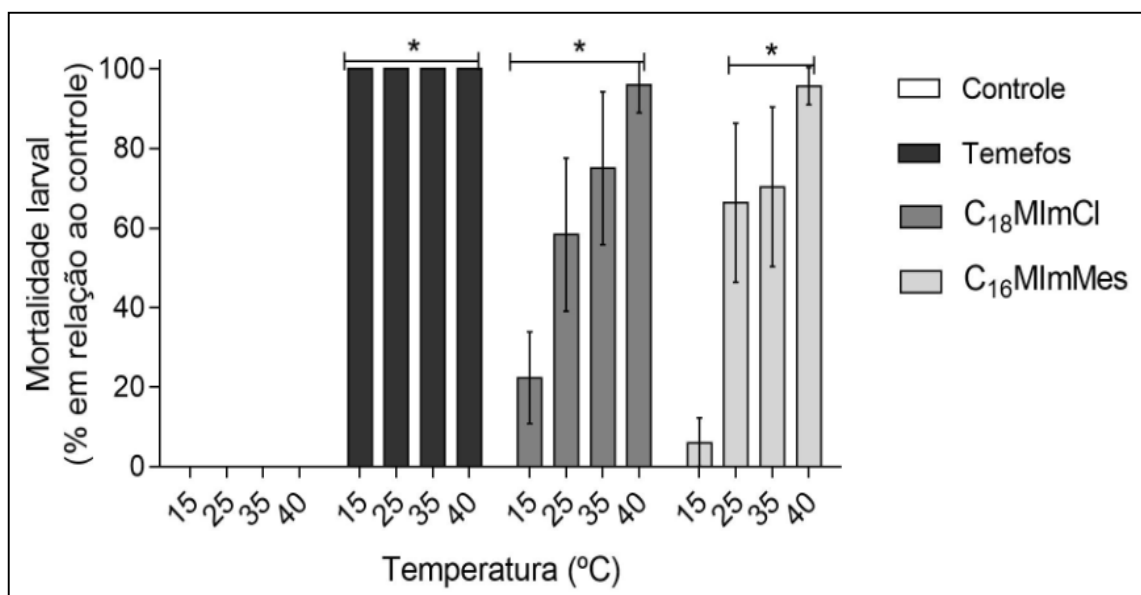


relação a Setembro de 2017 (quando inicio o experimento) em 24 horas. #  $p < 0,05$  em relação a Setembro de 2017 em 48 horas.

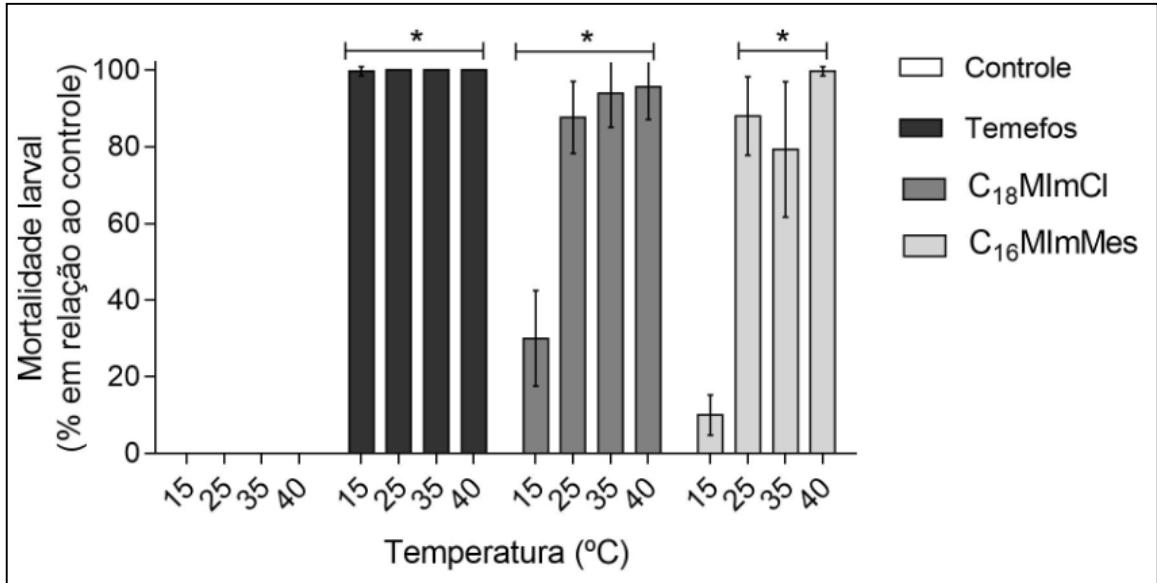
### 3.5 Efeito dos sais imidazólicos e do Temefós sobre larvas em diferentes temperaturas

O organofosforado Temefós matou 100% das larvas nas primeiras 24 horas, em todas as temperaturas testadas. Os sais imidazólicos responderam diferentemente, aumentando sua toxicidade conforme aumentava a temperatura e o tempo de exposição, tanto na linhagem Rockefeller (Figura 26, Figura 27), quanto nas larvas oriundas de ambiente nativo (Figura 28, Figura 29). Em nenhum dos períodos foi observada mortalidade nos grupos-controle.

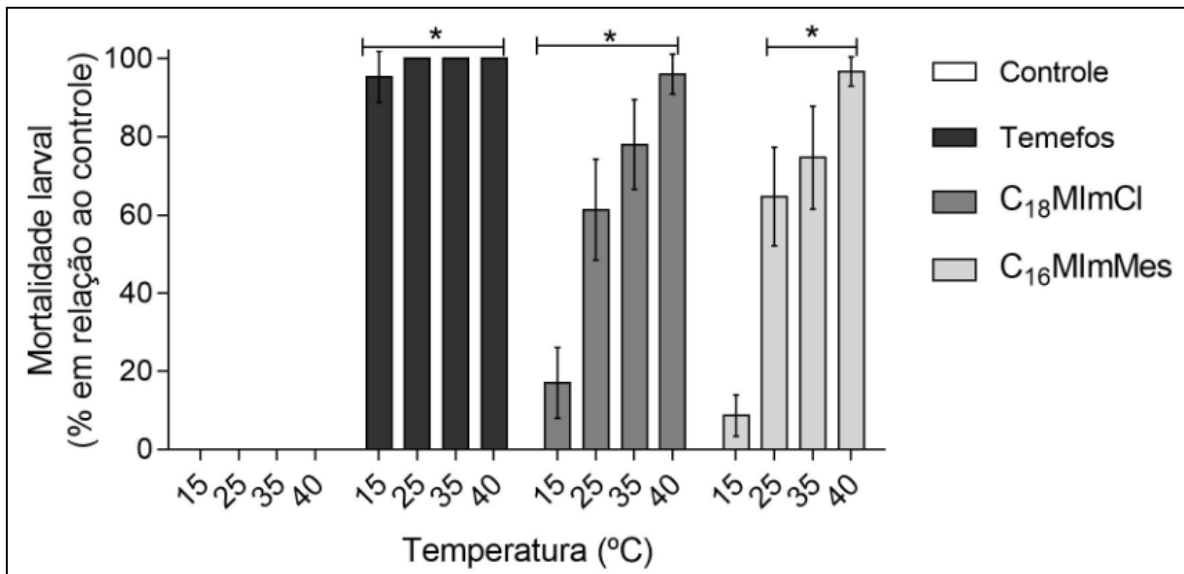
Houve diferença significativa entre o tratamento dos sais larvais em relação ao Temefós e ao grupo-controle  $p < 0,05$ , quando testados em diferentes temperaturas.



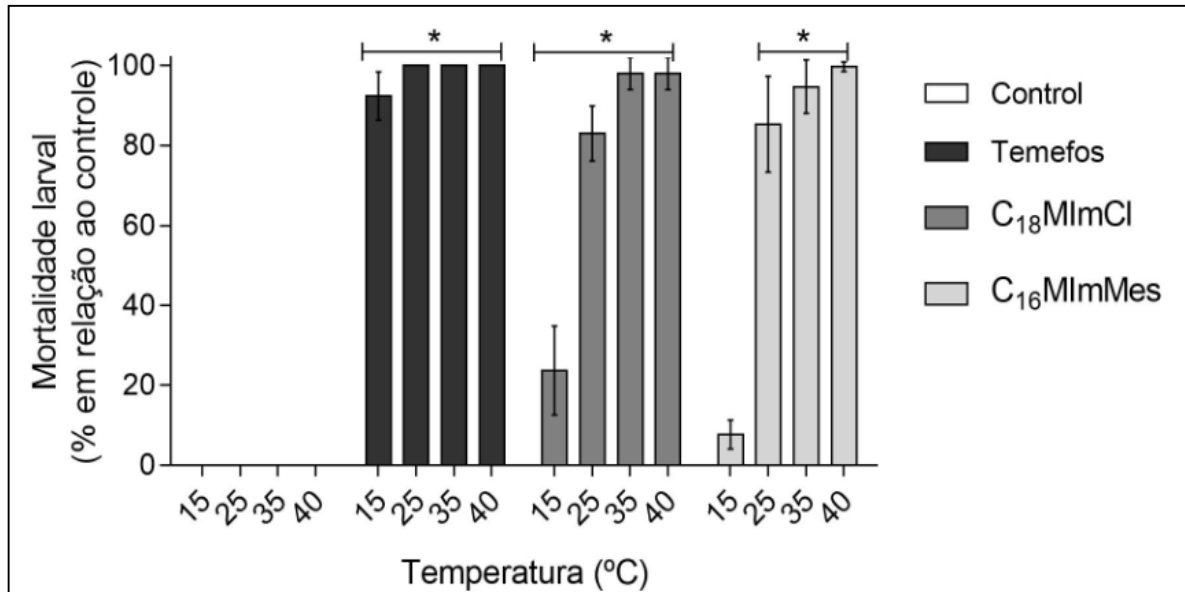
**Figura 26:** Efeito dos sais sobre larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 24 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \*  $p < 0,05$ , representa diferença significativa em relação ao controle.



**Figura 27:** Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas de *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller após 48 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas, em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \*  $p < 0,05$ , representa diferença significativa em relação ao controle.



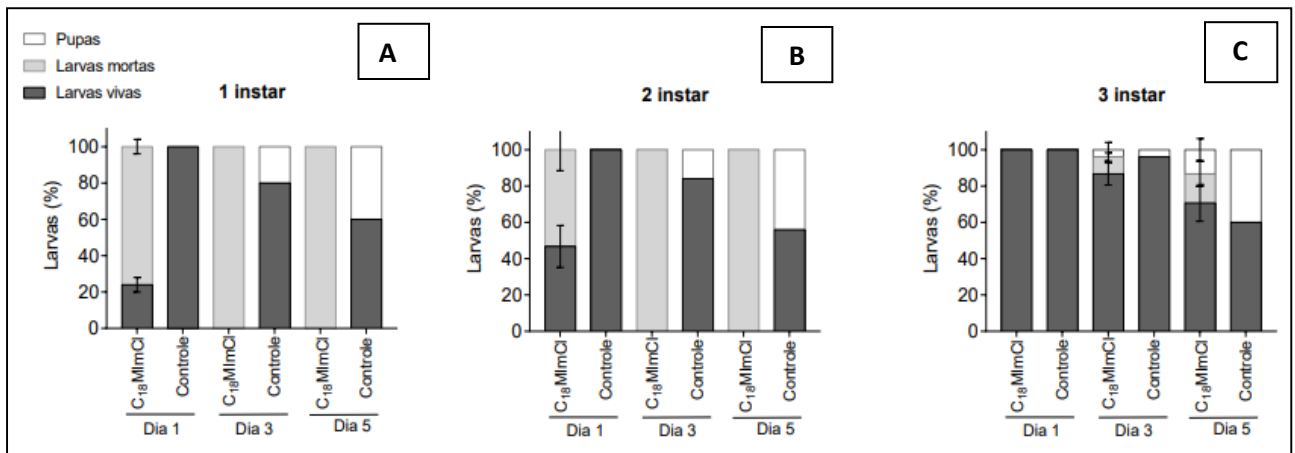
**Figura 28:** Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas nativas de *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas, em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \*  $p < 0,05$ , representa diferença significativa em relação ao controle.



**Figura 29:** Efeito dos sais imidazólicos sobre larvas nativas de *Aedes aegypti* após 48 horas de exposição em quatro diferentes temperaturas, em comparação ao grupo-controle e ao composto Temefós. \*  $p < 0,05$ , representa diferença significativa em relação ao controle.

### 3.6 Desenvolvimento de larvas de Rockefeller expostas a uma dose subletal LC<sub>20</sub>

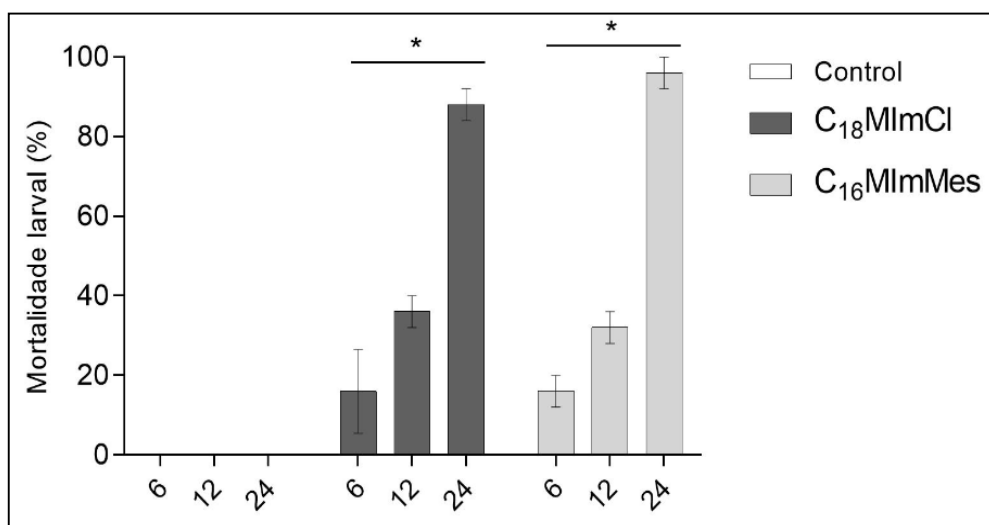
As larvas de 1º instar expostas ao sal imidazólico na dose de 4µg/L, após 24 horas apresentaram 80% de mortalidade e, após três dias de exposição, havia 100% de mortalidade. As larvas de 2º instar pareceram ser um pouco mais resistentes à ação do sal pois, após 24 horas, havia em média de 40% de larvas vivas. Após três dias, foram observados 100% de mortalidade. As larvas de 3º instar apresentaram uma resistência maior à solução. A partir do terceiro dia, já foi possível realizar uma contagem de pupas vivas, além de uma pequena mortalidade larval que foi observada (em média 10%). No quinto dia, um número maior de pupas foi encontrado, aumentando também a mortalidade larval. As pupas presentes durante o desenvolvimento, por algum motivo, não completaram seu ciclo, não havendo a presença de adultos no final dos experimentos. O grupo-controle dos instares larvais apresentou uma pequena mortalidade no quinto dia, assim como as larvas de 3º instar expostas. Isso pode ser explicado pelo surgimento de um biofilme na água dos copos, devido à não troca de água durante o ensaio. Nos controles, foi observado, a partir do terceiro dia, um número mais elevado de pupas (Figura 30).



**Figura 30:** Desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* em 1º instar (A), 2º instar (B) e 3º instar (C) após a exposição a uma dose subletal LC<sub>20</sub> do sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl. \* Diferença significativa em relação ao controle pelo teste t ( $P < 0,001$ ).

### 3.7 Efeito da luz ultravioleta na eficácia/qualidade dos sais imidazólicos

Nas condições em que os bioensaios foram desenvolvidos, a luz ultravioleta parece não produzir qualquer efeito sobre os sais imidazólicos que venham a interferir em sua toxicidade nas larvas. Como esperado, a mortalidade das larvas iniciou por volta das seis horas de exposição, aumentando sua taxa em até 80% para ambos os sais que foram testados por até 24 horas (Figura 31).



**Figura 31:** Efeito dos sais imidazólicos em larvas de *Aedes aegypti*, linhagem Rockefeller em três diferentes tempos (horas) de exposição à luz ultravioleta.\*  $p < 0,05$ , representa diferença significativa em relação ao controle.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Sais imidazólicos com potencial larvicida para *Aedes aegypti*

As variações estruturais sistemáticas entre os sais imidazólicos estudados permitem estabelecer duas relações entre estrutura-atividade, baseadas na letalidade em uma concentração de sais definida: (1) o comprimento da cadeia lateral N-alkylimidazólio desempenhou um papel importante, mostrando um aumento da mortalidade larval com um comprimento de cadeia crescente ( $C_{18}MImCl > C_{16}MImCl > C_{10}MImCl > C_4MImCl$ ); e (2) também o ânion afetou a mortalidade larval fortemente ( $C_{16}MImMeS > C_{16}MImCl > C_{16}MImNTf2$ ).

Sobre o possível mecanismo de ação dos SI, as relações estrutura-atividade estabelecidas forneceram informações importantes. A crescente mortalidade larval com o crescente comprimento N-alkilimidazóliotrocando, a cadeia lateral ( $C_{18}MImCl > C_{16}MImCl > C_{10}MImCl > C_4MImCl$ ) poderia ser devido à hidrofobicidade crescente, acompanhada, ao mesmo tempo, de uma crescenteanfifilidade (Ranke, 2006). Não obstante, o efeito do ânion SI parece ser predominante sobre o efeito do imidazólio N-alkil-comprimentoda cadeia lateral ( $C_{16}MImMeS > C_{16}MImCl > C_{16}MImNTf2$ ). Isso pode estar relacionado com a basicidade do ânion e, conseqüentemente, a hidrofília do sal, onde  $C_{16}MImMeS$  é o mais hidrofílico e  $C_{16}MImNTf2$  o mais hidrofóbico. Do mesmo modo, isso também pode estar relacionado à maior força de coordenação do ânion metanossulfonato, resultando em interações mais fortes com as larvas. Embora um aumento imidazólio N-alkil no comprimento da cadeia aumente a hidrofobicidade do SI, o efeito do ânion NTf2 é muito mais pronunciado.

Como resultado, a hidrofobicidade pode tornar-se muito alta. Ao mesmo tempo, a força de coordenação deste ânion é muito mais fraca do que MeS e Cl, desfavorecendo a interação com as larvas. Assim, isso indica a importância de que um ânion está fortemente interagindo com um cátion mais hidrofóbico da cadeia de

N-alquil. Essas observações estão de acordo com a solubilidade do sal na água, diminuindo na ordem  $C_{16}MImMeS$  (137,8 mg/mL) >  $C_{16}MImCl$  (86,2 mg/mL) >  $C_{18}MImCl$  (43,2 mg/mL) >  $C_{16}MImNTf_2$  (< 1,92 mg/mL). Isso realça a hidrofiliidade fortemente reduzida do sal  $C_{16}MImNTf_2$ , e influência menos pronunciada de N-alquilno comprimento da cadeia.

#### **4.2. Atividade dos sais imidazólicos selecionados sobre larvas de *Ae. aegypti***

A toxicidade dos sais imidazólicos  $C_{18}MImCl$  e  $C_{16}MImMeS$  foi testada em 10 concentrações na faixa de 20,0-0.039 µg/L, em larvas de *Ae. aegypti* Rockefeller e nativas. As duas primeiras concentrações (20 e 10 µg/L) resultaram em mortalidade larval de 90%, após 48 horas. A Organização Mundial de Saúde recomenda uma dose que mata 100% de 6,0 µg/L para o organofosforado Temefós (WHO, 1981). Então, quando se comparam os resultados obtidos com  $C_{18}MImCl$  e  $C_{16}MImMeS$  com o Temefós, que é o produto químico mais utilizado como larvicida em todo o mundo, os sais, sem dúvida, apresentam grande potencial para o controle de larvas. Outra comparação pode ser feita com o regulador de crescimento pyriproxyfen que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, tem uma dose recomendada de 10,0 µg/L (WHO, 2004).

O mecanismo de ação do sal no controle das larvas é ainda desconhecido. De acordo com Bradley & Philips (1977), larvas de mosquitos de água doce enfrentam o problema da absorção de água por osmose, por meio da cutícula e por ingestão. Além disso, o gradiente iônico entre a água externa e sua hemolinfa favorece a perda de íons. Assim, a salinidade da água contendo o sal imidazólico poderia estar influenciando a morte das larvas em razão d euma significativa perda de água. Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para se afirmar tal influência.

Conforme relatado por Bradley & Philips (1977), larvas de mosquitos de água doce não têm a fisiologia osmótica regulada para ambientes salinos. Se a absorção de sal ocorresse pelas papilas anais, talvez as larvas se tornassem maiores e absorvessem mais sal, o que levaria a uma severa perda de água pelas larvas. Huang & Brattsten (2007) avaliaram o efeito da salinidade aumentada em *Aedes sollicitans*, uma espécie já adaptada para viver em condições salinas. Os

autores observaram que, embora as larvas não morressem com uma crescente salinidade, seu tamanho foi reduzido devido à dificuldade em manter o equilíbrio osmótico.

Resultados semelhantes foram descritos por Salvador (2002), que evidenciou em larvas de *Ae. aegypti*, expostas ao Temefós, uma redução de cerca de 50% no comprimento e o escurecimento causado pela sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais. Borges et al. (2004), utilizando o inibidor de crescimento diflubezuron em larvas de *Ae.aegypti*, encontraram tamanho menor e aspecto alterado em razão do acúmulo de mudas incompletas.

Neste estudo, após 48h de tratamento com ambos os sais, aproximadamente 50% das larvas tratadas em LC<sub>99</sub> se curvaram e o intestino parecia danificado internamente quando comparado com as larvas do controle. Isso provavelmente indica que a salinidade local, devido ao sal, afetou negativamente a sobrevivência das larvas. Isso provavelmente está relacionado com a capacidade de alguns sais de interagir acentuadamente com outras moléculas por meio de forças intermoleculares, especialmente um sal fortemente coordenado com ânions como cloreto e metanossulfonado (Akhter, 2017).

Isso também explicaria a baixa toxicidade observada com o sal C<sub>16</sub>MImNTf<sub>2</sub>, que contém um ânion não-coordenado, desfavorecendo a interação sal-larvas. Poder-se-ia também especular que o sal age sobre as papilas anais, já que essa estrutura parece ajudar as larvas no controle osmótico em condições naturais através do sequestro de íons pela utilização ativa de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> do ambiente para o interior do corpo das larvas (Akhter, 2017).

#### **4.3 Efeito tóxico residual dos sais imidazólicos em soluções aquosas e secas**

No que diz respeito ao efeito residual, a solução aquosa do sal C<sub>18</sub>MImCl apresentou uma ação mais prolongada de aproximadamente duas semanas, matando quase 100% das larvas. Em altas concentrações (100,0 µg/L), larvicidas químicos como Temefós podem ser eficazes por até 70 dias. Pontes et al. (2005) e Monnert et al. (2012) avaliaram a mortalidade causada por Temefós com testes de toxicidade larval, apresentando mortalidade de 100% por um período prolongado de

60 dias. Assim, considera-se uma dependência da concentração do efeito residual (20,0 µg/L para C<sub>18</sub>MImCl contra 100 µg/L para Temefós), um efeito semelhante poderia ser esperado em uma concentração de C<sub>18</sub>MImCl cinco vezes maior de 100,0 µg/L.

Ao expor os sais imidazólicos por pelo menos 12 meses em condições do ambiente, tendo em vista sua pressão de vapor insignificante, a estabilidade deste composto químico foi avaliada. Nessa condição, foi demonstrando que o fator de evaporação não afetou a potencialidade do sal imidazólico para inviabilizar as larvas. Os resultados confirmam que, mesmo que o produto químico tenha sido aplicado em uma condição que permitiu a evaporação superficial, manteve a toxicidade do sal para controle larval e continuou com a mesma eficácia.

#### **4.4 Efeito dos sais imidazólicos e do Temefós sobre larvas em diferentes temperaturas**

Os resultados demonstraram que, conforme aumenta a temperatura, aumenta também a atividade toxicidade dos sais imidazólicos para as larvas de *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller e nativo. Esse fator é importante quando se pretende usar os sais em regiões de temperaturas mais altas, uma vez que, de acordo com Calado e Navarro-Silva (2002), esse mosquito tem preferência por temperaturas que variam de 25 a 35°C para seu ciclo biológico. Os autores discutem ainda que temperaturas de 15°C e 20°C atuam como fator limitante ao crescimento populacional do inseto. Entretanto, mosquitos adultos de *Ae. aegypti* foram encontrados em Porto Alegre, em condições de baixa temperatura em alguns invernos (Calado & Navarro-Silva, 2002).

Os resultados demonstraram ainda que, para o organofosforado Temefós, as diferentes temperaturas não influenciaram na atividade para as larvas, nas condições de laboratório. Contudo, Whiten e Peterson (2016) estudaram a influência da temperatura sobre a toxicidade do inseticida piretroide permetrina em *Ae.aegypti*, em comparação com organofosforados e organocarbamatos. Os organofosforados mostraram uma correlação positiva entre o aumento da temperatura e o aumento da toxicidade, enquanto que os inseticidas organocarbamatos e piretroides mostram uma correlação negativa. O inseticida



permetrina tem uma correlação negativa na faixa de temperatura de 16-30°C, uma correlação positiva na faixa de 30-32°C e volta a mostrar uma correlação negativa na faixa de 32-34°C. Os autores sugerem que essa diferença na efetividade do inseticida, relacionada à variação na temperatura ambiente, pode prejudicar o controle do mosquito e aumentar os riscos à saúde pública.

Em testes com diferentes temperaturas, devemos levar em consideração que o efeito da temperatura ambiente na toxicidade dos inseticidas não é linear, sendo que vários fatores podem explicar essa influência. No caso dos inseticidas que são inibidores da enzima acetilcolinesterase, como os organofosforados (Temefós), a toxicidade é aumentada pela elevação na temperatura, sendo que esta elevação tende a aumentar a absorção dos inseticidas (Viswanathanand & Krishna Murti, 1989). Outro fator a ser considerado é o efeito da temperatura no estado funcional do organismo alvo, com modificações no metabolismo, maior perda de água e aumento no consumo de oxigênio, que pode aumentar a suscetibilidade do organismo alvo ao inseticida (Viswanathanand & Krishna Murti, 1989). Os inseticidas ou larvicidas que apresentam um coeficiente de temperatura positivo devem ser utilizados preferencialmente nas estações quentes, enquanto que aqueles com coeficiente de temperatura negativo devem ser utilizados nas estações mais frias, para que não ocorra perda de eficiência do produto (Whiten & Peterson, 2016). Os sais imidazólicos mostraram-se mais eficientes em altas temperaturas, período em que *Ae. aegypti* se procria com maior facilidade, nas estações mais quentes do ano.

Dessa forma, os resultados observados neste trabalho estão de acordo com a descrição de vários estudos, em que os efeitos da temperatura sobre a toxicidade de inseticidas são complexos e dependem de cada produto em questão, do organismo alvo e das faixas de temperatura testadas (Viswanathanand & Krishna Murti, 1989).

Também deve ser ressaltado que, conforme Whiten e Peterson (2016), a variação na efetividade dos inseticidas deve ser considerada nas estratégias de uso dos produtos nas diferentes estações do ano, de modo a não comprometer os resultados de campanhas de erradicação de determinados vetores, aumentando os riscos à saúde pública.

Com relação à exposição dos sais à luz ultravioleta, esta não influencia sua estrutura química a ponto de interferir no controle larvário. Entretanto, futuros

estudos em condições de campo e com luz solar direta, deverão demonstrar se pode haver interferência ou não na química deste produto.

Em respeito à exposição de produtos químicos à luz ultravioleta, estudos constataram que baixas concentrações de Metoprene (10 a 400ppm) quando expostas à luz ultravioleta levaram a deformidades em girinos. Na maioria das vezes quando esse composto é exposto a este tipo de luz, tende a originar um subproduto, neste caso o ácido retinóico (Mezquida, 2000). No caso dos sais imidazólicos, não se sabe se sua exposição à luz ultravioleta gera algum subproduto que poderia contribuir para a mortalidade larval. Contudo, não se observou qualquer deformidade nelas durante o período observado.

#### **4.5 Desenvolvimento de larvas de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller expostas a uma dose subletal LC<sub>20</sub>.**

Nesse estudo, foram utilizadas larvas de primeiro instar inicial, o que pode ter ocasionado a mortalidade das larvas expostas durante os três primeiros dias de análise. Larvas de primeiro instar são mais sensíveis e, mesmo utilizando uma concentração baixa LC<sub>20</sub> (4µg/L), foi possível identificar um grande número de mortalidade nas larvas. Existem poucas referências em estudos utilizando dose subletal LC<sub>20</sub> para determinar o grau de suscetibilidade em *Aedes*. Em ensaios utilizando a LC<sub>25</sub> para o organofosforado Temefós em larvas de 3º instar, Prophiro(2013) observou uma diminuição de mortalidade, sendo necessário o aumento de doses subletais do composto. Com os sais imidazólicos, embora a dose subletal utilizada tenha sido menor, a taxa de mortalidade manteve-se a mesma após 48 horas, sendo superior a 80% para larvas de 1º e 2º instares. Nos ensaios de toxicidade anteriores, foi possível observar que, quanto menor a concentração média letal, menor a mortalidade das larvas expostas aos sais. Contudo, essa observação serviu para larvas de 3º e 4º instar, as quais geralmente são utilizadas em ensaios de toxicidade. Isso, poderia explicar o porquê de as larvas de 3º instar expostas a LC<sub>20</sub> atingirem o estágio de pupa. Embora larvas de 3º e 4º instares sejam utilizadas na maioria dos ensaios de toxicidade, essas são de extrema importância pelo fato de estarem mais desenvolvidas com todas as suas funções vitais completas.

#### 4.6 Efeito da luz ultravioleta na eficácia qualidade dos sais imidazólicos

Nas condições em que foram conduzidos os testes de toxicidade dos sais imidazólicos em *Ae. aegypti*, a luz ultravioleta não produziram qualquer efeito sobre referidos sais, que venham a interferir em sua toxicidade sobre as larvas. Em 24 horas, que foi o tempo máximo utilizado para os testes em laboratório, a taxa de mortalidade já era de até 80%. Os locais onde as formas imaturas podem se desenvolver são muito variados. Dessa forma, de acordo com Benedict et al. (2007), uma grande diversidade de situações no ambiente natural, como lugares mais arborizados ou com uma maior ou menor incidência de luz, com variação de temperatura e de pH podem influenciar nos efeitos dos inseticidas. Em estudos realizados com *Ae. aegypti*, foi possível observar uma baixa na suscetibilidade ao Temefós. Esse padrão contrastante de tolerância foi provavelmente vinculado a um aumento de todas as atividades enzimáticas de desintoxicação (Beketov et al., 2011). Uma sinergia entre os inseticidas e a luz UV é relatada, em que a luz UV aumentaria a sensibilidade dos organismos aos inseticidas (Heugens et al., 2001). Em nossos estudos, os sais imidazólicos mantiveram o percentual de mortalidade observado nas larvas não expostas à luz UV. Sendo assim, não se pode afirmar que houve sinergia entre o sal imidazólico e a luz UV, uma vez que a mortalidade larval nas primeiras 24 horas não foi superior àquela observada nos ensaios de toxicidade. Em pesquisas realizadas por Tetreau et al.(2013), larvas expostas à luz UV aumentaram o tempo de sobrevivência quando expostas a compostos químicos, contrastando com os estudos anteriores já relatados. A luz UV é um fator abiótico que, assim como a temperatura, pode afetar a fisiologia e a tolerância dos mosquitos em relação aos inseticidas. No caso do uso de sais imidazólicos, esses fatores precisam ser mais bem estudados.

#### 5. CONCLUSÕES

- I. Os sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl apresentaram potencial larvicida para o controle de larvas de *Ae. aegypti* após 24 e 48 horas de exposição;

- II. O sal C<sub>18</sub>MImCl apresentou uma ação residual em meio aquoso mais prolongado que o sal C<sub>16</sub>MImMeS, em larvas da linhagem Rockefeller;
- III. Ambos os sais apresentaram um efeito residual em condições secas, mantendo sua ação de toxicidade sobre as larvas por até 12 meses;
- IV. Os sais imidazólicos testados em doses subletais atuam como inibidores de crescimento de *Ae. aegypti*;
- V. Em diferentes temperaturas, os dois sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl aumentaram o modo de ação, à medida que a temperatura aumentou;
- VI. Quando expostos a luz ultravioleta, os sais imidazólicos mantiveram sua toxicidade sobre as larvas, quando testadas em até 24 horas.

## REFERÊNCIAS

- Akhter H, Misyura L, Bui P and Donini A. 2017. Salinity responsive aquaporins in the anal papillae of the larval mosquito *Aedes aegypti*. **Comp Biochem Physiol.** 203:144–151.
- Beketov MA, Speranza A, Liess M, 2011. Ultraviolet radiation increases sensitivity to pesticides: synergistic effects on population growth rate of *Daphnia magna* at low concentrations. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 87: 231-237.
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP, 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 7:76-85.
- Beserra EB, Fernandes CRM, Queiroga MF, Castro FP. 2007. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) populations to organophosphates temephos in the Paraíba State, Brazil. **Neotropical Entomology** 36: 303-307.
- Borges RA, Cavasin GM, Silva IG, Arruda W, Oliveira ESF, Silva HHG, Martins F. 2004. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev Patol Trop** 33: 91-104.
- Borowieck P, Milner KM, Brzezinska D, Wielechowska M and Plenkiewicz J. 2013. Synthesis and antimicrobial activity of imidazolium and triazolium chiral ionic liquids. **J Org Chem.** 4:712–720.

- Bradley TJ, Philips JE. 1977. Regulation of rectal secretion in saline - water mosquito larvae living in waters of diverse ionic composition. **J Exp Biol.** 66:83-96.
- Braga IA, Valle D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293.
- Braga IA, Lima JBP, Silva SS, Valle D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, 99: 199- 203.
- Calado DC, Navarro-Silva MA. 2002. Exigências térmicas de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev. Bras. Entomol.** 46: 547- 551.
- Carvalho MS, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PT, Souza LC, Yoshizawa MA, Knox MB, Oliveira C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública** 38: 623-9.
- Cassol CC, Ebeling G, Ferrera B, Dupont J, 2006. A Simple and Practical Method for the Preparation and Purity Determination of Halide-Free Imidazolium Ionic Liquids. **Adv. Synth. Catal.** 348, 243.
- Chediak M; JR Pimenta FG; Coelho G, Braga IA, Lima JB, Cavalcante KR, Souza LC, Melo-Santos MAV, Macoris MLG, Araújo AP, Ayres MAV, Andrighett, MTM, Gomes RG, Campos KB, Guedes RN. 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 111(5): 311-321.
- Dalla Lana DF, Donato RK, Bundchen C, Guezcm, Bergamo VZ, Oliveira LFS et al. 2015. Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. **J Appl Microbiol.** 119:377–388.
- Donato RK, Benvegnu MA, Furlan LG, Mauler RS and Scherkker HS. 2010. Imidazolium salts as liquid coupling agents for the preparation of polypropylene-silica composites. **J Appl Polymer Sci.** 1:304–307.
- Duque JEL, Martins FM, Dos Anjos FA, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e Cipermetrina, **Brasil. Rev. Saúde Pública.** 38: 842-843.
- Fang B, Zhou CH, Rao XC. 2010. Synthesis and biological activities of novel amine-derived bis-azoles as potential antibacterial and antifungal agents. **Eur J Med Chem.** 45:4388–4398.
- Garcia Neto LJ. 2011. Efeito residual do Diflubenzurin sobre larvas de *Aedesaegypti* em condições simuladas de campo, no laboratório. Universidade Estadual do Ceará-Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza, Ceará.
- Heugens EHW, Hendriks AJ, Dekker T, Van Straalen NM, Admiraal W. 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of

- uncertainty factors for use in risk assessment. **Critical Reviews in Toxicology**. 31: 247–284.
- Huang S, Brattsten LB. 2007. Effect of salinity on temephos toxicity to larvae of *Aedes sollicitans* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**. 144:705–708.
- Lima EP, Oliveira AMP, Lima JWO, Ramos ANJ, Cavalcanti LPG, Pontes RJS. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39: 259-263.
- Lima JBP, Pereira da Cunha M, Silva-Jr RCS, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene** 68: 329-333.
- Liu LWH, Riduan SN, Ying JY, Zhang Y. 2013. Short imidazolium chains effectively clear fungal biofilm in keratitis treatment. **Biomaterials** 34:1018–1023.
- Macoris ML, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. 1995. Modificação da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. **Revista de Patologia Tropical** 24: 31-40.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98(5): 703-708.
- McCann M, Curran R, Shoshan MB, McKee V, Devereux M, Kevin K. 2013. Synthesis, structure and biological activity of silver (I) complexes of substituted imidazoles. **Polyhedron**. 56:180–188.
- Mezquida, M. **Larvicide linked to frog deformities**. 2000. Disponível em: <[www.pma.net/larvicide](http://www.pma.net/larvicide)>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- Monnert R, Dumas V, Ramos F, Pimentel L, Nunes A, Sujji E et al. 2012. Evaluation of different larvicides for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) under simulated field conditions. **BioAssay**. 7:1-4.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D. 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 77: 467-477.
- OMS 2007. Novaluron in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers. Organização Mundial de Saúde. WHO/SDE/WSH/07.01/11.
- Pendleton JN, Gilmore BF. 2015. The antimicrobial potential of ionic liquids: a source of chemical diversity for infection and biofilm control. **Int J Antimicrob Agents**. 46:131-139.

- Prophiro JS. 2013. **Alteração do status de suscetibilidade de *Aedes spp.* a organofosforado comparado com produtos de origem botânica e influência de microorganismos na performance do adulto.** Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Pinheiro VC, Tadei WP. 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública** 18:1529-1536.
- Pontes RJS, Regazzi ACF, Lima JWO, Kerr Pontes LRS. 2005. Residual effect of commercial applications of larvicides temephos and *Bacillus thuringiensis israelensis* on *Aedes aegypti* larvae in recipients with water renewal. **Rev Soc Bras Med Trop.** 38:316-321.
- Powell JR, Tabachnick WJ. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 108 Suppl 1: 11-17.
- Riduan ST, Zhang Y. 2013. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. **Chem Soc Rev.** 42:9055-9070.
- Salvador ZL. **Avaliação morfohistológica de larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao Temephos.** 2002. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Schrekker HS, Gelesky MA, Stracke MP, Schrekker cmL, Machado G, Teixeira SR et al. 2007. Disclosure of the imidazolium cation coordination and stabilization mode in ionic liquid stabilized gold nanoparticles. **J Colloid Interface Sci.** 316:189-195.
- Smiglak M, Pringle JM, Lu X, Han L, Zhang S, Gao H et al. 2014. Ionic liquids for energy, materials and medicine. **Chem Commun.** 50:9228-9250.
- Tetreau G, Chandor-Proust A, Faucon F, Stalinski R, Akhouayri I, Prud'homme SM, Raveton M, Reynaud S. 2013. Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. **Aquatic Toxicology.** 140–141, 389–397.
- Viswanathanand PN, Krishna MCR. 1989. Effects of Temperature and Humidity on Ecotoxicology of Chemicals. **Ecotoxicology and Climate.** 139-154.
- Whiten SR, Peterson RKD. 2016. The Influence of Ambient Temperature on the Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the Pyrethroid Insecticide Permethrin. **Journal of Medical Entomology.** 53(1): 139–143.
- WHO- World Health Organization, 1981. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides.** Geneva.
- WHO- World Health Organization, 2004. **Pyriproxyfen in drinking water. Background document for preparation of WHO guidelines for drinking-water quality.** WHO/SDE/WSH/03-04/113. Geneva.

WHO - World Health Organization. 2012. **Dengue and severe dengue.**  
Available from: [who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/).



### CAPÍTULO III - ESTUDO HISTOLÓGICO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* TRATADAS COM SAIS IMIDAZÓLICOS

#### RESUMO

*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é uma espécie de mosquito de grande importância ambiental e epidemiológica, uma vez que apresenta grande distribuição geográfica e é responsável pela transmissão de várias espécies de arbovírus em diferentes regiões do globo. Normalmente, o controle desse inseto é feito por meio de produtos químicos que agem sobre suas larvas. A ação desses inseticidas pode ser observada de várias formas, dependendo de seu local de atuação no organismo do inseto. Quando a ação desses inseticidas ocorre a nível intestinal, muitas vezes é possível observarem-se processos patogênicos nas larvas, através de cortes histológicos. Em estudos anteriores, verificamos que larvas de *Ae. aegypti* nativas e de laboratório tratadas com sais imidazólicos em até 48 horas apresentavam 100% de mortalidade em concentrações muito baixas. Como resultado da toxicidade, observamos que larvas moribundas curvavam-se e pareciam ter desarranjos teciduais em todo o intestino. Dessa forma, o objetivo deste estudo é verificar possíveis efeitos patogênicos em larvas tratadas com um sal imidazólico, através de cortes histológicos. Para este estudo, larvas de *Ae. aegypti* (15 sadias + 15 controle / em triplicata) foram expostas ao sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl em uma concentração de 20 µg/L (LC<sub>99</sub>). Após exposição ao Slem quatro diferentes períodos de tempo as larvas sobreviventes foram submetidas à fixação em resina histológica, cortadas em micrótomo e posteriormente coloridas em Hematoxilina-Eosina e PAS, e estudadas em microscópio ótico. Larvas expostas por 6, 12, e 24 horas apresentaram suas estruturas bem definidas, que são descritas no texto. Aquelas expostas por 36 horas apresentaram uma desorganização celular principalmente na região posterior do intestino médio. Também foi possível observar espaços intercelulares no tecido epitelial do intestino médio, que provavelmente foram causados pela ação do sal imidazólico. Contudo, como o número de larvas analisadas foi baixo, é necessário que mais estudos sejam feitos, com um número maior de larvas e com diferentes sais, para confirmar se os achados nas larvas de *Ae. aegypti* realmente são produzidos pelo tratamento com o sal.

**Palavras-chave:** intestino médio, larvas de mosquito, larvicida, patogênese.

## HISTOLOGIC STUDY ON *Aedes aegypti* LARVAE TREATED WITH IMIDAZOLE SALT

### ABSTRACT

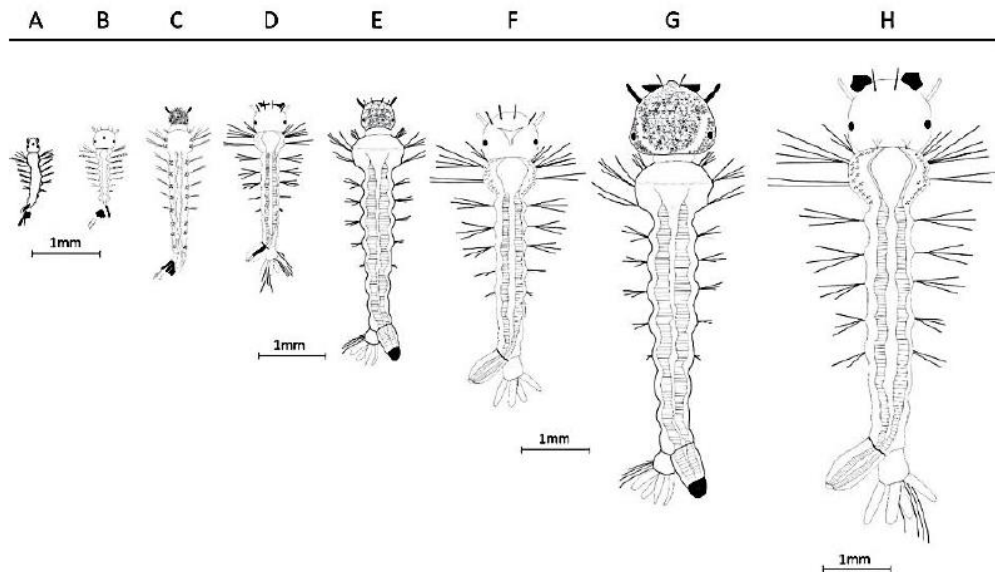
*Aedes aegypti* is a mosquito species of great environmental and epidemiological importance, since it presents great geographical distribution and is responsible for the transmission of Arboviruses in different regions of the globe. Normally, the control of this insect is done by chemicals that act on larvae. The action of these insecticides can be observed in various ways, depending on the place of their toxicity in the body of the insect. When the action of these insecticides at intestinal level occurs, it is often possible to observe pathogenic processes in larvae through histological cuts. In previous studies, we find that when larvae of *Ae. aegypti* wild and laboratory reared were treated with imidazole salts, they died in 48 hours, even in very low concentrations. As a result of toxicity, some larvae got curved and seemed to be very damaged in the whole intestine. Thus, the objective of this study was to check possible pathogenic effects in larvae treated with an imidazole salt through histological cuts. Thus, larvae of *Ae. aegypti* (15 + 15 control/in triplicate) were exposed to an imidazole salt C<sub>18</sub>MImCl in a concentration of 20.0 µg/L (LC<sub>99</sub>). After exposure to salt, surviving larvae were subjected to histological resin, cut into microtome and then colored in hematoxylin-eosin and PAS, and studied under optical microscope. Larvae exposed for 6, 12, and 24 hours showed well-defined structures which are described in the text. After 36 hours of exposition, some larvae presented a cellular disorganization mainly in the posterior region of the intestine. Also, it was also possible to observe intercellular spaces in the epithelial tissue of the midgut which probably were caused by the action of the imidazole salt. However, as the number of larvae examined were very small, there is a need for further studies to be done, with a larger number of larvae, to confirm if the findings in the intestine of *Ae. aegypti* larvae really was produced by treatment with the salt.

**Key words:** larvicidal, midgut, mosquito larvae, pathogenesis.

## 1. INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* é um inseto holometábolo que possui um ciclo de vida com quatro etapas: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto. Sendo fundamentalmente aquático, este mosquito atinge o ambiente terrestre apenas como um adulto. Crescimento adequado e desenvolvimento pós-embrionário dos ovos requerem muda periódica (Merzendorfer & Zimoch, 2003).

Em condições favoráveis de temperatura e umidade, o período de incubação dos ovos dura de quatro a sete dias. Após esse período, eclode uma larva aquática de primeiro instar que se desenvolverá em mais três outros estádios. A diferenciação dos estádios larvais pode ser feita pela morfologia externa (Figura 32). As larvas possuem aspecto vermiforme e seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdômen (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1998). No primeiro instar, estão as larvas muito pequenas e claras, de difícil visualização.. Possuem uma característica diferencial que é a presença de um “dente” quitinoso na região anterior da cabeça, cuja função é auxiliar na eclosão do ovo. O segundo, o terceiro e o quarto estádios são muito semelhantes, diferenciando-se apenas pelo seu tamanho e quantidade de cerdas ao longo do corpo, que vão aumentando conforme o desenvolvimento da larva. Esses estádios são facilmente vistos a olho nu. Em condições favoráveis de temperatura, a fase larval se completa em sete dias (Christophers, 1960; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1998).

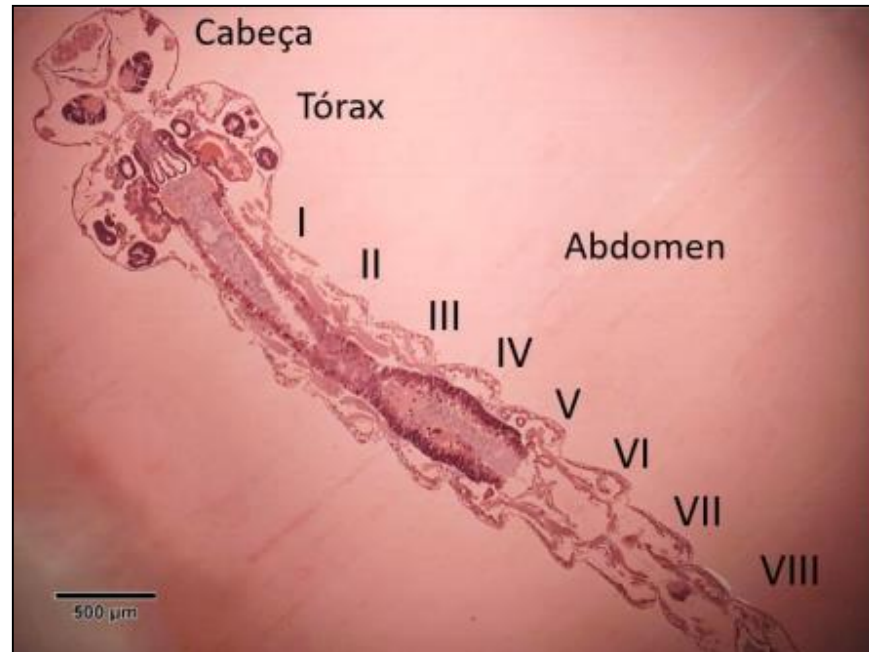


**Figura 32:** Diferenciação de instares larvais de *Aedes aegypti*. (A) Primeiro instar recém eclodida. (B) Primeiro instar inicial. (C) Primeiro instar final. (D) Segundo instar inicial. (E) Segundo instar final. (F) Terceiro instar inicial. (G) Terceiro instar final. (H) Quarto instar.

Fonte: Lemos(2016).

A alimentação das larvas ocorre por filtração, num processo em que as substâncias suspensas na água são direcionadas à boca pelo movimento das escovas. Esse processo filtrante não é seletivo, portanto a ingestão de partículas alimentares é orientada apenas pelo seu tamanho (Forattini, 2002). Como partículas menores são filtradas sem seletividade pelas larvas, a ingestão de produtos químicos biológicos pode ser utilizada como forma de controle desses insetos (Kanis et al., 2012).

A larva de *Ae. aegypti* é dividida em três regiões distintas: Cabeça, tórax e abdome (Figura 33). A região abdominal possui oito segmentos e pode ser dividida em região anterior (estomodeu), média (mesenteron) e posterior (proctodeu). A região anterior do mesenteron inicia-se nos cecos gástricos e vai até o segmento abdominal I. Entre os segmentos II e III, está a região média, ficando a posterior equivalente aos segmentos IV e V. Demais segmentos equivalem ao intestino posterior (Lemos, 2016).



**Figura 33:** Divisão do corpo de uma larva de *Aedes aegypti*. A: 40X. Coloração: HE.

Fonte: Lemos (2016).

A avaliação de possíveis processos patogênicos em órgãos e/ou tecidos de larvas tratadas com produtos químicos ou biológicos pode ser realizada por meio de cortes histológicos e colorações de histoquímica. Esses métodos são baseados em reações químicas entre a substância de interesse que está disponível nos tecidos e os reagentes (corantes), de forma que o produto da reação seja facilmente visualizado em microscopia, em razão de sua coloração final (Stevens, 1975). Existe uma grande variedade de corantes que podem ser utilizados e sua escolha dependerá do que está se objetivando analisar. Podemos citar dentre eles a Hematoxilina (para visualizar mitocôndrias e componentes do citoplasma), Sulfato Azul do Nilo (para a detecção e diferenciação de lipídios), Ácido Periódico-Schiff (PAS) (usado na identificação de polissacarídeos como glicogênio e glicoproteínas) (Junqueira & Carneiro, 2013).

Compostos químicos utilizados no controle de larvas podem causar desorganização histológica, vacuolização, aumento do espaço subperitrófico, dobras cuticulares, encolhimento e dobraduras no tubo digestivo até destruição total das células (Arruda et al., 2003; Barreto et al., 2006; Narciso et al., 2014).

Em estudos anteriores (Goellner et al., 2018), larvas de *Ae. aegypti* foram tratadas com sais imidazólicos. Após 24 e 48 horas de exposição aos sais,

observou-se que muitas larvas moribundas encurvavam o corpo e/ou pareciam ter lesões intestinais, em comparação com o grupo-controle (Figura 34). Isso, poderia indicar que processos patogênicos produzidos pelos sais estariam acontecendo naqueles exemplares. Assim, com base nas descrições prévias, o objetivo deste trabalho foi estudar larvas de *Ae. aegypti* tratadas com um sal imidazólico, através de cortes histológicos.



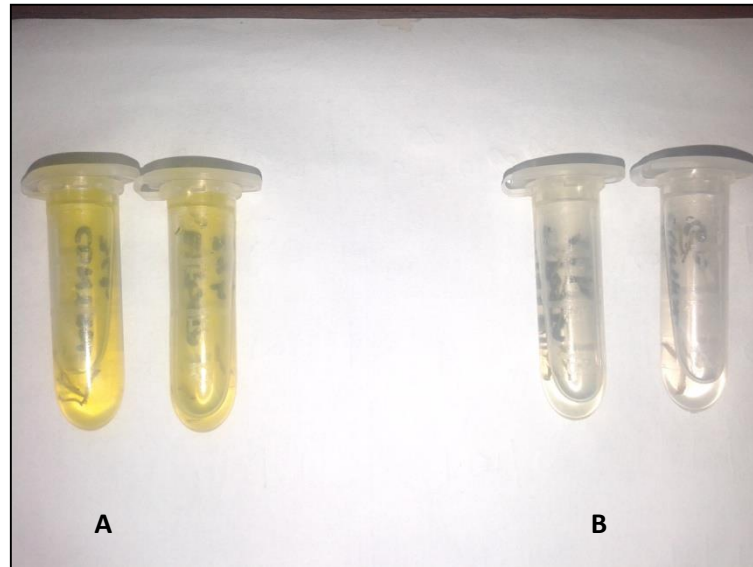
**Figura 34:** Larvas de *Aedes aegypti*: Lado esquerdo (A): larva controle. No meio (B): larva tratada com o sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl após 24 h de exposição. Lado direito (C): larva tratada com o sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl após 48 horas de exposição. Aumento = 12X.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho, foram selecionadas larvas de terceiro e quarto instares da linhagem Rockefeller, após tratadas com o sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl em uma concentração de 20,0 µg/L (LC<sub>99</sub>) e que macroscopicamente apresentavam uma coloração mais escura. Assim, foram realizadas triplicatas contendo 15 larvas expostas ao sal, e um grupo-controle de 15 larvas, contendo somente água filtrada. Todo o processo descrito abaixo foi baseado em Lemos (2016).

Após 6, 12, 24, 36 horas de exposição ao sal imidazólico, as larvas sobreviventes e as larvas do grupo-controle foram retiradas do béquer e colocadas em microtubos contendo 1,5 ml de solução fixadora Bouin onde permaneceram por

24 horas. Em seguida à fixação, cada uma das amostras foi lavada com álcool 70%, com duração mínima de 20 minutos, até que não houvesse resíduo de fixador no material (Figura 35).



**Figura 35:** Larvas de *Aedes aegypti* previamente tratadas com sal imidazólico  $C_{18}MImCl$ . (A) Microtubos contendo larvas fixadas em Bouin (B); Microtubos contendo larvas lavadas e fixadas em etanol 70%.

A desidratação foi realizada com uma série de imersões graduais em álcool etílico: álcool 70% por 10 minutos; álcool 95% por 15 minutos; álcool absoluto por 20 minutos e novamente álcool absoluto por 30 minutos.

O processo de impregnação das larvas foi realizado em temperatura ambiente por meio de uma série de imersões em solução resinada (Leica Historessin – Embedding Kit) conforme o Quadro 3:

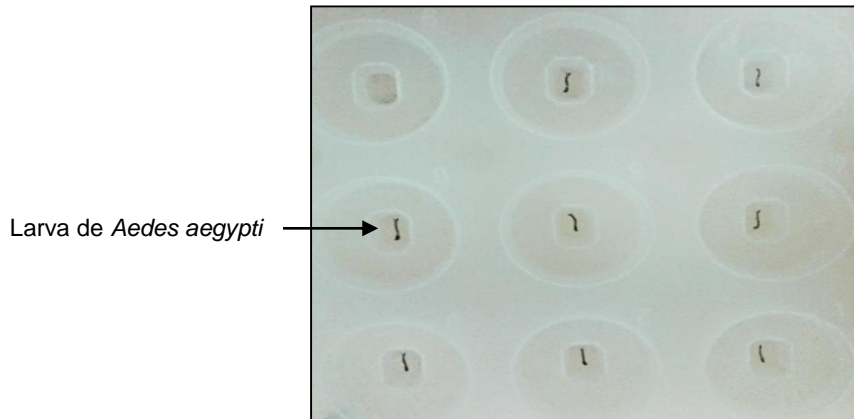
Quadro 3: Etapas do processo de impregnação das larvas de *Aedes aegypti* em solução resinada

Álcool absoluto: solução resinada	Tempo de Imersão
2:1	30 min.
1:1	30 min.
1:2	30 min.
Solução resinada pura	Pernoite
Solução resinada pura	2h no mínimo

Fonte: Lemos (2016).



O material impregnado foi fixado em blocos de resina sólida (Figura 36), em que cada bloco continha uma larva. Os moldes foram mantidos em estufa a 40°C por, no mínimo, por 12h para total polimerização da resina.



**Figura 36:** Larvas de *Aedes aegypti* tratadas com sal imidazólico  $C_{18}MImCl$  e posteriormente fixadas em moldes de blocos contendo resina.

Foram realizados cortes longitudinais nas larvas, com 4  $\mu m$  de espessura, utilizando-se um micrótomo computadorizado semi-automático Precision YD335, com navalha descartável Histoblade em aço inox. Cada fragmento foi colocado sobre uma pequena gota de água destilada, em lâminas previamente limpas com álcool 70%. Para cada bloco de resina, foram montadas de 4 a 6 lâminas devidamente identificadas, em que cada lâmina recebeu seis cortes sequenciais. As lâminas foram colocadas sobre uma chapa aquecida entre 40-45°C para secagem da gota, e, logo após, mantidas em estufa a 40°C por no mínimo 24 horas, para a devida adesão dos cortes a elas. Em seguida, foram encaminhadas à coloração, sendo Hematoxilina-Eosina (HE) para análises morfológicas e coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff) para as análises histoquímicas.

Após a adesão, as amostras foram coradas com a técnica adaptada de Hematoxilina-Eosina. A exposição à hematoxilina foi de 15 minutos, seguido de uma lavagem rápida com água destilada para remover o excesso de corante. Logo após, passou-se para a eosina durante 5 minutos, seguido de duas lavagens rápidas com água destilada em copos béquer. Estas lâminas foram colocadas em placa aquecida a 40°C até sua completa secagem e, em seguida, foram colocadas em estufa 40°C por 24 horas. Para a coloração histoquímica foi utilizado o corante PAS, em que as

estruturas coram em púrpura e magenta. As lâminas foram deixadas no ácido periódico 0,4% por 30 minutos, e em seguida foram lavadas rapidamente em água destilada. Após, as lâminas eram mantidas no reagente de Schiff, no escuro, por 1 hora. Em seguida, três lavagens foram realizadas em água sulfurosa (3 minutos cada banho), seguidas de lavagens em água corrente durante 30 minutos. O corante de hematoxilina foi adicionado após 10 minutos. Após esse processo, as lâminas permaneceram em estufa a 40°C para secar, e posterior montagem. A coloração PAS é utilizada principalmente para colorir estruturas contendo uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos) este material pode ser encontrado nas mucosas sendo assim uma raspagem da região interna da boca para verificar se o corante identifica estas macromoléculas pode servir como teste de ação do produto (Narciso et al., 2014). As lâminas com material coletado da mucosa passaram pelos mesmos procedimentos descritos anteriormente na coloração de PAS. Todas as lâminas foram montadas com uso de Entellan®.

As análises das lâminas foram feitas a partir de microscopia óptica utilizando os equipamentos disponíveis no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As fotografias foram tiradas em microscópio Olympus BX41 com câmera acoplada e a inclusão de barra de escala foi realizada utilizando o software ImageJ versão 1.50f.

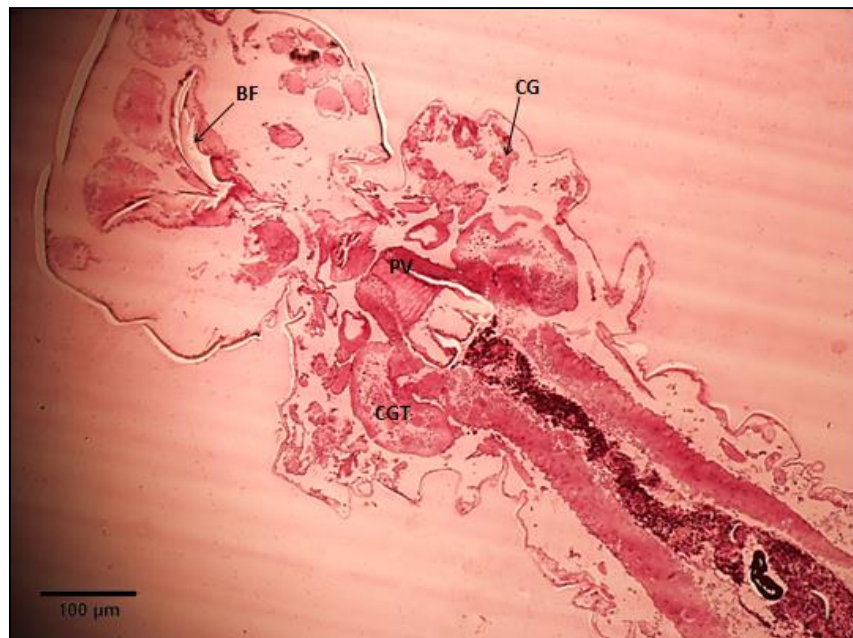
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Avaliação histológica das larvas de *Aedes aegypti***

Em razão das colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e PAS, foi possível identificar estruturas de larvas saudáveis (Figura 37) e compará-las com as larvas expostas em quatro diferentes tempos em que as larvas foram expostas ao sal imidazólico. Foram observadas estruturas como a bomba faringiana, onde são permitidas as sucções dos alimentos (Forratini, 2002). O proventrículo é circundado por uma camada de células epiteliais, as quais são responsáveis pela secreção da membrana peritrófica. Essa região tem grande importância, pois participa ativamente dos processos de defesa mecânicos e entrada de patógenos via oral (Christophers,

1960). Como os cortes foram feitos com maior profundidade, é possível visualizar dois cecos gástricos. Os cecos gástricos têm a função de secretar enzimas digestivas (Leite, 2011).

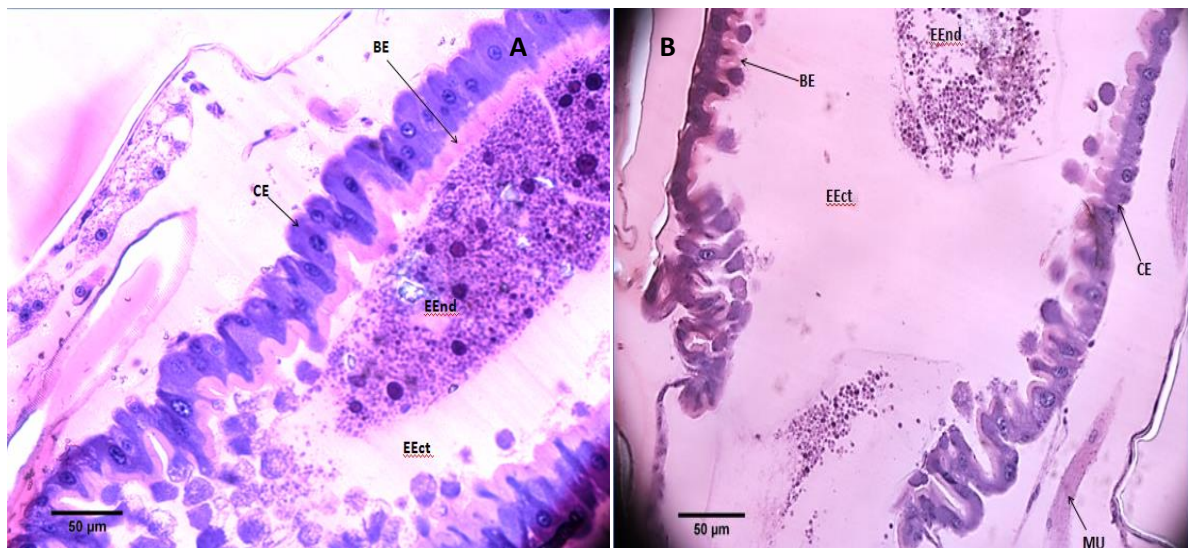
Na região do intestino anterior e médio, é possível observar uma alta quantidade de conteúdo alimentar, que pode ser composto de polissacarídeos, glicoproteínas, etc. Na figura, também é possível ver o corpo gorduroso. Esse é o principal órgão do metabolismo intermediário dos insetos e a principal fonte de componentes da hemolinfa. Pode estar presente em maior ou menor quantidade, dependendo do instar larval e da alimentação da larva (Martins, 2008).



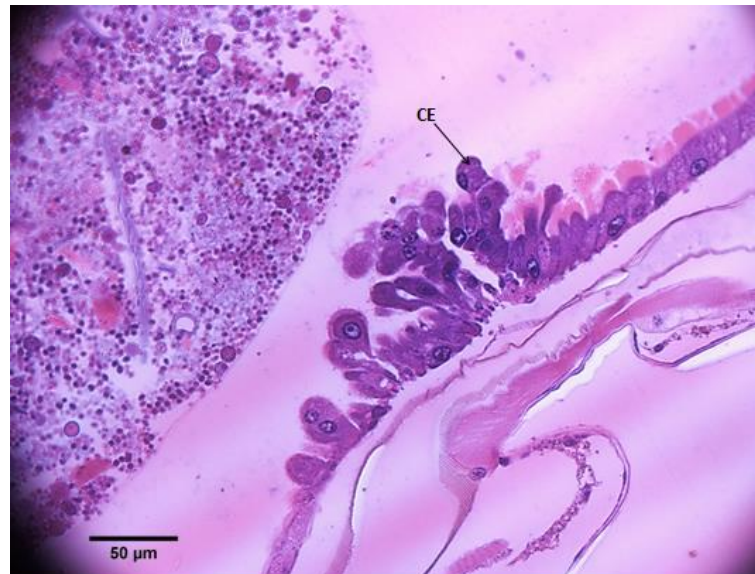
**Figura 37:** Visão geral de uma larva de *Aedes aegypti* saudável. Coloração: PAS. A: 200X. BF (Bomba Faringeana). PV (Proventrículo), CG (Corpo Gorduroso), CGT (Cecos Gástricos).

A região posterior do intestino médio é caracterizada pela alta atividade secretora. Das 15 larvas expostas aos sais imidazólicos, pelo menos cinco larvas apresentaram desestruturação celular na região posterior, que não foi observada no grupo-controle, o que poderia ser explicada pela intensa atividade secretora (Figuras. 38A, 38B, 39). Provavelmente, essa desorganização celular pode levar a consequências teciduais que desestabilizam todo o intestino da larva, como observado macroscopicamente no trabalho de Goellner et al. (2018). Contudo, essa

desestruturação celular na região posterior do intestino das larvas tratadas com o sal imidazólico parece ser uma resposta comum das larvas, quando expostas a produtos químicos. Arruda et al. (2003), estudando larvas de *Ae. aegypti* submetidas ao extrato da planta *Magonia pubescens* (Sapindaceae) descreveram várias alterações deletérias também provocadas nas células epiteliais da região posterior do intestino. Gusmão et al. (2002) observaram que a mortalidade larval estava relacionada com o rompimento da estrutura da matriz peritrófica e com a desintegração das células do intestino.



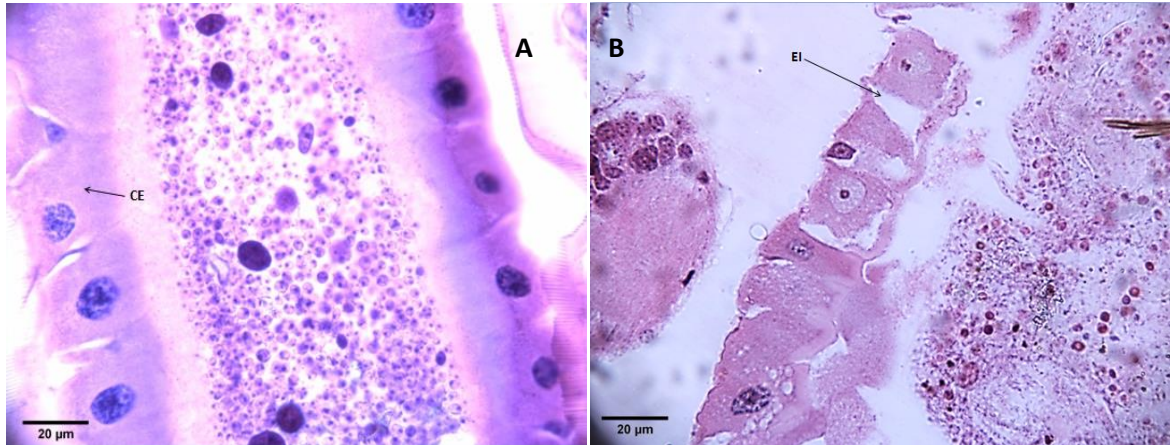
**Figura 38:** Cortes longitudinais da região posterior do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, (A) larva sadia. Coloração HE. A: 400X. (B) Corte longitudinal de uma larva de *Aedes aegypti* exposta ao sal imidazólico por um período de 24 horas. Coloração: HE. A: 400X. BE (Borda em escova), EEnd (Espaço endoperitrófico), EEct (Espaço ectoperitrófico), CE (Células epiteliais), MU (Músculo).



**Figura 39:** Corte longitudinal da região posterior do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao sal imidazólico, após 24 horas. Coloração HE. A: 400X. CE (Células epiteliais desorganizadas).

Após 36 horas de exposição, foi possível indentificar espaços intercelulares entre as células do tecido epitelialdo intestino médioemumade cinco larvasobservadas (Figura 40), e que não foram evidenciadas nogrupocontrol.Esses espaços intercelulares também foram observados por Simom (2016), na região posterior do intestino médio de larvas expostas ao óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* (Myrtaceae), após 48 horas. De acordo com Arruda et al. (2003) e Valotto et al. (2011), o aumento do espaço intercelular pode ser um dos principais efeitos de toxicidade m larvas tratadas com compostos químicos. Após as 36 horas,das 15 larvas expostas, somente cinco puderam ser fixadas. Para a realização dos cortes, são utilizadas somente as larvas que estejam letárgicas. Das cinco larvas,uma apresentou espaços intercelulares no intestino. Sugere-se que eles podem ser ocasionados pelos efeitos tóxicos dos sais. Contudo é necessário um estudo mais aprofundado, com um número maior de larvas expostas ao sal por este mesmo período de tempo para se ter uma comprovação desses achados.





**Figura 0:** Corte longitudinal da região mediana do intestino médio de uma larva de *Aedes aegypti*. Coloração HE. A:1000X. (A) larva controle, CE (Células epiteliais) (B) Larva exposta após 36 horas, EI (Espaços intercelulares).

#### 4. CONCLUSÕES

- I. Uma desestruturação celular na região posterior do intestino das larvas tratadas com o sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl;
- II. Espaços intercelulares entre as células do tecido epitelial do intestino médio podem ser um dos sintomas de toxicidade causada pela ação do sal imidazólico C<sub>18</sub>MImCl;
- III. Mais estudos, com um número maior de larvas, precisam ser conduzidos para confirmar os achados patogênicos nas larvas de *Ae. aegypti*.

#### REFERÊNCIAS

- Arruda W, Oliveira GMC, Silva IG. 2003. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36(1):17-25.
- Barreto CF, Cavasin GM, Silva HHG, Silva IG. 2006. Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindussaponaria* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**. 35(1):37-57.
- Christophers SR. 1960. *Aedes aegypti*. **The yellowfever mosquito**. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press. 738 pp.

- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. 1998. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- Forattini OP. 2002. *Aedes* (Stegomyia). In: Forattini OP. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, vol. 2, Cap. 14: 453-491.
- Goellner E, Schmitt AT, Couto JL, Muller ND, Pilz-Junior HL, Schrekker HS, Silva CE, Silva OS. 2018. Larvicidal and residual activity of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Pest Manag Sci**, 74: 1013–1019.
- Gusmão DS, Páscoa V, Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Lemos FJA. 2002. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) Extract Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97: 371-375.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kanis LA, Prophiro JS, Vieira Eda S, Nascimento MP, Zepon KM, Kulkamp-Guerreiro IC, Silva OS. 2012. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) óleo resin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *larvae*. **Parasitol Res.** 110(3):1173-8.doi: 10.1007/s00436-011-2610-2.
- Leite GLD. 2011. **Apostila de Entomologia Básica**. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. Minas Gerais.
- Lemos BA. Caracterização Morfo-Histoquímica dos tecidos do sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). UFRGS. Porto alegre. 2016.
- Martins GF. 2008. **O corpo gorduroso de *Aedes (stegomyia) aegypti* (Diptera;Nematocera) (Linnaeus, 1762)**: estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos. 2008. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Belo Horizonte.
- Merzendorfer H, Zimoch L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J Exp Biol**, 206:4393–4412.
- Narciso JOA, Soares ROA, Mallet JRS, Guimarães AE, Chaves MCO, Barbosa Filho JM, Maleck M. 2014. Burchellin: study of bioactivity against *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**. 7(172):1-10.
- Simom GY. 2016. Avaliação do potencial larvicida e mecanismos de toxicidade do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* contra o mosquito *Aedes aegypti*. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. 139p.
- Stevens A. 1975. Introduction. In: Bancroft JD. **Histochemical Techniques**. 2. ed. London and Boston: Butterworths.

Valotto CFB, da Silva HHG, Cavasin G, Geris R, Filho ER, da Silva IG. 2011. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpenolabdano, isolado de *Copaiferareticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). Rev Soc Bras Med Trop. 44(2):194-200.



## CAPÍTULO IV - EFEITO DE SAIS IMIDAZÓLICOS EM ALFACE *Lactuca sativa* (ASTERACEAE)

### RESUMO

O estudo de possíveis efeitos tóxicos em organismos não-alvo é fundamental na busca de um composto que, além de apresentar um bom nível de mortalidade para os insetos, não produza impactos ao meio ambiente. Previamente, os sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl foram avaliados para o controle de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e mostraram –se efetivos contra larvas. Contudo é fundamental que estes sais sejam avaliados em organismos não alvos. A alface *Lactuca sativa* (Asteraceae) é uma das hortaliças mais utilizadas em ensaios de fitotoxicidade, devido à sua sensibilidade. Dessa forma, o objetivo deste estudo é verificar se estes sais apresentam toxicidade para sementes e plântulas de alface e água como controle neutro. Em placas de Petri, foram adicionadas 10 sementes da hortaliça, onde foram acrescentados 5ml das respectivas soluções. Após sete dias, foram analisados o percentual de germinação e o tamanho da radícula e do hipocótilo das plântulas. Os bioensaios foram realizados em triplicatas, com quatro repetições. Os resultados demonstraram que os sais imidazólicos testados não apresentaram diferenças significativas em relação às concentrações e ao grupo-controle neutro. Todas as sementes expostas aos sais imidazólicos, germinaram em 24 horas. As radículas e hipocótilos das plântulas obtiverem tamanhos similares singulares aos do grupo-controle com água.

**Palavras-chave:** fitotoxicidade, *Lactuca sativa*, sais imidazólicos.

## EFFECT OF IMIDAZOLE SALTS IN ALFACE *Lactuca sativa* (ASTERACEAE)

### ABSTRACT

The study of possible toxic effects in non-target organisms is fundamental in the search for a compound that besides presenting a good level of mortality for the insects, does not produce impacts to the environment. Previously, the imidazole salts C<sub>16</sub>MImMeS and C<sub>18</sub>MImCl were evaluated for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and produced an excellent effect on the larvae. However, it is essential that these salts are evaluated in non-target organisms. The lettuce *Lactuca sativa* (Asteraceae) is one of the vegetables most used in phytotoxicity tests due to its sensitivity. Thus, the objective of this study was to verify if these salts present toxicity to lettuce seeds and seedlings. For this, five concentrations of each compound were selected, as well as water as neutral control. In Petri dishes were added 10 seeds of the vegetable, where 5 ml of the respective solutions were added. After seven days the percentage of germination, radicle and hypocotyl size of the seedlings were analyzed. The assay was performed in triplicates with four replicates. The results showed that the imidazole salts tested did not present significant differences in relation to the concentrations and to the water group. All seeds exposed to the imidazole salts germinated in 24 hours. The radicles and hypocotyls of the seedlings were of the same size as those of the water group.

**Key words:** phytotoxicity, *Lactuca sativa*, imidazole salts.

### 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os efeitos de qualquer inseticida sobre o ambiente e os seres vivos, incluindo o homem, são decorrentes das suas características de toxicidade, ecotoxicidade e do comportamento/resposta ambiental. Todos estes, por sua vez, são consequência das propriedades físico-químicas de cada molécula. As possibilidades de impactos ambientais significativos são tanto maiores quanto maior for a persistência ambiental do inseticida (o que equivale a menores taxas de degradação física, química e

biológica). Assim, maiores são as suas taxas de transporte entre os diferentes compartimentos ambientais (solo, água, atmosfera e seres vivos) e tanto maiores os seus valores de toxicidade (WHO, 2008). Os diversos princípios ativos, antes de indicados, devem ser submetidos a uma rigorosa avaliação toxicológica e ambiental, onde são considerados os aspectos relacionados à saúde humana e possíveis impactos no ambiente. Após a indicação, a OMS adota periódica ou excepcionalmente procedimentos para novas revisões da literatura, uma vez que novas informações sobre a molécula podem ter surgido no período. Este procedimento agrega segurança nestas indicações, uma vez que os ingredientes ativos estão sendo analisados e avaliados constantemente (Bouldin, 2005).

No Brasil, o uso indiscriminado de inseticidas químicos para o controle de mosquitos tem revelado resistência em várias populações de *Ae. aegypti* em praticamente todo o mundo (Corbel et al., 2017; Moyes et al., 2018). No caso do controle de larvas, os produtos recomendados são o Temefós, *Bacillus thuringiensis israelensis*, diflubenzuron, novaluron e piriproxifeno (EFSA, 2014). Dos inseticidas, o larvicida mais utilizado e que tem demonstrado mais alta percentagem de resistência, principalmente na América do Sul, é o organofosforado Temefós (Moyes et al., 2018). Esse inseticida é rapidamente degradado no solo pelos microrganismos por oxidação e hidrólise até dióxido de carbono. Na água e no sedimento, é também rapidamente degradado por oxidação, com um valor de meia-vida de aproximadamente 17 dias, sendo considerado não persistente no ambiente. Este inseticida tem baixa toxicidade a mamíferos e é moderadamente tóxico a pássaros e peixes e altamente tóxico para invertebrados aquáticos. De acordo com Gu et al. (2007), o produto não é tóxico para algumas plantas tanto no ambiente terrestre como aquático.

Ensaio de toxicidade procuram compreender como os ecossistemas degradam, acumulam, eliminam e sofrem a ação de qualquer substância química nele introduzida (USEPA, 2009). Esses ensaios toxicológicos são metodologias que permitem avaliar o efeito nocivo ou não de substâncias sobre um ambiente por meio da exposição de organismos vivos (bioindicadores) ou de plantas. No caso das plantas, muitos estudos têm demonstrado a eficiência de espécies como pepino e agrião, alface e soja em testes de toxicidade (Azevedo & Chasin, 2003). Testes de toxicidade utilizando vegetais constituem recurso prático de baixo custo, de

sensibilidade razoável na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos (Pelegri et al., 2006). É possível avaliar o efeito tóxico de inseticidas em plantas em sua germinação, no alongamento da raiz e na biomassa vegetal (Žaltauskaite & Cypaite, 2008).

A alface *Lactuca sativa* (Asteraceae) é uma das plantas mais utilizadas em ensaios de toxicidade, devido à sua sensibilidade a agentes químicos, sua rápida germinação, seu crescimento linear em uma ampla variação de pH e baixa sensibilidade osmótica (Souza Filho et al., 2010; Gomes et al., 2012; Ribeiro et al., 2012).

A alface é uma planta de origem nativa, considerada a mais popular das hortaliças folhosas cultivadas. É rica em sais minerais e vitaminas B1, B2, C, além de cálcio e ferro (Filgueira, 2003). É uma planta herbácea de caule diminuto ao qual estão presas suas folhas que podem ser lisas ou crespas. Seu sistema radicular é muito ramificado podendo atingir até 0,25m a 0,60 m do solo. O solo ideal para o seu cultivo deve ser rico em nutrientes e em matéria orgânica. No entanto, seu cultivo apresenta limitações devido a sua sensibilidade às diferentes temperaturas, umidade e pluviosidade (Gomes et al., 2005). Dias de altas temperaturas ou períodos com muita chuva prejudicam muito a cultura da alface. A temperatura do ar é um dos fatores que mais exerce influência sobre os processos fisiológicos desta planta, podendo interferir na sua germinação quando em temperaturas muito elevadas. Por ser uma hortaliça de inverno, é necessário um clima mais ameno para uma melhor produção (Filgueira, 2003). A dormência em sementes de alface é controlada por um genótipo associado a fatores ambientais (Finch Savage & Leubner Metzger, 2006).

*Lactuca sativa* tem sido amplamente utilizada como modelo para vários bioensaios com os mais diversos objetivos agronômicos. Dentre estes, muitos autores destacam a utilização de diferentes produtos químicos que produzem efeitos citotóxicos ou fitotóxicos, inibindo a germinação da planta, ou mesmo seu crescimento (Lungu et al., 2011; Palmieri et al., 2016; Yan et al., 2015; Wang et al., 2016; Aragão et al., 2017; Vieira et al., 2018; Wang et al., 2018). Nesse sentido, os sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl, que apresentam grande potencial para o desenvolvimento de novos inseticidas (Goellner et al., 2018), foram avaliados em *L. sativa*, com o objetivo de verificar se afetam a dormência, a germinação e o crescimento da planta.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Avaliação de sais imidazólicos em sementes de *Lactuca sativa*

Para os ensaios de toxicidade dos sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl, foram selecionadas sementes de alface crespa provenientes de um mesmo lote (Isla Pack ®1) adquiridas comercialmente. Os sais imidazólicos foram fornecidos pelo Prof. Dr. Henri Schrecker, do Instituto de Química da UFRGS. Todos os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Parasitologia da UFRGS.

Para cada composto (C<sub>16</sub>MImMeS, C<sub>18</sub>MImCl), foram selecionadas cinco diferentes concentrações. Como grupo-controle neutro, as sementes foram expostas em água.

Em placas de Petri, foram adicionados discos de papel filtro, e, em sua superfície, foram colocadas 10 sementes de alface. Posteriormente, borrifaram-se 5ml da solução dos compostos a ser testados (Figura 42). As placas de Petri foram mantidas em câmara germinadora climatizada BOD (Tecnal TE – 401) a 28°C com fotoperíodo claro/escuro de 12h.

Foram feitas três repetições para cada composto, sendo cada repetição com quatro réplicas nas concentrações indicadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Concentrações de sais imidazólicos utilizados para determinar sua toxicidade em sementes de *Lactuca sativa*.

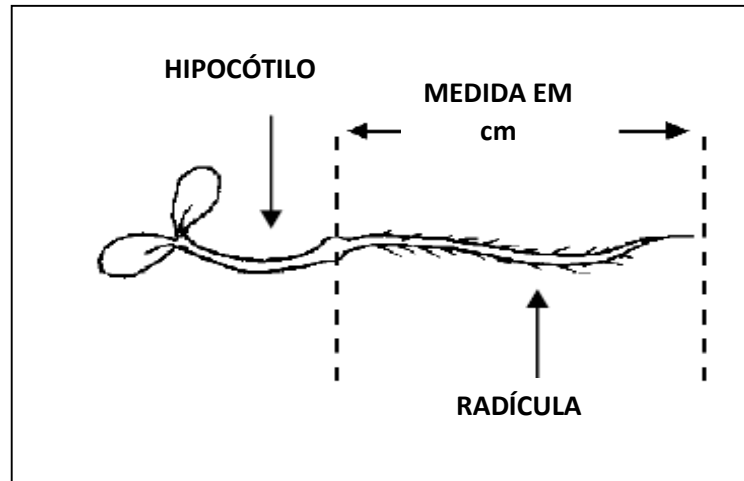
C <sub>16</sub> MImMeS	C <sub>18</sub> MImCl
1 ppm= 1µg/L	1 ppm =1µg/L
2,5ppm= 2,5µg/L	2,5ppm=2,5µg/L
5ppm=5µg/L	5ppm=5µg/L
10ppm=10µg/L	10ppm=10µg/L
50ppm=50µg/L	50ppm=50µg/L



**Figura 40:** Placas de Petri contendo papel filtro e 10 sementes de *Lactuca sativa*, testadas em diferentes concentrações de sais imidazólicos.

As placas contendo as sementes de alface, testadas com as soluções acima descritas, foram protegidas com papel filme para manter a umidade e depois armazenadas em BOD por sete dias. Diariamente o número de sementes germinadas foi contabilizado. Após sete dias, foi medido o tamanho da radícula e do hipocótilo de cada uma das sementes germinadas em cada placa, para cada uma das soluções testadas e para o grupo-controle neutro, contendo somente água.

Os dados foram analisados no programa BioEstat 5.0. Efeitos de significância no tratamento das sementes foram determinados por análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias. Para o teste de normalidade, as médias dos tratamentos foram comparadas por Tukey, com  $p < 0,05$ .



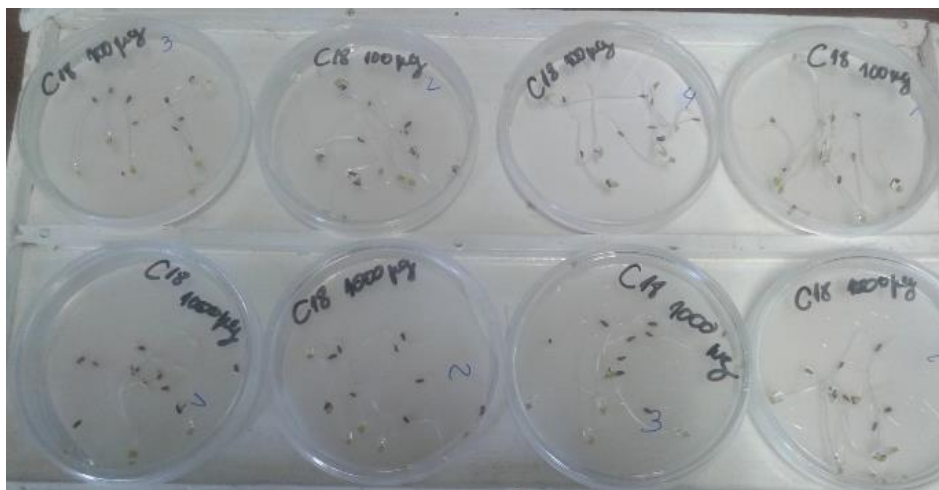
**Figura 41:** Esquema representando a radícula e o hipocótilo deplântulas de *Lactuca sativa*.

Fonte: Adaptado de Fantin (2009).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Comparação do tamanho da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*

Após sete dias de exposição aos sais imidazólicos e à água, (Figura 44) foi determinado o tamanho da radícula e do hipocótilo de cada semente germinada em cada placa de Petri.



**Figura 42:** Placas de Petri com as plântulas de *Lactuca sativa*, germinadas após sete dias de exposição aos sais imidazólicos.

Na Tabela 5 e 6 , estão representadas as médias do tamanho da radícula e hipocótilo das sementes germinadas por tratamento e seu respectivo grupo-controle neutro. Não houve diferença estatística entre os compostos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl ( $p > 0,05$ ) independentemente da concentração utilizada.

**Tabela 5:** Média geral da medida em centímetros de radícula e hipocótilo para o composto C<sub>18</sub>MImCl nas três repetições.

Concentrações	Radícula			Hipocótilo		
	1 ppm	5,06	5,96	5,7	3,04	2,37
2,5 ppm	4,71	5,76	6,09	3,18	2,28	2,54
5 ppm	3,45	5,37	5,18	2,63	1,61	2,2
10 ppm	3,51	3,13	4,13	2,01	2,27	2,08
50 ppm	0,54	0,38	0,84	0,91	0,79	0,92
Controle	5,11	5,48	6,15	2,65	2,93	2,53

**Tabela 6:** Média geral da medida em centímetros de radícula e hipocótilo para o composto C<sub>18</sub>MImCl nas três repetições.

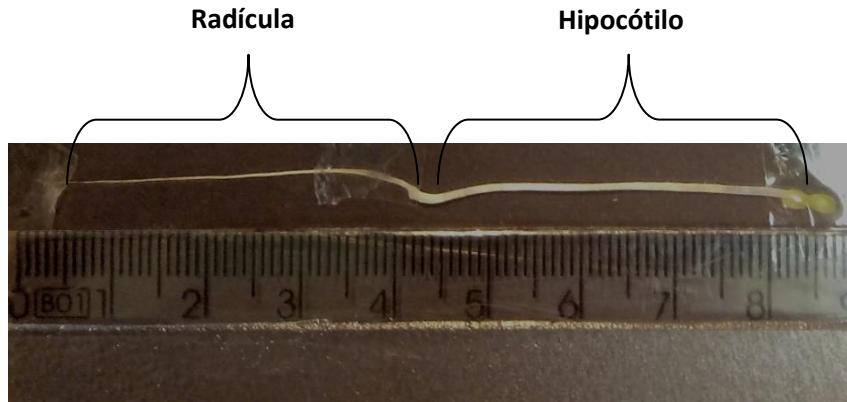
Concentrações	Radícula			Hipocótilo		
	1 ppm	4,88	5,02	5,1	2,36	2,27
2,5 ppm	4,82	5,88	5,33	2,8	2,26	2,6
5 ppm	4,46	4,79	4,81	2,46	2,19	2,25
10 ppm	3,74	2,86	3,22	2,25	1,53	1,84
50 ppm	0,77	0,73	0,57	1,2	1,01	0,4
Controle	5,12	5,5	6,4	3,34	2,77	2,47

As sementes expostas aos sais imidazólicos tiveram quase 100% de germinação em 24 horas, assim como as do grupo-controle expostas à água.



### 3.2 Comparação do tamanho da radícula e do hipocótilo de *Lactuca sativa*

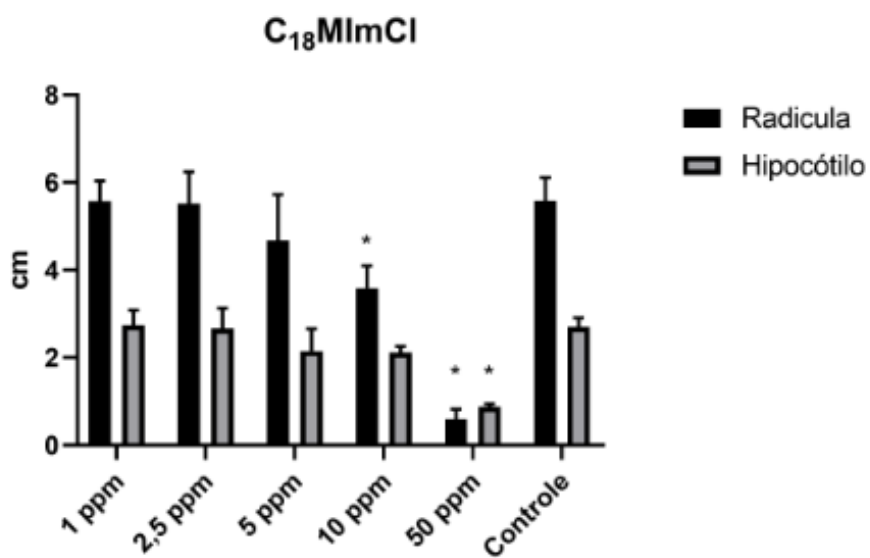
O tamanho da radícula e do hipocótilo foi medido em centímetros para cada produto químico utilizado, bem como seu grupo-controle. Na figura 45, pode-se observar como foi feita a área de medição da plântula.



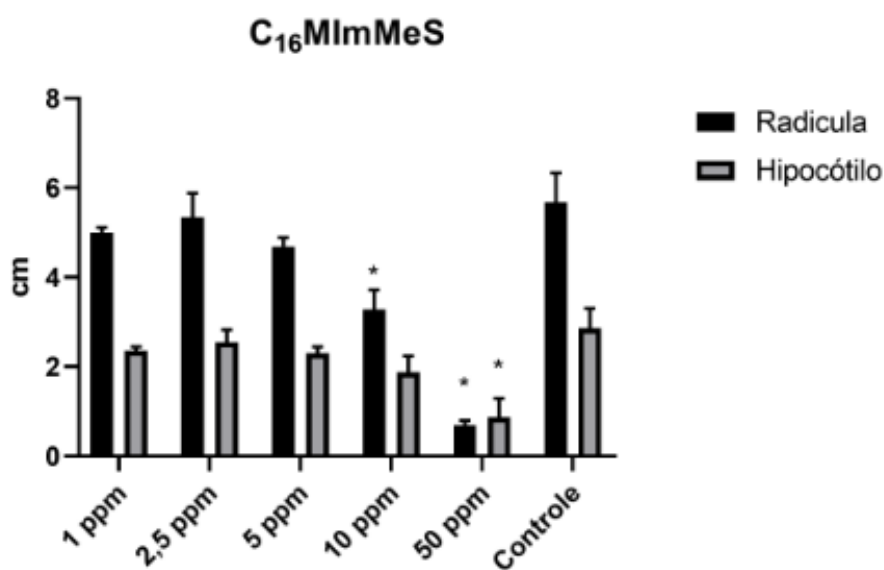
**Figura 43:** Exemplo de medição da radícula e do hipocótilo das plântulas de *Lactuca sativa*.

### 3.2 Análise do tamanho de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* exposta aos sais imidazólicos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl.

O tamanho da radícula e do hipocótilo foi medido em centímetros para cada tratamento e seu grupo controle. Nas Figuras 46 e 47 estão representadas a média do tamanho de radícula e hipocótilo (cm) das sementes germinadas para os sais imidazólicos. Não houve diferença estatística entre os compostos C<sub>16</sub>MImMeS e C<sub>18</sub>MImCl ( $p > 0,05$ ) tanto nas medições de radícula e hipocótilo.



**Figura 46:** Média do tamanho de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* para o composto C<sub>18</sub>MImCl em comparação ao grupo controle.



**Figura 47:** Média do tamanho de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* para o composto C<sub>16</sub>MImMeS em comparação ao grupo controle.

#### 4. DISCUSSÃO

O uso de inseticidas no controle de vetores pode causar impactos negativos ao meio ambiente, causando danos para organismos não alvos. Em nosso estudo, os sais imidazólicos foram testados em sementes de alface, analisando seus efeitos sobre as sementes e posteriormente sobre as plântulas. Os resultados obtidos indicam que os sais imidazólicos parecem influenciar na quebra da dormência das sementes, pois elas germinaram quase 100% em 24 horas. No grupo-controle tratado com água, as sementes alcançaram 100% de germinação somente após dois dias. No grupo-controle neutro, em três concentrações testadas, as sementes germinaram 100% após dois dias. Contudo não houve germinação completa das sementes após o sétimo dia do estudo. A alface é uma hortaliça cuja dormência restringe-se à presença de oxigênio e de temperatura ótima que pode variar entre 20 e 30 graus. Ela não necessita de fatores físicos ou mecânicos para sua quebra de dormência, o que geralmente ocorre em dois dias (Bewley & Black, 1994).

As sementes germinadas após o sétimo dia foram medidas em centímetros para verificar o desenvolvimento das plântulas (incluindo as radículas e os hipocótilos). As plântulas expostas aos sais imidazólicos atingiram um tamanho médio de (4cm) para a radícula e para o hipocótilo, tamanho similar ao do grupo-controle. Os sais imidazólicos permitiram, além da germinação, o desenvolvimento das plântulas mesmo em concentrações 50 vezes (1000µg/L) maiores que a sua LC<sub>99</sub>. (20µg/L), concentração esta utilizada para causar a mortalidade de 100% de larvas de *Aedes aegypti* em até 48 horas, como demonstrado em estudo anterior. (Goellner et al., 2018). A inibição de germinação, assim como a inibição do desenvolvimento, também pode estar relacionada a processos de seleção. Tais alterações no padrão de germinação podem resultar de efeitos sobre a permeabilidade das membranas, a transcrição do DNA e tradução do RNA, a respiração, por sequestro de oxigênio (fenóis), a conformação de enzimas e de receptores (Aquila, 2000). Contudo, estudos moleculares devem ser conduzidos com plântulas de alface tratadas com os sais imidazólicos, para que se possa afirmar se realmente o organofosforado poderia agir no DNA e RNA da planta.

Alguns autores como Aragão et al. (2017) autores vêm investigando o papel de compostos químicos derivados de plantas e que possuem potencial inseticida e que sejam menos agressivos para o ambiente. Aragão et al. (2017) testaram diferentes extratos (aquoso, hidroalcoólico e hexano) de *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) em *L. sativa* e observaram que todos os extratos influenciaram negativamente na germinação e no crescimento da planta, além de interferir em seus cromossomos. Vieira et al. (2018) avaliaram efeitos fitotóxicos de extrato aquoso dos frutos e de folhas frescas e secas de *Morus nigra* (Moraceae) em *L. sativa* e observaram que o extrato das folhas frescas e secas dificultaram um pouco o tempo de germinação e de crescimento. Além disso, causaram deformidade nas folhas e nas raízes. Lungu et al. (2011) utilizaram extratos etanólicos de *Melia azedarach* (Meliaceae) para testar possíveis efeitos fitotóxicos em *L. sativa*. Os autores observaram que o uso do extrato aquoso de folhas e de frutos inibiu completamente a germinação das sementes da planta testada. Interessante é que *M. azedarach* também tem sido estudada para o controle de larvas de mosquitos (Nathan et al., 2006; Prophiro et al., 2008; Trudel & Bomblies, 2011; Ramanibai & Velayutham, 2015; Anbu et al., 2016). Assim, nas condições em que foram testados, os sais podem servir como alelopáticos positivos para *L. sativa*. Dessa forma, seria muito importante que os sais imidazólicos fossem testados em outros insetos de importância agrícola, bem como em outras espécies-modelo de plantas para se comprovar sua inocuidade no ambiente.

## 5. CONCLUSÕES

- I. Os sais imidazólicos não apresentaram toxicidade para as sementes de *Lactuca sativa*, permitindo sua germinação em até 100% nas primeiras 24 horas;
- II. As radículas e os hipocótilos das plântulas de *L. sativa* expostas aos sais imidazólicos obtiveram tamanho muito próximo ao grupo-controle, para ambos os sais;

## REFERÊNCIAS

- Anbu P, Murugan K, Madhiyazhagan P, Dinesh D, Subramaniam J, Panneerselvam C, Suresh U, Alarfaj AA, Munusamy MA, Higuchi A, Hwang JS, Kumar S, Nicoletti M, Benelli G. (2016). Green-synthesised nanoparticles from *Melia azedarach* seeds and the cyclopoid crustacean *Cyclops vernalis*: an eco-friendly route to control the malaria vector *Anopheles stephensi*? **Nat Prod Res.** 30(18):2077-84. doi: 10.1080/14786419.2015.1114935.
- Aquila MEA. 2000. Efeito alelopático de *Ilexparaguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. Iheringia, **Série Botânica**, 53:51-66.
- Aragão FB, Queiroz VT, Ferreira A, Costa AV, Carrijo TT, Andrade-Vieira LF. 2017. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Rev. biol. Trop.** 65(2): 435-443.
- Azevedo F A, Chasin AAM. 2003. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima. 322p.
- Bewley JD, Black M. 1994. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press. 445 p.
- Bouldin JL, Farris JL, Moore MT, Stephens WW, Cooper CM. 2005. Evaluated fate and effects of atrazine and lambda-cyhalothrin in vegetated and unvegetated microcosms. **Environ Toxicol**, 20:487–498.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília : Mapa/ACS, 399 p.
- Chon SU, Coutts JH, Nelson CJ. 2000. Effects of light, growth media, and seedling orientation on bioassays of alfalfa autotoxicity. **Agronomy Journal**, Madison, 92(4):715-720.
- Corbel V, Achee NL, Chandre F, Coulibaly MB, Dusfour I, Fonseca DM, Grieco J, Juntarajumnong W, Lenhart A, Martins AJ, Moyes C, Ng LC, Pinto J, Raghavendra K, Vatandoost H, Vontas J, Weetman D, Fouque F, Velayudhan R, David JP. 2016. Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). **PloS Negl Trop Dis.** 10(12).
- EFSA - European Food Safety Authority. 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance lambda-cyhalothrin. **EFSA Journal**, 12(5):3677.
- Filgueira FAR. 2003. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v.171, p.501-523.

- Floss LE. 2011. **Fisiologia de plantas cultivadas**. O estudo que esta por trás do que se vê. 5. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo. 734p.
- Goellner E, Schmitt AT, Couto JL, Muller ND, Pilz-Junior HL, Schrekker HS, Silva CE, Silva OS. 2018. Larvicidal and residual activity of imidazolium salts against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Pest Manag Sci**, 74: 1013–1019.
- Gomes LS, Silva FA, Barbosa S, Kummrow F. 2012. Ecotoxicity of sludges generated by textile industries: a review. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, Itajaí, 7(1):89-96.
- Gomes TM, Botrel TA, Modolo VA, Oliveira RF. 2005. Aplicação de CO<sub>2</sub> via água de irrigação na cultura da alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, 23(2):p. 316-319.
- Gu BG, Wang HM, Chen WL, Cai DJ, Shan ZJ. 2007. Risk assessment of lambda-cyhalothrin on aquatic organisms in paddy field in China. **Regul Toxicol Pharmacol** 48:69–74.
- Hoffmann CEF, Neves LAS, Bastos CF, Wallau GL. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactucasativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, 6(1):11-21.
- Lungu L, Popa CV, Morris J, Savoiu M. 2011. Evaluation of phytotoxic activity of *Melia azedarach* L. extracts on *Lactuca sativa* L. **Rom. Biotech. Lett.** 16: 6089-6095.
- Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I, Raghavendra K, Pinto J, Corbel V, David JP, Weetman D. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Negl Trop Dis**. 2017 Jul 20;11(7).
- Nathan SS, Savitha G, George DK, Narmadha A, Suganya L, Chung PG. 2006. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresour Technol**. 97(11):1316-23.
- Palmieri MJ. 2016. ***Lactuca sativa*: bioindicador para análise do efeito genotóxico de peçonhas**. 2016. 152 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) -Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Pelegriani NNB, Paterniani JES, Carniato JG, Silva NB, Pelegriani RT. 2006. Estudo da sensibilidade de sementes de *Eruca sativa* (rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA). **Anais...** João Pessoa - PB.
- Piña-Rodrigues FC, Figliolia MB, Peixoto MC. 2004. Teste de qualidade. In: Ferreira AG, Borghetti F. (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. cap. 18:283-297.
- Prophiro JS, Rossi JC, Pedroso MF, Kanis LA, Silva OS. 2008. Leaf extracts of *Melia azedarach* Linnaeus (Sapindales: Meliaceae) act as larvicide against *Aedes*

*aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop.** 41(6):560-4.

- Ramanibai R, Velayutham K. 2015. Bioactive compound synthesis of Ag nanoparticles from leaves of *Melia azedarach* and its control for mosquito larvae. **Res Vet Sci.** 2015 Feb; 98:82-8. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.11.009
- Ribeiro LO, Barbosa S, Balieiro FP, Beijo LA, Santos BR, GouveacmCP, Paiva LV. 2012. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, 10(2): 220-225.
- Souza Filho, A. P. S.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório- Revisão crítica. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.
- Trudel RE, Bomblies A. 2011. Larvicidal effects of Chinaberry (*Melia azedarach*) powder on *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. **Parasit Vectors.** 10;4:72. doi: 10.1186/1756-3305-4-72.
- USEPA - Environmental Protection Agency. 2009. **Revised Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion**; EPA 738-R-06-030; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing office: Washington DC. 29 p.
- Vieira LR, Silva ER, Soares GLG, Fior CS, Ethur EM, Hoehne L, Freitas EM. 2018. Phytotoxic effects of *Morus nigra* aqueous extract on germination and seedling growth of *Lactuca sativa*. **Rodriguésia** 69 (4):2153-2161.
- Wang C, Jiang K, Wu B, Zhou J, Lv Y. 2018. Silver nanoparticles with different particle sizes enhance the allelopathic effects of Canada goldenrod on the seed germination and seedling development of lettuce. **Ecotoxicology.** 27(8):1116-1125. doi: 10.1007/s10646-018-1966-9.
- Wang C, Xiao H, Zhao L, Liu J, Wang L, Zhang F, Shi Y, Du D. 2016. The allelopathic effects of invasive plant *Solidago canadensis* on seed germination and growth of *Lactuca sativa* enhanced by different types of acid deposition. **Ecotoxicology.** 25(3):555-62. doi: 10.1007/s10646-016-1614-1
- WHO - World Health Organization. 2008. **WHO Specifications and evaluations for Public health pesticides.** Delthametrin. 58 p.
- Yan ZQ, Wang DD, Ding L, Cui HY, Jin H, Yang XY, Yang JS, Qin B. 2015. Mechanism of artemisinin phytotoxicity action: induction of reactive oxygen species and cell death in lettuce seedlings. **Plant Physiol Biochem.** 88:53-9. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.01.010.
- Žaltauskaite J, Čypaite A. 2008. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. **Environmental Research, Engineering and Management**, Kaunas, 46(4):42-47.

