

Alessandra Theodoro Laranja

Efeito da Cafeína no Desenvolvimento,
Mortalidade, Longevidade e Padrão de
Esterases de *Aedes aegypti*.



1910000988



ALESSANDRA THEODORO LARANJA

**EFEITO DA CAFEÍNA NO DESENVOLVIMENTO,
MORTALIDADE, LONGEVIDADE E PADRÃO DE
ESTERASES DE *Aedes aegypti*.**

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP
2001



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética

ALESSANDRA THEODORO LARANJA

**EFEITO DA CAFEÍNA NO DESENVOLVIMENTO,
MORTALIDADE, LONGEVIDADE E PADRÃO DE
ESTERASES DE *Aedes aegypti*.**



T 988/01

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas - Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

São José do Rio Preto-SP
2001



575
L 318e

Genética. Toxicologia

Assunto CAPES: 2.02.00.00 - 5 - Genética

Laranja, Alessandra Theodoro.

Efeito da cafeína no desenvolvimento, mortalidade, longevidade e padrão de esterases de *Aedes aegypti*. / Alessandra Theodoro Laranja. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2001.

112 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Genética. 2. Cafeína. 3. *Aedes aegypti*. 4. Desenvolvimento. 5. Mortalidade. 6. Longevidade. 7. Esterases. I. Bicudo, Hermione Elly Melara de Campos. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

ALESSANDRA THEODORO LARANJA

**EFEITO DA CAFEÍNA NO DESENVOLVIMENTO, MORTALIDADE,
LONGEVIDADE E PADRÃO DE ESTERASES DE *Aedes aegypti*.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.



O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, com auxílio-bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.



Aos meus pais, Claudio e Neusa, e ao meu
irmão, Clauber, cujo apoio, carinho e incentivo
constantes, permitiram que eu seguisse meu
caminho com força e coragem, possibilitando,
assim, a realização deste trabalho,

Dedico...



Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível com o auxílio e apoio de muitas pessoas, sem as quais o mesmo jamais se concretizaria. A minha gratidão, a todos, é eterna. Porém, gostaria de deixar aqui, os meus mais profundos agradecimentos a pessoas que estiveram presentes em momentos essenciais do trabalho:

à Prof^ª. Dr^ª. **Hermione Elly Melara de Campos Bicudo**, grande exemplo de profissional e de pessoa. Muito obrigada pelo carinho, apoio, dedicação, enfim, muito obrigada por ter acreditado em mim, e desta forma, ter dado-me a chance de crescer como pesquisadora e como ser humano, vencendo obstáculos, sempre presentes, o que foi fundamental para o enriquecimento de minha vida,

à Prof^ª. Dr^ª. **Mary M. Itoyama**, que sempre esteve pronta a ajudar e a transmitir os seus conhecimentos. Muito obrigada pela análise cuidadosa de meu trabalho, a qual foi feita com extremo carinho,

à Prof^ª. Dr^ª. **Toshie Kawano**, pela atenção e análise de meu trabalho, pelas sugestões que foram de grande importância e pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento do mesmo,

às Prof^{as}. Dr^{as}. **Marlene K. H. Kobayashi, Maria Tercília V. de A. Oliveira e Lilian M. Ravazzi** pela amizade, incentivo e disponibilidade em ajudar sempre que preciso,

à Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE – UNESP e ao Departamento de Biologia, pelas condições materiais que permitiram a realização deste trabalho,

ao Departamento de Zoologia do IBILCE e ao funcionário **Jorge Feytag Buchdid**, pelo fornecimento dos camundongos que alimentaram os mosquitos,

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado e apoio financeiro,

à SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) de São José do Rio Preto - SP, pelo fornecimento de ovos e larvas de *Aedes aegypti*, bem como de informações sobre a incidência de dengue na região,

aos professores do Curso de Ciências Biológicas do IBILCE, pela amizade, incentivo, conhecimento e experiência profissional que possibilitaram meu crescimento científico,



ao Prof. Dr. **Antônio José Manzato**, do Departamento de Ciência da Computação e Estatística deste Instituto, pela assessoria quanto à parte estatística do trabalho,

às Prof^{as}. que, ao longo deste trabalho, ocuparam o cargo de Coordenadoras do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética, Prof^a. Dr^a. **Ana Elizabete Silva** e Prof^a. Dr^a. **Cláudia M. Ap. Carareto**, pela atenção e orientação na parte burocrática,

ao Prof. Dr. **Arif Cais**, do Departamento de Zoologia deste Instituto, pelo esclarecimento de alguns termos zoológicos e à Prof^a. Dr^a. **Iêda A. Pastre Fertonani**, do Departamento de Química e Geociências, também deste Instituto, por fornecer o significado de algumas siglas químicas,

à Prof^a. Dr^a. **Emília Emico Miya Mori**, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, pela presteza no atendimento e envio de separatas referentes à composição química do café e ao Prof. Dr. **José Francisco Lopes Filho**, do Departamento de Engenharia de Alimentos deste Instituto, pela ajuda no mesmo objetivo,

aos funcionários do Departamento de Biologia deste Instituto, os quais sempre estiveram dispostos a auxiliar quando necessário, em especial à **Simone Carvalho**,

ao **Márcio Santana da Silva**, funcionário do Laboratório de Recursos Audiovisuais, e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial ao **Oscar J. Marques** e à **Rosana M. G. Ferro**, pelo atendimento que sempre foi feito com muito carinho e dedicação,

às funcionárias da Biblioteca, **Elza M. Sato**, pelo eficiente serviço de comutação bibliográfica, e **Elaine Ap. Silva** pela revisão das Referências Bibliográficas,

às amigas e companheiras do Laboratório de Vetores, **Adriana, Alessandra Bernardo, Cássia, Cibele e Lilian**, pelo convívio agradável, solidário e carinhoso,

à querida amiga, **Rita de Cássia Sousa Polezzi**, minha companheira de “salinha”, a qual sempre foi extremamente dedicada e grande incentivadora. Muito obrigada pela agradável convivência diária, pela paciência, pela

disponibilidade em ajudar e por todos os conhecimentos que obtive por meio de seu auxílio,

aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e solidariedade, em especial à **Mariangela, Alessandra Trovó, Guilherme, Milla, Andréia, Rosa Bosso, Jucimara, Ana Paula, Cláudia Pacheco, Fátima Adriana, Marcos Estécio,**

a todos os amigos da graduação, que jamais serão esquecidos, em especial à **Raquel, Elis, Cecília e Hamilton,**

ao **Michel**, por estar ao meu lado, sempre me apoiando, e à **Regina**, pelo carinho e incentivo constantes,

às minhas queridas avós **Oralina e Luzia**, por todo amor e dedicação,

à minha tia **Dirce Ap. Dias da Silva**, pelo carinho, incentivo e também por fazer com muito capricho as gaiolas que utilizei nos meus experimentos,

ao meu irmão **Clauber**, pela paciência, amizade e apoio, que foram essenciais em minha trajetória,

aos meus pais **Claudio e Neusa**, que me formaram com muito amor e com muito trabalho,

ao Mestre de todos os mestres, **Jesus Cristo**, por nos deixar riquíssimos ensinamentos, por meio dos quais, temos a certeza de que estamos trilhando o caminho correto,

a **Deus**, por tudo.

“A mais longa caminhada começa com um passo.”

(autor desconhecido)



RETRATOS

*No que falas e escreves, a
cultura te revela a imagem do
cérebro, à frente
dos semelhantes.*

*Nas provações que suportas
com paciência e naquilo que
fazes com amor, a caridade,
perante os outros,
te mostra o RETRATO,
do coração.*

EMMANUEL

(Mensagem recebida pelo médium
Francisco Cândido Xavier)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1. A cafeína: sua ocorrência e uso	2
2. Metabolismo da cafeína	4
3. Efeitos fisiológicos da cafeína	8
4. Ação mutagênica e efeitos sinérgicos da cafeína	13
5. <i>Aedes aegypti</i>	19
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIAL E MÉTODOS	29
1. Organismo e procedência	30
2. Manutenção em laboratório	30
3. Experimentos	35
4. Eletroforese	39
4.1. Preparo das amostras	39
4.2. Preparo dos géis	40
4.3. Coloração	41
4.4. Secagem dos géis	42
4.5. Soluções	42
5. Análise de imagem	43
6. Análise estatística	44
IV. RESULTADOS	45
1. Experimento I	46
2. Experimentos IV a XIII	48
2.1. Produtividade	48
2.2. Taxa de eclosão, produtividade de adultos, por sexo, mortalidade e período de emergência	50
2.3. Tempo de desenvolvimento	53



2.4. Longevidade dos adultos	55
3. Experimentos XIV a XVI	57
3.1. Produtividade, mortalidade e período de emergência	57
3.2. Tempo de desenvolvimento	59
3.3. Mortalidade de larvas e pupas e longevidade de adultos	59
4. Esterases	59
V. DISCUSSÃO	80
VI. CONCLUSÕES	91
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
VIII. RESUMO	109
IX. ABSTRACT	111

I. INTRODUÇÃO



1. A cafeína: sua ocorrência e uso

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma purina, cuja fórmula empírica é $C_8H_{11}N_4O_2$ (Timson, 1977). Essa substância é um eletrólito fraco, não-dissociável, de pH fisiológico (Bianchi, 1962 *apud* Dorrbecker *et al.*, 1988). Ocorre, naturalmente, em um grande número de plantas, das quais são preparadas bebidas estimulantes.

De acordo com a literatura, a cafeína é consumida pelo homem, desde os tempos remotos. Quase todas as civilizações antigas cultivavam plantas que continham cafeína e acredita-se que o homem do paleolítico tenha descoberto as principais fontes dessa substância. Registros do uso de chá, datam de pelo menos 1600 anos e, possivelmente, de 4700 anos na China, enquanto que registros do uso de café, na Etiópia, datam de pelo menos 1000 anos, com evidências de uso há 1300 anos (revisão em Timson, 1977; Griffiths & Woodson, 1988).

Além do café e do chá, muitas outras bebidas contêm cafeína. Timson (1977) relaciona várias delas, informando também seu teor de cafeína. Um exemplo é o guaraná, preparado de sementes de *Paullinia cupana* ou de *Paullinia sorbilis*, na área da Amazônia Central, onde estas plantas são cultivadas. Outra planta, conhecida de longa data, e da qual também se prepara uma bebida que contém cafeína é a *Ilex paraguensis*, da qual o mate é preparado. Esta planta é nativa das montanhas do Paraguai e é extensivamente cultivada na Argentina e sul do Brasil. A cafeína contida no mate pode chegar a 0,7%. Outro exemplo é a *Cola nitida*, uma árvore nativa do oeste da África, agora também amplamente cultivada no Brasil, Índia e Jamaica. Um tipo de chá é preparado do pó de suas sementes. As bebidas cola aromatizadas são, em parte, manufaturadas da noz de *Cola acuminata*. Uma garrafa de 340 mL de uma bebida de cola contém de 35 a 55 mg de cafeína. Ainda segundo o mesmo autor, bebidas de chocolate, preparadas das sementes de *Theobroma cacao*, contêm, aproximadamente, 1% de teobromina e cafeína em quantidade menor.

Também de acordo com Timson (1977), provavelmente, a bebida não alcoólica mais amplamente consumida pelo homem é o chá. Este é preparado das folhas de *Camellia sinensis*, um arbusto nativo de Assam e do sul



da China, agora extensivamente cultivado na Índia, Sri Lanka e muitos outros países na Ásia e leste da África. A cafeína contida nas folhas, das quais se prepara o chá, é de aproximadamente 2%. Já o café é preparado das frutas de espécies de *Coffea*, especialmente *C. arabica*, a qual fornece, aproximadamente, 90% do suprimento de café do mundo. Os grãos de *C. arabica* contêm de 0,7 a 1,5% de cafeína. A planta é nativa da Etiópia e é também amplamente cultivada na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia e Costa Rica. Outras espécies de *Coffea* utilizadas incluem *C. liberica*, *C. robusta* e *C. canephora*.

Em média, uma xícara de café contém de 95 a 125 mg de cafeína. Chá, chocolate e coca-cola contêm, aproximadamente, a metade dessa quantidade. Assim, soluções de 0,01 a 0,05% de cafeína são consumidas diariamente pelo homem (Mendelson, 1974).

Os níveis de cafeína no café dependem de vários fatores. De acordo com Verlengia *et al.* (1965), a bebida obtida a partir de cafés de moenda fina, apresenta um maior teor em cafeína do que a obtida a partir dos cafés de moenda grossa. Os processos de preparo da bebida parecem ter também influência sobre o teor em cafeína: o percolador extrai mais cafeína do que o filtro de flanela e este mais do que a máquina de expresso.

Em adição à sua ampla ocorrência como um constituinte de bebidas não alcoólicas, a cafeína também é utilizada na medicina. Segundo Timson (1977), a cafeína raramente é utilizada sozinha, sendo mais usualmente prescrita em combinação com outras drogas, sobre as quais tem um efeito ativador, e também porque ela pode agir contrariamente aos efeitos indesejáveis da outra droga. A cafeína tem sido usada com muito sucesso em combinação com isoxsupina e “acetominophen” no tratamento de tensão pré-menstrual e dismenorréia primária e também tem sido utilizada na medicina veterinária, principalmente como um estimulante cardíaco e respiratório.

As ações farmacológicas da cafeína são diversas, incluindo, basicamente, o estímulo de muitos centros no sistema nervoso central (Mante & Minneman, 1990).



2. Metabolismo da cafeína

A cafeína é quase que completamente transformada no homem, sendo somente cerca de 1 a 3% de uma dose administrada, eliminada de forma inalterada na urina (Scott *et al.*, 1988). Ela também aparece de forma não alterada na saliva, sêmen e leite materno (Jordá *et al.*, 1989).

Conforme Timson (1977), no homem, a cafeína é rapidamente absorvida do trato gastrointestinal e sob condições experimentais tem sido detectada no plasma dentro de cinco minutos após a ingestão. Picos de níveis plasmáticos foram encontrados 50 a 75 minutos após o consumo de cafeína. Esse autor relata um experimento em que 12 homens foram injetados intravenosamente com 7 mg de cafeína por quilograma de peso corpóreo. A meia-vida metabólica da cafeína no plasma desses homens foi avaliada em 3,5 horas (obteve-se uma escala de 2,5 a 4,5 horas). Já em outro experimento, após a ingestão de 100 mg de cafeína por três indivíduos, a meia-vida variou de 3,5 a 6,5 horas, em dois indivíduos, e de 6,0 a 10,5 horas, no terceiro.

Cunningham (1970, *apud* Burg & Werner, 1972) relatou que a vida média da cafeína no plasma, fígado, músculo e rins do porco é de, aproximadamente, 13 horas, sendo que no tecido gorduroso do dorso desse mesmo animal é de 20 horas. Para o homem, de acordo com o mesmo autor, a meia-vida da cafeína é de cerca de três horas, sendo este mesmo valor encontrado em testes realizados com camundongos. Nesses últimos organismos, a cafeína, administrada oralmente, apareceu em todos os tecidos dentro de cinco minutos e alcançou níveis iguais, por grama de água tecidual, nos pulmões, músculo esquelético, testículos e fígado, dentro de uma hora. Resultados semelhantes foram relatados para machos de coelhos White neozelandeses, após uma dose intravenosa de cafeína a 4 mg/Kg. Outros estudos têm mostrado que a cafeína distribui-se livremente no sistema nervoso central, em adultos e fetos de ratos e humanos (Dorrbecker *et al.*, 1988).

A rapidez do metabolismo da cafeína garante que haja pouco ou nenhum acúmulo diário da droga. Experimentos no homem, envolvendo consumo diário de oito xícaras de café, cada xícara contendo cerca de 80 mg de cafeína, em

um período de sete horas, mostraram que, aproximadamente, 180 mg da droga estavam presentes no corpo, uma hora após a última xícara de café. A droga tinha praticamente desaparecido do corpo pela manhã seguinte. Consumidores habituais de bebidas contendo cafeína, entretanto, requerem cerca de sete dias de total abstinência de todas as fontes de cafeína, antes de sua completa ausência nos extratos sanguíneos (Timson, 1977).

De acordo com Jordá *et al.* (1989), a meia-vida da cafeína é prolongada na gravidez e é surpreendentemente lenta no feto e recém-nascido (65 a 110 horas). A cafeína atravessa a placenta, alcançando concentrações, no líquido amniótico, cordão umbilical e cérebro fetal, aproximadas àquelas encontradas no plasma materno (Sommer *et al.*, 1975 e Goldstein & Warren, 1962 *apud* Dorrbecker *et al.*, 1988).

A concentração de cafeína nos ovários e testículos, após o consumo normal, é por volta de 1 mg/L. Nestes tecidos, a cafeína é quase que completamente transformada em ácido úrico metilado e cafeína desmetilada (Mendelson, 1974).

A liberação de cafeína no plasma é um indicador da função hepática perturbada (Varagnolo *et al.*, 1989). Em pacientes que apresentavam cirrose hepática, a liberação de cafeína no plasma foi significativamente reduzida e sua meia-vida significativamente prolongada. Alterações menores foram encontradas em pacientes com doença do fígado não cirrótica. A liberação reduzida de cafeína em pacientes com doença do fígado crônica é usualmente atribuída à redução no funcionamento da massa de hepatócitos. Entretanto, o atraso na eliminação pode refletir alterações específicas na biotransformação da cafeína (Scott *et al.*, 1988).

Foi analisada a diferença sexual farmacocinética da cafeína no gado de várias idades. Os resultados mostraram diferença significativa nas idades superiores a oito meses, sendo as fêmeas metabolizadoras mais ativas do que os machos, suportando a hipótese de que o metabolismo de xenobióticos é sexualmente diferente nos ruminantes (Janus & Antoszek, 2000).

A cafeína, no homem, é metabolizada primariamente por desmetilação hepática e oxidação sob a influência do citocromo microssomal



hepático P_{450} (Scott *et al.*, 1988). O primeiro passo desse metabolismo parece ser a remoção do grupo 3-metil, produzindo paraxantina (1,7-dimetilxantina) (Warren, 1969). A paraxantina aparece tanto no plasma, como em células sanguíneas de indivíduos descafeinados, isto é, desprovidos de cafeína, dentro de três horas após a administração oral de cafeína e parte é excretada na urina. A maior parte da paraxantina é metabolizada em 1-metilxantina e 7-metilxantina, ambas aparecendo na urina. A maior parte da 1-metilxantina torna-se ácido 1-metilúrico e é excretado como tal, mas o ácido 7-metilúrico não é encontrado na urina após a ingestão de cafeína.

Uma via secundária do metabolismo da cafeína pode ser a remoção do grupo 7-metil para formar teofilina (1,3-dimetilxantina) a qual não é excretada, porém a sua quebra produz o ácido 1,3-dimetilúrico que é excretado. A teofilina tem sido detectada como um metabólito da cafeína no líquido amniótico. A teobromina (3,7-dimetilxantina) não foi detectada como um metabólito da cafeína na urina, mas tem sido detectada como um metabólito dessa substância no líquido amniótico. A desmetilação da cafeína, no homem, não parece passar do estágio monometil, visto que não ocorre acúmulo de xantina na urina ou aumento na excreção de ácido úrico (Timson, 1977).

Muitos estudos têm investigado a utilidade clínica de metilxantinas como sondas, *in vivo*, para a avaliação da função enzimática, metabolizadora de drogas, do fígado. Estas investigações demonstraram que a reação de desmetilação reflete, largamente, a atividade hepática do citocromo P_{1-450} , sendo a via dominante, a desmetilação da posição três (Varagnolo *et al.*, 1989). A N-desmetilação da cafeína pelos microsossomos do fígado de rato e do homem, leva à produção de teobromina, paraxantina e teofilina. Em fígado de rato, a presença de um inibidor de P_{450} reduz a taxa desses produtos, respectivamente, em 32%, 68% e 42%. Na presença de um inibidor da monooxigenase, a inibição atinge valores de 66%, 48% e 73%, respectivamente. Na presença de ambos os inibidores, a inibição é de 95%, 84% e 94%, na seqüência dos produtos. Os resultados sugeriram que a monooxigenase é responsável, primariamente, pela produção de teobromina e teofilina, enquanto que P_{450} o é pela de paraxantina (Chung & Cha, 1997). O envolvimento do



citocromo P₄₅₀, na biotransformação da cafeína, no homem, foi anteriormente indicado por dados de Grant *et al.* (1987).

No cachorro, o metabolismo da cafeína parece ser essencialmente o mesmo que ocorre nos humanos. No rato foi demonstrado que a cafeína penetra rapidamente nos compartimentos intracelulares dos tecidos e acumula-se no citoplasma. Cafeína 1-metil [¹⁴C]-marcada e seus metabólitos penetram nos tecidos fetais de ratas grávidas e acumulam-se no cérebro do feto. Seguindo-se a administração de [³H, ¹⁴C]-cafeína a camundongos machos CD-1, a uma dose de 25 mg por quilograma do peso corpóreo, a excreção de metabólitos identificáveis ocorreu rapidamente, e foi 80% completa em oito horas. Entre 3 e 6%, da cafeína, foram encontrados não alterados na urina. Os principais metabólitos foram paraxantina, 3-metilxantina, 7-metilxantina, ácido 1,3-dimetilúrico e ácido 1-metilúrico (Timson, 1977).

Estudos realizados em *Aspergillus niger* mostraram que esse organismo pode metabolizar cafeína produzindo teofilina e 3-metilxantina. Teofilina também foi o primeiro produto no metabolismo da cafeína por uma linhagem de *Penicillium roqueforti*. Esta linhagem foi capaz de desenvolver-se no meio contendo 0,04 M de cafeína, como a única fonte de nitrogênio. O desenvolvimento foi acompanhado pela remoção completa de cafeína do meio. *P. roqueforti* e uma espécie de *Stemphylium* foram capazes de utilizar cafeína, teobromina ou xantina como a única fonte ou de carbono, ou de nitrogênio. Foi relatado que existe uma via não enzimática em *Escherichia coli* para a desmetilação da cafeína, e nem cafeína, nem teofilina foi metabolizada por *Staphylococcus aureus*, embora ambos os compostos sejam incorporados pelas células. Entretanto, *Bacillus coagulans* pode utilizar cafeína como a única fonte de nitrogênio ou de carbono. Parece que as vias metabólicas seguidas pela cafeína em microorganismos, são várias e diferentes das que ocorrem nos mamíferos. Isto pode ser parte da explicação para a diferença na resposta mutagênica à cafeína entre mamíferos e microorganismos (Timson, 1977).

Estresse causado pelo frio e ingestão de cafeína podem aumentar as catecolaminas no plasma, as concentrações de ácido graxo livre e a energia do metabolismo (MacNaughton *et al.*, 1990).



3. Efeitos fisiológicos da cafeína

A cafeína é considerada um estimulante cerebral. A literatura mostra que o papel da cafeína na fisiologia, humor e comportamento é complexo, afetando o despertar, a ansiedade e a performance, com efeitos mais acentuados em crianças do que em adultos (Pons *et al.*, 1988). Ingestão excessiva de cafeína pode produzir uma variedade de sintomas psiquiátricos, incluindo ansiedade crônica, depressão, ataques de pânico, psicose e delírio (pequena revisão em Koczapski *et al.*, 1989). Além disso, palpitações e tremor também são atribuídos à cafeína (Koller *et al.*, 1987). Pacientes que fizeram reduções substanciais no consumo de cafeína, tiveram grandes melhoras na ansiedade, irritabilidade, distúrbios do sono, dores de cabeça e sintomas abdominais (Smith, 1988).

A cafeína parece alterar alguns processos metabólicos ou de transporte, que regulam o conjunto de aminoácidos no cérebro. Alterações nos aminoácidos livres foram observadas no sistema nervoso central de camundongos tratados com cafeína por três semanas. A cafeína foi administrada na água e, no final das três semanas, o nível de cafeína no córtex cerebral foi de $113 \pm 19 \mu\text{g/g}$. Um aumento significativo nos níveis de glutamina foi encontrado em todo o cérebro, mas, em algumas regiões, houve redução significativa de glicina, alanina, serina, treonina e GABA (ácido 4-aminobutenóico) (Wajda *et al.*, 1989).

As ações centrais da cafeína, isto é, o fato de ser um estimulante do sistema nervoso central que pode elevar a disposição, aliviar a tensão e aumentar a habilidade de concentração, têm sido analisadas no nível molecular em vários laboratórios. As investigações indicam que ocorre uma interação em um sítio receptor de adenosina, com base em que: a) a cafeína e outras metilxantinas bloqueiam a ação inibidora da adenosina; b) o bloqueio dos receptores de adenosina por xantinas correlaciona-se com o grau de estímulo da atividade locomotora em camundongos e c) o tratamento crônico com cafeína aumenta o número de receptores de adenosina no cérebro (Snyder *et al.*, 1981 e Snyder & Sklar, 1984 *apud* Wajda *et al.*, 1989).

Os efeitos da administração crônica de cafeína nos receptores de adenosina foram estudados em membranas do cérebro de camundongos. Esses animais foram alimentados com uma dieta rica em cafeína (600 mg/Kg), por 15 dias, e sacrificados dois, quatro, oito e quinze dias após a retirada da cafeína da dieta. Comparados com os controles, alimentados com uma dieta regular, os animais que foram alimentados com cafeína, mostraram um aumento no número de receptores de adenosina no cérebro, em regiões do cerebelo e também na parte dianteira do cérebro (Boulenger & Marangos, 1989).

Em *Drosophila melanogaster*, também existem relatos de que a cafeína aumenta o estado de vigília e a atividade motora. Essas moscas, quando tratadas com cafeína, mostraram uma redução dose-dependente do repouso (Shaw *et al.*, 2000).

Os efeitos estimulantes do sistema nervoso central causados pela cafeína, sobre o comportamento programado, foram determinados em ratos treinados para realizar uma determinada tarefa, em um intervalo fixo de cinco minutos (FI). Administrada sozinha, a cafeína produziu uma duplicação da taxa de resposta FI a uma dose de 10 mg/Kg e reduziu essa resposta a uma dose de 32 mg/Kg. Os efeitos da cafeína, neste caso, mostraram-se dose-dependentes (Logan *et al.*, 1989).

O consumo regular de cafeína aparentemente leva à tolerância de seus efeitos. A retirada da cafeína, pela cessação de sua ingestão crônica, causa uma síndrome cujos sintomas incluem dor-de-cabeça, fadiga, dores musculares e obstrução nasal (Zhang & Wells, 1990).

A cafeína está envolvida também com outros aspectos da fisiologia. Por exemplo, sabe-se que a cafeína causa um aumento na secreção gástrica, especialmente de pepsina e ácido hidróclórico livre e pode causar ulceração gástrica. A dose fatal, no homem, é estimada em torno de 10 g, talvez menos em pacientes com doença cardíaca (Timson, 1977).

Um aumento na síntese de uréia foi encontrado em ratos, aos quais foram administradas altas doses de cafeína. Um aumento paralelo na biossíntese de uréia foi também observado em hepatócitos isolados desses ratos, tratados com cafeína, os quais confirmaram uma maior capacidade para a síntese



de uréia induzida por essa substância. O aumento apareceu somente após alguns dias de tratamento com cafeína (Jordá *et al.*, 1989).

A cafeína, bem como a metilxantina, um de seus derivados metabólicos, pode liberar Ca^{2+} de estoques intracelulares (David & Pitman, 1996). Tem sido citada, na literatura, como um fator de risco para a osteoporose em humanos, pois, aumentando a excreção urinária do cálcio, o consumo de cafeína pode reduzir a densidade mineral óssea e aumentar a possibilidade de fraturas (Tavani *et al.*, 1995; Conlisk & Galuska, 2000).

Em ratos, a cafeína aumenta a absorção e excreção de cálcio e também aumenta os níveis do hormônio da paratireóide (iPTH) (Glajchen *et al.*, 1988).

Foi observado, também, o efeito da cafeína na contração muscular. Nos músculos esquelético e cardíaco, a cafeína aumenta a sensibilidade ao Ca^{2+} e libera o mesmo do retículo sarcoplasmático, resultando na contração muscular (Gole *et al.*, 1987; Palade *et al.*, 1989). No músculo liso, a cafeína também libera Ca^{2+} celular para induzir uma contração transitória. Além do efeito contrátil, a cafeína tem um potente efeito inibidor em vários músculos lisos. Foi demonstrado que a cafeína inibe a fosfodiesterase do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-cíclico) e aumenta a concentração celular dessa última substância. Assim, o AMP-cíclico inibe contrações do músculo liso, e pode-se admitir que o efeito inibidor da cafeína é mediado por esse composto (Ahn *et al.*, 1988).

Doses de cafeína de 35 a 70 mM provocaram contrações do músculo bucal do molusco *Aplysia*. Segundo os autores Gole *et al.* (1987), os efeitos dessa substância sobre os músculos bucais de *Aplysia* são complexos e não podem ser devidos somente à liberação de Ca^{2+} intracelular estocado. Como em experimentos com músculos de outros animais, a cafeína foi capaz de ativar a contração em meio livre de Ca^{2+} .

Alguns estudos têm relatado que a concentração normal de Na^+ extracelular impede a cafeína de provocar contração de músculos cardíacos na cobaia e no gato. Acredita-se que esse efeito inibidor do Na^+ sobre a contração provocada pela cafeína, ocorra porque íons Ca^{2+} são eliminados da célula por um



sistema de troca $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ tão rápido, quanto a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático pela ação da cafeína (Teraoka *et al.*, 1990).

De acordo com Fryer & Neering (1989), a cafeína é uma das drogas mais amplamente usadas no estudo da excitação-contração acopladas, no músculo, sendo seus efeitos no músculo esquelético, dose-dependentes.

Vários estudos em vertebrados, incluindo ratos e humanos, têm sido realizados com o objetivo de detectar o efeito sobre o desenvolvimento, quando há ingestão materna de cafeína. Os efeitos encontrados incluem atraso no desenvolvimento fetal, envolvendo ambos os sexos, uma diminuição na taxa de desenvolvimento, subsequente, e alta mortalidade no nascimento (Pollard *et al.*, 1987).

Mais de 150 purinas comuns, pirimidinas, derivados de purina e pirimidina, e análogos de vitaminas foram analisados quanto aos efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento de insetos. Esses compostos foram injetados nas pupas de bicho-da-seda, as mariposas *Samia cyntia* e *Callosamia promethea*. Os compostos que tiveram efeitos morfogenéticos foram as metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina), o ácido barbitúrico e alguns de seus análogos. As metilxantinas impediram a iniciação do desenvolvimento do adulto, mas não foram tóxicas para as pupas, muitas das quais viveram mais que dois meses após a injeção. Estes compostos afetaram, especificamente, o sistema nervoso central dos insetos, causando extensas alterações degenerativas no cérebro e gânglios segmentais. Eles impediram o desenvolvimento do adulto por mecanismos que causam danos à atividade neurosecretora no cérebro (Blaustein & Schneiderman, 1960).

Embora as metilxantinas sejam freqüentemente utilizadas como estimulantes pela população humana, pouco é conhecido sobre a sua função natural em plantas. Muitas plantas produzem substâncias endógenas, as quais podem inibir a alimentação dos insetos. Dentre estas substâncias, são encontradas toxinas específicas, compostos semelhantes a feromônios e substâncias de sabor amargo. As metilxantinas naturais e sintéticas possuem essa propriedade de inibir a alimentação de insetos, por isso, são consideradas como pesticidas naturais, que ocorrem em concentrações conhecidas em diversas plantas. Estes efeitos são



devidos, primeiramente, à inibição da atividade de fosfodiesterases e também a um aumento intracelular de AMP-cíclico. A baixas concentrações, metilxantinas são potentes sinergistas de outros pesticidas conhecidos, que ativam a adenilato ciclase em insetos (Nathanson, 1984).

Em experimentos utilizando-se larvas da praga do tabaco, *Manduca sexta*, para estudos sobre os efeitos pesticidas da cafeína, foi preparado um meio de cultura artificial, onde foi juntado, em várias concentrações, pó das folhas de chá (*Camellia sinensis*) ou pó de grãos de café (*Coffea arabica*). Os primeiros instares larvais de *M. sexta* foram colocados para desenvolverem-se em placas que continham este meio. Em concentrações de 0,3 a 10% (por peso) para o café e de 0,1 a 3% para o chá, houve uma inibição dose-dependente da alimentação, associada com hiperatividade e tremores. Em concentrações maiores do que 10% para o café ou 3% para o chá, as larvas morreram dentro de 24 horas (Nathanson, 1984).

Itoyama & Bicudo (1992), usando meios de cultura com concentrações de cafeína iguais a 50, 100, 1000 e 1500 µg/mL, observaram que a produtividade (número de progênie) de *Drosophila prosaltans* tratadas foi significativamente menor que aquela do controle. Adicionalmente, quando as moscas foram transferidas de uma concentração maior para uma menor de cafeína, a produtividade aumentou. O oposto também foi verdadeiro. Os dados mostraram que o efeito da cafeína aumenta com a dose, sendo, portanto, dose-dependente. Ainda nesse mesmo estudo, foi encontrado que a cafeína afeta a oviposição. Quando fêmeas fecundadas, criadas no meio controle, foram colocadas para ovipor durante 12 horas em meios com cafeína, o número de ovos depositados diminuiu com o aumento da concentração dessa droga. Sugeriu-se que a ingestão de cafeína bloqueia a produção de novos folículos causando, assim, um atraso ou decréscimo na oviposição.

Também em *Drosophila prosaltans*, a cafeína, em uma concentração de 2500 µg/mL, causou alterações permanentes, bloqueando a recuperação da produtividade normal, comparada com outras concentrações menores (Itoyama *et al.*, 1998). Também o tempo de desenvolvimento foi afetado pela cafeína em concentrações de 1000 µg/mL e 1500 µg/mL. Por sua vez, a



longevidade média de moscas virgens de *D. prosaltans*, de ambos os sexos, tratadas com cafeína foi significativamente mais curta do que aquela do controle. Entretanto, esse decréscimo não foi correlacionado com a concentração de cafeína. A cafeína geralmente aumenta a longevidade média de fêmeas acasaladas. Os autores admitiram que o bloqueio da ovogênese pela cafeína poderia resultar em uma economia de energia que beneficiaria as fêmeas acasaladas (Itoyama & Bicudo, 1992).

Ainda em estudos realizados em *D. prosaltans* por Itoyama *et al.* (1995), verificou-se: a) que a frequência de acasalamentos foi mais elevada nos controles do que nos experimentos tratados com cafeína; b) que o tempo médio de pré-cópula para as moscas controle foi menor do que aquele para as moscas tratadas (25,9 e 33,2 minutos, respectivamente) e c) que a média de duração de cópula para as moscas controle foi maior do que aquela para as moscas tratadas (27,0 e 25,7 minutos, respectivamente).

4. Ação mutagênica e efeitos sinérgicos da cafeína

Os efeitos genéticos ocasionados pela cafeína podem ser agrupados em duas classes, mutagênese direta e modificação dos efeitos de outros agentes. Como um mutágeno direto, a cafeína pode potencializar a morte celular e produzir aberrações cromossômicas em alguns tipos celulares de mamíferos, *in vitro*, a concentrações muito baixas (Hansson *et al.*, 1982).

Respostas mutagênicas têm sido observadas em vários outros organismos. Em animais inferiores aos mamíferos, existem relatos de que a cafeína é mutagênica para o fungo *Ophiostoma multiannulatum*, no qual foi observada a ocorrência de mutações fisiológicas e também de um grande número de micélios alterados morfológicamente, após o tratamento com essa substância (Fries, 1950). Em *Saccharomyces cerevisiae*, Bard *et al.* (1980) detectaram indivíduos exibindo, naturalmente, diferentes níveis de resistência à cafeína. A cafeína também mostrou-se mutagênica em *Drosophila melanogaster* (revisão em Kuhlmann *et al.*, 1968).



De acordo com Sandlie & Kleppe (1982), a cafeína inibe a incorporação de timidina no DNA em células procarióticas e eucarióticas. Em *Escherichia coli* essa inibição pode ser devida a vários fatores, tais como, decréscimo na incorporação de timidina pela célula, inibição da timidina quinase, ou um efeito sobre o processo de síntese do DNA. Com relação à timidina quinase, a cafeína é um inibidor competitivo desta enzima *in vitro*, competindo com o substrato ATP pelo sítio de ligação.

Segundo Sehgal & Simões (1976) o contato prolongado com a cafeína durante o período larval, provoca malformações dos ovários nas fêmeas e esterilidade em adultos de *Drosophila melanogaster*.

Nas plantas, a cafeína interfere, principalmente, na citocinese (Lopez-Saez *et al.*, 1966 *apud* McDaniel & Berry, 1974).

Estudos com animais expostos à cafeína em doses iguais, ou mesmo superiores às maiores exposições humanas permitidas, não têm demonstrado efeitos genéticos detrimenais em estudos relacionados à reprodução, ou em experimentos de letais dominantes. Contudo, a altas doses, 30 a 100 vezes a dose permitida aos humanos, efeitos teratogênicos foram observados em roedores (pequena revisão em Sivak *et al.*, 1982).

Ostertag *et al.* (1965), trabalhando com células humanas HeLa em cultura, mostraram que a cafeína induz quebras cromossômicas e que a quantidade de quebras foi paralela à dose usada. Verificaram-se ainda, que a cafeína induziu quebras cromossômicas somente quando adicionada antes do processo de duplicação do DNA ou durante este. A maioria das quebras cromossômicas não foram reparadas.

Segundo estudos realizados por Kuhlmann *et al.* (1968), também em humanos, a cafeína inibe o desenvolvimento das células HeLa em concentrações de aproximadamente 200 µg/mL. Essa mesma concentração causou inibição da síntese de RNA, mas não da síntese de DNA. A exposição das células a altas concentrações de cafeína, por duas horas, afeta o ciclo celular. O tempo entre a síntese de DNA e a próxima metáfase é de, aproximadamente, uma hora a mais do que nas células não tratadas. A inibição da atividade da DNA polimerase,



pela cafeína, foi observada em células humanas, *in vitro*, a concentrações de aproximadamente 500 µg/mL, depois de 48 horas.

Em um estudo com o caramujo *Biomphalaria glabrata*, no qual massas de ovos foram tratadas com uma solução de cafeína a 0,1%, por 24 horas, em diferentes estádios do desenvolvimento, foi observada uma alta taxa de mortalidade antes da primeira clivagem dos ovos tratados. Da primeira clivagem até o estágio de blástula, houve a formação de caramujos teratomorfos. No estágio de gástrula, a taxa de mortalidade foi de 56,8% e no de trocófora jovem foi de 34%. Neste último estágio, obteve-se também a taxa máxima de malformação da concha. No estágio de trocófora não foi observado nenhum efeito da droga até a eclosão (Kawano *et al.*, 1979).

A segunda classe de efeitos genéticos descrita para a cafeína é que esta droga age como um modificador, ou como um ativador ou inibidor de alguns processos induzidos por um outro agente (Sivak *et al.*, 1982). Neste caso, a frequência de aberrações cromossômicas é mais alta do que a frequência de aberrações induzidas pelo mutágeno sozinho. O estudo do sinergismo da cafeína com mutágenos *in vivo* em mamíferos, não é relevante somente do ponto de vista teórico, mas também relaciona-se ao uso da cafeína em dietas humanas (Dulout *et al.*, 1981).

A utilização conjunta da cafeína tem causado aumento na taxa de mutações induzidas por radiação ultravioleta (Witkin, 1958; Sauerbier, 1964 *apud* Mendelson, 1974), radiação γ (Yamamoto, 1969 *apud* Mendelson, 1974), mitomicina-C e radiação X (Mendelson, 1974).

O estudo dos efeitos de dosagens de 3 mM de cafeína sobre a progressão do ciclo celular de células HeLaS₃ desenvolvendo-se, exponencialmente e assincronicamente, em cultura em suspensão, seguindo à exposição a 6,8 Gy de radiação γ ou 30 minutos a 45°C de hipertermia, mostraram que radiação e cafeína agiram de uma maneira complementar, na qual a radiação reduziu o atraso na progressão do ciclo celular, induzido pela cafeína, de células em G₂, e o retardo mitótico.

Calor e cafeína tiveram efeitos aditivos sobre as alterações na progressão do ciclo celular. A cafeína causa um atraso na saída da fase G₁.



Similarmente, o calor causa um atraso na progressão de G₁. Portanto, os atrasos em G₁ causados pelo calor e pela cafeína podem ser aditivos (Higashi-Kubo *et al.*, 1989).

Dulout *et al.* (1981) analisaram o efeito combinado, em camundongos *in vivo*, da cafeína e dos mutágenos trietilenemelamina (TEM) e adriamicina (ADR). Ambos os compostos são usados como agentes quimioterapêuticos no câncer. Animais injetados somente com cafeína exibiram um aumento significativo na frequência de “gaps” e também de quebras cromossômicas. Tratamentos com TEM induziram um aumento significativo de “gaps”, quebras e trocas cromatídicas. ADR aumentou a frequência de “gaps” e de quebras e induziu fusões cêntricas. Tratamentos combinados com TEM e cafeína evidenciaram a habilidade potencial da última droga. Já no caso de camundongos injetados com ADR e cafeína, somente a frequência de fusões cêntricas foi aumentada. Foi relatado que a cafeína ativou a transformação neoplásica induzida por uma variedade de carcinógenos químicos em células embrionárias do hamster Syriam, enquanto que em outro caso, foi relatada uma inibição de transformação induzida por 4-nitroquinolina-N-óxido em células de camundongo BALB/c-3T3. Ambos os fenômenos foram descritos como inibição do reparo pós-replicação, pela cafeína.

Itoyama & Bicudo (2000) analisaram o efeito da cafeína combinado com o cloreto estanoso (SnCl₂) sobre a fecundidade de *Drosophila prosaltans*. Se a cafeína é considerada um inibidor do reparo do DNA e o SnCl₂ afeta o DNA, espera-se um efeito prejudicial maior quando ambos os compostos são administrados juntos, do que separados. Os tratamentos isolados com cafeína e com SnCl₂ mostraram redução significativa da progênie quando comparados com o controle. Por sua vez, o número de descendentes no tratamento combinado foi 15% menor do que no tratamento com a cafeína sozinha.

Trinta e cinco populações naturais de *Drosophila melanogaster* da Virginia foram testadas quanto ao seu grau de sensibilidade ao carcinógeno aflatoxina B₁ (AFB₁) e à cafeína. Oito destas linhagens foram testadas para os efeitos da administração simultânea de ambas as drogas. A cafeína demonstrou um efeito protetor significativo impedindo o alto grau de mortalidade ovo-adulto



produzido por AFB₁ sozinha e também promovendo menor redução do corpo dos adultos (Chinnici & Bettinger, 1984).

Um teste conhecido como teste de micronúcleos serve como uma medida indireta da quantidade de quebras cromossômicas causadas por um determinado agente. Se um cromossomo é quebrado, o fragmento acêntrico pode não ser incorporado dentro de cada núcleo filho na mitose, mas ao invés disso, pode formar pequenos micronúcleos distintos. A cafeína tem numerosos efeitos sobre o reparo do DNA, e é esperado que ela possa interagir sinergisticamente com radiação γ , a qual causa vários tipos de danos à molécula de DNA. Foi encontrado que em linfócitos humanos irradiados à época da inoculação e analisados 72 horas depois, pós-tratamento com cafeína reduziu o número de micronúcleos observados após a radiação γ . Quando a irradiação foi 48 horas após a inoculação e a fixação em 72 horas, a frequência de micronúcleos foi grandemente aumentada pelo pós-tratamento com cafeína. A cafeína sozinha não tem efeito sobre a frequência de micronúcleos (Boyes & Koval, 1983).

A presença de hidroxiuréia (HU) durante a fase G₂ potencializou a produção de aberrações do tipo cromatídicas induzidas por raios X e estreptonigrina em linfócitos humanos. Um efeito de potencialização do mesmo tipo e magnitude foi obtido quando cafeína foi dada como um pós-tratamento durante G₂. Foi, entretanto, demonstrado que o atraso mitótico induzido por raios X foi encurtado pela cafeína e prolongado pela HU. Acredita-se que cafeína e HU reduzem a eficiência do processo de reparo; a cafeína por encurtar o tempo disponível para o reparo e HU por reduzir o suprimento de material requerido para o reparo (Hansson *et al.*, 1982).

Segundo Tomita & Tsuchiya (1989 a, b *apud* Tsuchiya *et al.* 1992), quimioterapia combinada com a administração de cafeína, oferece boas perspectivas no estudo do osteossarcoma. A cafeína tem um efeito de inibição no reparo do DNA e acentua a citotoxicidade da cisplatina, doxorubicina, ciclofosfamida e mitomicina-C, que *in vitro* e *in vivo*, agem contra uma linhagem celular de osteossarcoma humano.

No homem adulto a cafeína aumenta as concentrações de catecolaminas e corticosteróides no plasma e urina, e altera os níveis de glicose e



insulina, em vários graus. Em estudos com fetos humanos, nos quais foi administrada uma infusão de cafeína para a mãe em uma dose total de 4,5 mg/Kg, observou-se que esta droga não tinha efeito sobre o metabolismo materno, mas quando administrada simultaneamente com glicose intravenosa, resultou em significativa redução das taxas de glicose-insulina no plasma materno. Somente glicose e lactato foram elevados no feto durante uma infusão materna de cafeína. Foi concluído, então, que a homeostase da glicose fetal pode ser influenciada por exposição materna à cafeína, mas seu efeito total sobre o metabolismo fetal e padrão dos gases sanguíneos é pequeno (Kitts & Mathieson, 1989).

Em um estudo realizado com ratos, foram observados os efeitos de administração aguda de cafeína sozinha e em combinação com o etanol. Os níveis plasmáticos de aminoácidos não foram perturbados pela cafeína sozinha, mas a administração de cafeína e etanol combinados reduziu os níveis de vários aminoácidos (Bekairi *et al.*, 1987 *apud* Wajda *et al.*, 1989).

Há indicações de que a cafeína induz letais dominantes ligados ao sexo em *Drosophila* (Kuhlmann *et al.*, 1968). Em um experimento onde fêmeas jovens de *Drosophila* foram tratadas com cafeína, e então acasaladas, por 24 horas, com machos que tinham sido irradiados com 2000 R de radiação X, a radiação induziu letais dominantes e perda do cromossomo sexual do genoma paterno, cujas frequências foram determinadas. Quando fêmeas jovens, virgens, de um estoque radorresistente foram tratadas com cafeína e então irradiadas com 3000 R de radiação X, observou-se um aumento dos letais dominantes no genoma materno. Foi sugerido que a cafeína reduz a eficiência de um sistema dos ovócitos, em *Drosophila*, que repara quebras cromossômicas produzidas por raio-X, tanto em genomas paternos como em maternos (Mendelson, 1974).

Dados de Ostertag & Haake (1966) mostraram a ocorrência de mortalidade preferencial de machos, após o tratamento de larvas de *Drosophila* com cafeína. Também foi observada perda do cromossomo X e letais recessivos ligados ao sexo nas larvas fêmeas. Andrew (1959) também havia relatado um aumento significativo de mutações letais recessivas ligadas ao sexo, após a exposição de machos de *Drosophila* à cafeína.



Kuhlmann *et al.* (1968) observaram que, quando larvas fêmeas de *Drosophila* eram expostas a 1% de cafeína, por uma hora, sendo depois devolvidas ao seu meio normal para incubar, era observada uma mudança na razão sexual (a razão sexual é definida como a porcentagem de machos no número total de moscas) em favor das fêmeas, isto é, mais larvas machos morreram após a exposição à cafeína. No estudo realizado por Itoyama & Bicudo (1992), observou-se também que os machos da progênie de fêmeas tratadas com diferentes concentrações de cafeína, são mais prejudicados por essa substância do que as fêmeas da mesma progênie, reforçando dados na literatura, que relatam maior sensibilidade dos machos às condições ambientais adversas.

Os dados constantes na literatura, especialmente os obtidos em *Drosophila prosaltans*, mostrando que a cafeína diminui a fertilidade e a longevidade das moscas e aumenta o tempo de desenvolvimento, funcionando assim, como um redutor do número de indivíduos desse gênero de insetos, sugeriram o presente trabalho utilizando como organismo de estudo o *Aedes aegypti*.

5. *Aedes aegypti*

Entre os mosquitos, o gênero *Aedes* constitui um dos mais importantes. Ele contém mais de 700 espécies, sendo várias delas transmissoras de doenças humanas (revisão em Rai & Hartberg, 1975).

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é originário da África, e daí se alastrou para todo o mundo, sendo atualmente cosmopolita (Reyes-Villanueva, 1990). Este mosquito disseminou-se em toda a zona intertropical e mesmo em países temperados entre 40° latitude Norte e 40° latitude Sul. Sua disseminação pode ser feita facilmente através de navios, trens, automóveis e aviões. Introduzido na América, passou a ocupar larga porção do seu território, sobretudo ao longo do litoral atlântico, da Argentina e Uruguai até o sul dos



Estados Unidos e também as Antilhas. Este inseto prefere a umidade, sendo por isso mais encontrado no litoral e ao longo dos cursos de água. Porém isso não implica na sua inexistência em lugares áridos, sendo encontrado em vastas áreas semi-áridas do Nordeste brasileiro, fato que não foi suspeitado antes de 1928, devido a ser sempre julgado como uma espécie de regiões úmidas (Pessôa & Martins, 1982).

A distribuição de *A. aegypti* é diretamente relacionada aos seus requerimentos de temperatura. Adultos não são resistentes em climas frios e uma temperatura de 6°C por 24 horas, ou acima de 42°C por cinco minutos são consideradas letais. Os limites de temperatura para larvas são de 8°C a 46°C e para os ovos de 20°C a 46°C. *A. aegypti* tem sido encontrado em todos os países do hemisfério ocidental com exceção do Canadá (pequena revisão em Slosek, 1986). Considera-se que, primitivamente, este mosquito era uma espécie florestal (habitante de bosques) e suas larvas eram bromelícolas, posteriormente, foi se adaptando ao hábitat doméstico e urbano (Pessôa & Martins, 1982; Reyes-Villanueva, 1990).

Os principais subgêneros de *Aedes* da região neotrópica são os seguintes: *Finlaya* (= *Conopostegus*), *Ochlerotatus*, *Howardina* e *Stegomyia*, sendo que o *Aedes aegypti* pertence a este último subgênero (Pessôa & Martins, 1982). Esse mosquito é bastante utilizado em estudos de genética básica e citogenética, bem como em estudos para o desenvolvimento e aplicação de metodologia genética para o controle populacional. Ele tem um pequeno número de cromossomos, constando de três pares, sendo os cromossomos sexuais e os cromossomos 2 metacêntricos e sendo o par de cromossomos 3, usualmente, considerado submetacêntrico (McDonald & Rai, 1970; Lima-Catelani & Bicudo, 1994). É facilmente mantido e manipulado no laboratório, possui uma rica fonte de variabilidade genética, e apresenta distribuição global (Rai & Hartberg, 1975).

O *Aedes aegypti* é muito importante em entomologia médica porque é um vetor de enfermidades virais, como a febre amarela, a dengue e a febre hemorrágica. Nas áreas urbanas do sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental e praticamente em todo o continente americano, os indivíduos estão expostos a um ou mais dos quatro sorotipos do vírus da dengue que são chamados de DEN-1,

DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Clark, 1995), e desse modo, estão sujeitos a desenvolver a febre hemorrágica, que pode levar a óbito.

Após ter sido erradicado na década de 50 (Pessoa & Martins, 1982; revisão em Schatzmayr, 1994), o *Aedes aegypti* reinvadiu o Brasil a partir dos anos 70 ocasionando uma grande preocupação. No Estado de São Paulo, o *A. aegypti* foi reintroduzido em 1980 e 1981, e os focos foram eliminados. A colonização, por esse mosquito, dos 30 municípios da região de São José do Rio Preto, localizada na parte noroeste do Estado de São Paulo, ocorreu novamente no período de 1985 a 1991 (Neto, 1997). O aumento da infestação de várias regiões brasileiras pelo mosquito trouxe, como consequência, epidemias de dengue e o risco da ocorrência de febre hemorrágica, causada em uma segunda infecção por um vírus de sorotipo incompatível com o primeiro. O agente etiológico da febre amarela e da dengue pertence à família Togaviridae. É um vírus de RNA de fita simples, pertencente ao gênero *Flavivirus* (*Arbovirus B*) (Candeias, 1991).

Morfologicamente, os adultos de *A. aegypti* podem ser facilmente distinguidos das demais espécies de mosquitos. O clipeo é revestido de escamas; o mesonoto apresenta duas linhas longitudinais medianas de escamas amareladas e, de cada lado, uma linha argêntea curva, que se torna reta no terço posterior e se prolonga até o escutelo; o conjunto forma o desenho de uma lira, muito característico da espécie. O abdome possui cinco anéis basais brancos. Fêmures com anéis brancos apicais; terceiro par de pernas com anéis, da mesma cor, nas porções basais. A larva possui um sifão respiratório castanho-escuro, quase negro, curto, e, devido a este sifão, permanece quase verticalmente em relação à superfície líquida. O pécten do sifão possui 12 escamas sob a forma de ganchos tricúspides; o pécten do oitavo segmento abdominal possui 11 escamas espinhosas no ápice (Pessoa & Martins, 1982).

O *Aedes aegypti* deposita seus ovos separadamente, em muitos lotes, postos em intervalos de um dia ou mais, na vizinhança da água ou na sua superfície. Esse mosquito tem a particularidade de seus ovos conservarem durante muito tempo, mesmo a seco, a capacidade de eclosão. Tais ovos, colocados sobre as paredes dos recipientes, podem permanecer viáveis durante muitos meses, resistindo à dessecação, e quando o ambiente torna-se favorável, as larvas são



liberadas. Daí a necessidade de, além de esvaziar a água dos recipientes suspeitos, proceder à esterilização dos mesmos, a fim de destruir as posturas latentes do mosquito. Tal destruição pode ser feita por simples processos mecânicos, como a raspagem da superfície interna do recipiente, pela flambagem, ou por processos químicos, como por exemplo, pelo hipoclorito, ou pela petrolagem (Pessoa & Martins, 1982).

Os locais de postura podem ser vasos de plantas em residências ou nos cemitérios, latas, garrafas, pneus, barris, potes de barro, pias das igrejas, nas calhas dos telhados, caixas d'água destampadas, piscinas não tratadas, poços, enfim, em qualquer recipiente que possa conter água limpa ou, na falta desta, mesmo em água completamente suja, tanto próximo como dentro das habitações humanas (Pessoa & Martins, 1982; Panicker *et al.*, 1982; Subra, 1983; Strickman & Kittayapong, 1993).

A cópula se processa 12 a 24 horas após o nascimento do imago e estimula o desejo da fêmea em sugar sangue. Fêmeas virgens dificilmente sugam sangue, que é necessário para o desenvolvimento ou maturação dos ovos. Sob este ponto de vista, nem todos os estegomias se comportam da mesma maneira. Assim, algumas fêmeas são ativas e só têm necessidade de um único repasto sangüíneo para a maturação dos ovos; outras, ao contrário, e são em maior número, só efetuam posturas após duas, três ou mesmo quatro refeições de sangue. Se as fêmeas sugarem o sangue antes ou após a cópula, os ovos são postos poucos dias depois; se forem alimentadas com líquidos açucarados, os ovos não se desenvolvem, nem há postura. Cada fêmea é capaz de por, em muitas vezes, 70 a 150 ovos. As larvas se desenvolvem rapidamente nas águas impuras, onde se nutrem de várias bactérias, algas e diatomáceas, e também de várias partículas de detritos que são derivados de tecidos de plantas em decomposição (Jones, 1978; Pessoa & Martins, 1982; Clements, 1992).

Como já foi mencionado, o *A. aegypti* é um mosquito essencialmente doméstico, adaptado à habitação do homem à custa do qual se nutre, de preferência. Só existe nas regiões de temperatura muito elevada e pica raramente quando ela desce a menos de 23°C. É um mosquito de hábitos diurnos, picando raramente à noite. Para exercer a hematofagia necessita de luz e, assim,

somente levado por extrema avidez devida à fome é que pica no escuro. Na falta do homem, ou experimentalmente, pode picar cães, gatos, ratos, cobaias e até pássaros ou répteis (Pessoa & Martins, 1982).

O ciclo evolutivo dura 11 a 18 dias à temperatura de 26°C. Quanto à longevidade desta espécie, foi constatado que as fêmeas vivem até 154 dias, em condições experimentais. Nos países quentes há numerosas gerações anuais. Segundo dados da literatura, a fêmea, após ter posto todos os seus ovos, morre rapidamente, raramente sobrevivendo mais de 15 dias após a postura. Em condições normais, uma fêmea pode fazer 12 ou mais repastos sanguíneos em um mês (Pessoa & Martins, 1982).

São José do Rio Preto tem apresentado, nos últimos anos, altos índices de infestação pelo *Aedes aegypti* e é hoje a cidade do Estado com maior incidência de dengue, tendo atingido mais de 5000 pessoas, na região, no ano de 1999. Quanto à febre hemorrágica, foi registrado, também em 1999, na região de Rio Preto, um caso, o qual ocorreu no município de Riolândia, um dos mais afetados pela dengue na área de abrangência da Direção Regional de Saúde (DIR-22), que envolve 99 municípios. Hoje temos o risco da febre amarela, também transmitida por esse mosquito. Foi confirmado um caso fatal de febre amarela em São José do Rio Preto em março de 2000 (Bichara & Mendes, 2000, Diário da Região). Segundo dados da DIR, no ano 2000, foram registrados, na região, 1134 casos de dengue confirmados, dos quais 426 em São José do Rio Preto.

A falta de cooperação das populações humanas para a eliminação dos criadouros, em suas próprias casas, tem dificultado e até mesmo neutralizado os esforços da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo) na solução do problema.

Uma das formas pelas quais a SUCEN atua no controle, é através da eliminação das fases larvais de *Aedes aegypti* pelo uso de inseticidas. O temefós, nome comercial: Abate, é um organofosforado, sob a forma de grânulos, que são depositados nos pratos dos vasos de flores que enfeitam as casas e em outros recipientes não recicláveis. Também são pulverizados inseticidas piretróides pelas ruas das cidades, quando o índice de Breteau ultrapassa os níveis considerados aceitáveis. Esse índice envolve o dimensionamento dos criadouros

existentes, pela contagem dos recipientes com larvas, dando indicação da intensidade e extensão da infestação, associando recipientes a casas (número de amostras positivas / número de residências visitadas x 100). O conhecimento dos níveis de infestação permite a avaliação dos riscos de uma epidemia. Áreas com índices superiores a cinco são considerados locais de risco para a transmissão das doenças. Este índice é efetuado mensalmente onde há infestação domiciliar (Alves *et al.*, 1991).

Lima-Catelani (1996) realizou um estudo do padrão de esterases de *A. aegypti* de São José do Rio Preto e Marília, tendo verificado que essas populações diferem quanto ao padrão de bandas esterásicas em géis de poliacrilamida. As esterases são enzimas importantes que desempenham papéis em várias funções dos organismos, abrangendo resistência a inseticidas (Kao *et al.*, 1985a; Morton, 1993), digestão (Kapin & Ahmad, 1980; Argentine & James, 1995), reprodução (Sergeev *et al.*, 1993) e metabolismo do hormônio juvenil (Harshman *et al.*, 1994; Debernard & Couillaud, 1994). Assim, alterações no ambiente podem, eventualmente, causar alterações no padrão dessas enzimas. É o caso do uso de inseticidas, analisado em alguns insetos.

A descoberta do desenvolvimento de resistência a inseticidas, pelos mosquitos, ocorreu no final dos anos 40 e início da década de 50 (revisão em Rai & Hartberg, 1975). Essa resistência está sendo constatada em algumas localidades brasileiras e há suspeitas de que também esteja ocorrendo em São José do Rio Preto. Essa habilidade dos insetos para metabolizar os inseticidas pode comprometer os programas de controle, anulando os esforços nesse sentido.

A capacidade de metabolizar os inseticidas, causando assim, resistência aos mesmos, está ligada, em alguns organismos, a um aumento da taxa de síntese de dois tipos de esterases, as carboxilesterases e as acetilcolinesterases, classificadas com base no seu comportamento perante os inibidores malation e sulfato de eserina (Oakeshott *et al.*, 1993).

Alguns estudos forneceram evidência de herança monofatorial para o DDT (1,1-bis (4-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano) nas larvas de *A. aegypti*. Estudos de ligação têm mostrado que este gene é herdado como um gene de dominância incompleta que está no grupo de ligação dois. A resistência larval,



aparentemente, envolve um aumento na descloração do DDT para se tornar o DDE (2,2-bis(4-clorofenil)-1,1-dicloroetileno), que é inofensivo para os insetos, pela ação da enzima DDT-dehidroclorinase (revisão em Rai & Hartberg, 1975).

A resistência ao dieldrin em *A. aegypti* mostrou ser controlada por um único gene no grupo de ligação dois. Foi demonstrado, posteriormente, que o gene para a resistência ao dieldrin (*DI*) é distinto do gene que determina resistência ao DDT (R^{DDT}), mas eles estão proximamente ligados. *DI* é um excelente marcador genético, em contraste ao R^{DDT} . Há evidências de que genes modificadores podem ativar a resistência ao dieldrin em *A. aegypti*. Fatores afetando a resistência ao malation têm sido localizados nos grupos de ligação dois e três (revisão em Rai & Hartberg, 1975).

Outro aspecto a ser considerado, com relação ao uso de inseticidas, é o do risco, especialmente, para crianças e animais domésticos, da presença dos grânulos de organofosforados em recipientes próximos ou no interior das casas, e do inseticida piretróide pulverizado, para pessoas alérgicas e animais. De um modo geral, o problema dos efeitos tóxicos e mutagênicos para o homem e de contaminação para o meio ambiente (que também direta ou indiretamente atinge o homem), do uso de inseticidas, é bastante sério. Segundo Augusto *et al.* (2000), os inseticidas utilizados no combate ao *Aedes* são conhecidamente neurotóxicos e alergênicos e que, por isto, não dependem de dose para produzir seu efeito tóxico.

O abate e o lindane são eficientes para o controle de larvas do mosquito, mas mostraram-se extremamente tóxicos e, portanto, são fortes poluidores ambientais. Segundo Shamaan *et al.* (1993), o abate é muito tóxico para a larva de *Aedes*, sendo considerada DL50, a concentração de 0,0001 mg/L. Este produto é bastante conhecido como neurotóxico para o homem, fragiliza músculos e nervos e também há evidências, em estudos experimentais, de efeito mutagênico.

Diante dos efeitos que podem ser causados pelos inseticidas, o uso de substâncias alternativas que viessem a ajudar no controle do *Aedes*, sem poluir o ambiente, seria extremamente desejável. Por exemplo, de acordo com Andrade & Modolo (1991), o uso do abate em associação com o *Bacillus*



thuringiensis contra o mosquito *Culex quinquefasciatus*, tem mostrado resultados promissores tanto em condições de laboratório como no campo.



II. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito da cafeína sobre parâmetros biológicos de *Aedes aegypti*. O estudo da ação tóxica e mutagênica da cafeína tem particular interesse pelo fato desta droga ser consumida em grandes quantidades pelo homem. Além disso, caso a resposta do *A. aegypti* à cafeína fosse semelhante à observada em *Drosophila* e outros organismos, eventualmente os resultados obtidos poderiam mostrar que a cafeína pode ser usada como auxiliar no controle, para eliminação das formas larvais de *Aedes*.

Para isto foram analisados os seguintes parâmetros:

1. A taxa de eclosão.
2. O desenvolvimento de ovo até a fase adulta.
3. A mortalidade nas diferentes fases.
4. A longevidade dos adultos.
5. O padrão de esterases.

Esse último aspecto foi introduzido com o objetivo de verificar se a cafeína interfere no padrão de síntese das enzimas esterásicas, as quais desempenham papel importante na fisiologia, no desenvolvimento e na aquisição de resistência a inseticidas, como demonstrado em alguns organismos.

Além da cafeína, foi testado no presente estudo, o pó de café usado, pois caso esse se mostrasse auxiliar no controle de *Aedes*, por seu conteúdo de cafeína, poderia ser utilizado facilmente pela população no lugar do organofosforado abate.



III. MATERIAL E MÉTODOS



1. Organismo e procedência

No presente trabalho foi utilizado como material de estudo o mosquito *Aedes aegypti*. Sua classificação taxonômica é a que segue:

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Díptera

Família: Culicidae

Subfamília: Culicinae

Gênero: *Aedes*

Subgênero: *Stegomyia*

Espécie: *Aedes aegypti*

Os mosquitos foram coletados pela SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), em São José do Rio Preto – SP e criados no Laboratório de Vetores deste Instituto. Foram utilizados, nos experimentos, os ovos e as larvas descendentes desses mosquitos.

2. Manutenção em laboratório

Os mosquitos são organismos holometábolos que passam pelas fases de ovo, larva (fases L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1).

Os mosquitos mantidos no Laboratório de Vetores são provenientes de coletas de larvas e pupas, encontradas em recipientes contendo água parada. No laboratório, as larvas de *Aedes aegypti* são separadas de acordo com as suas características morfológicas, pois são coletadas larvas e pupas de várias espécies de mosquitos. No caso das pupas, não é possível diferenciá-las apenas com base em suas características morfológicas, então estas são colocadas em uma gaiola até o surgimento dos adultos. Estes últimos então, podem ser separados, pois os caracteres morfológicos de *Aedes aegypti* são bastante



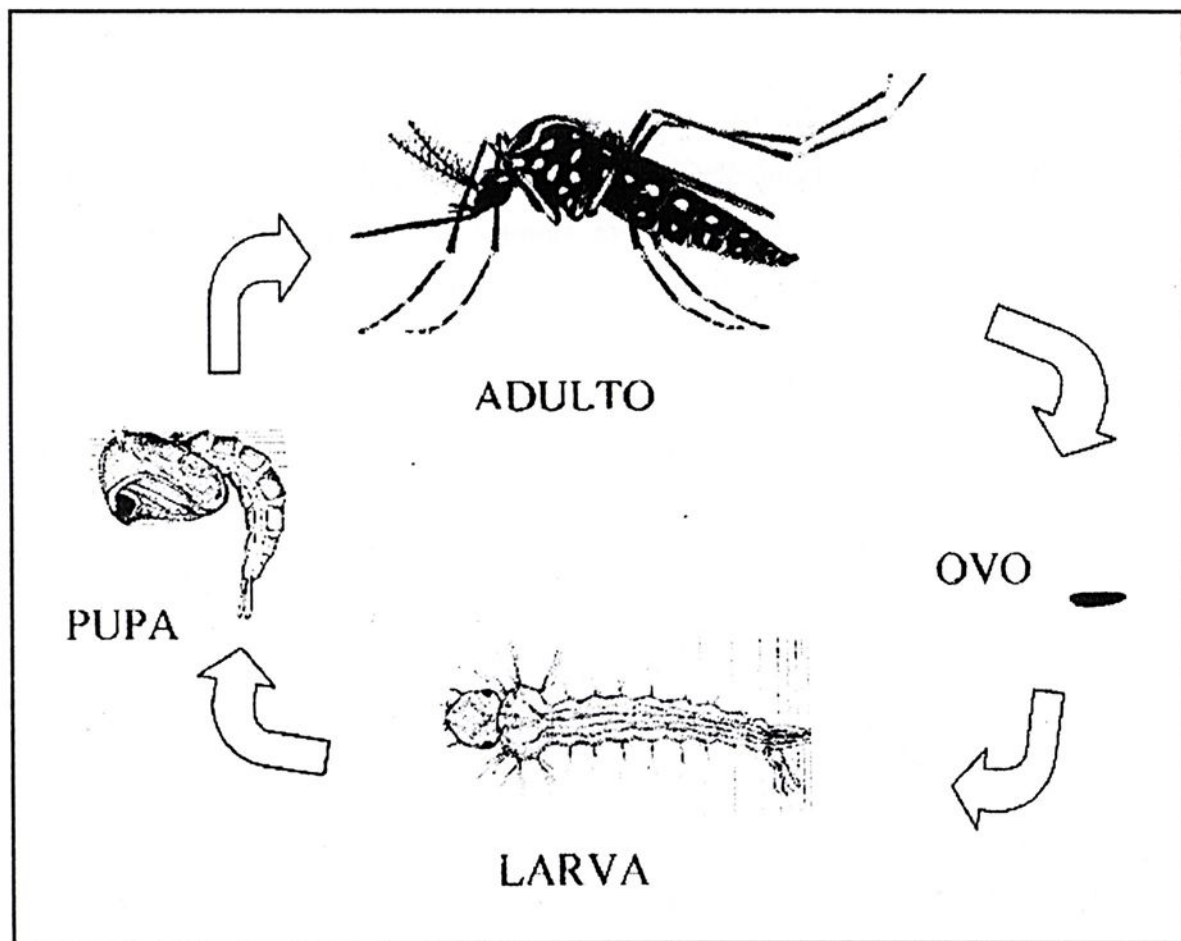


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (modificado da internet – <http://www-rci.rutgers.edu/~insects/lcycle.htm>).

marcantes, possibilitando diferenciá-los com precisão das demais espécies de mosquitos (Figuras 2 e 3).

Depois de corretamente separados, os adultos são mantidos em gaiolas de madeira com tela fina de nylon e forradas com papel branco para que se possa visualizar os indivíduos mortos caídos no chão da gaiola. Na gaiola, os adultos são alimentados diariamente com uma solução aquosa de açúcar. Esta solução é colocada em um frasco de boca estreita contendo uma fita de algodão, a qual absorve a solução de açúcar. Uma ponta do algodão é deixada para fora do frasco para que os mosquitos possam sugar. Tanto as fêmeas como os machos alimentam-se desta solução.

Para a alimentação das fêmeas também é colocado, semanalmente, um camundongo, o qual é fornecido pelo Biotério do Departamento de Zoologia do IBILCE – UNESP. As fêmeas precisam ser alimentadas com sangue para que possam ovipor. O camundongo é preso em uma tela de arame, de tal forma que fique o mais imóvel possível; este procedimento é conhecido como “empastelamento”. A seguir, o camundongo é colocado na gaiola, onde permanece por volta de uma hora e trinta minutos.

As larvas que eclodem dos ovos obtidos no laboratório são alimentadas com ração para peixes, em flocos, a qual é triturada com o auxílio de um macerador, até que se torne pó. Este pó então é espalhado sobre a superfície da água quando a maioria das larvas já estão na fase de L3. As larvas alimentadas com esta ração se desenvolvem mais rapidamente do que as que não são alimentadas. A água com ração deve ser trocada, semanalmente.

Dentro das gaiolas também são colocados recipientes para a postura dos ovos. Estes recipientes são copos contendo água da torneira e as paredes destes copos são forradas com uma fita larga de papel de filtro onde ficam depositados os ovos colocados pelas fêmeas. Os ovos que ficam flutuando na água dos copos são recolhidos com o auxílio de um pincel de ponta fina e colocados na fita de papel de filtro, juntamente com os outros ovos.

Esta fita contendo os ovos é colocada para secar durante, aproximadamente, 24 horas. Após esse período, os ovos são contados com o auxílio de uma lupa de mão, e então são devidamente embalados em saquinhos



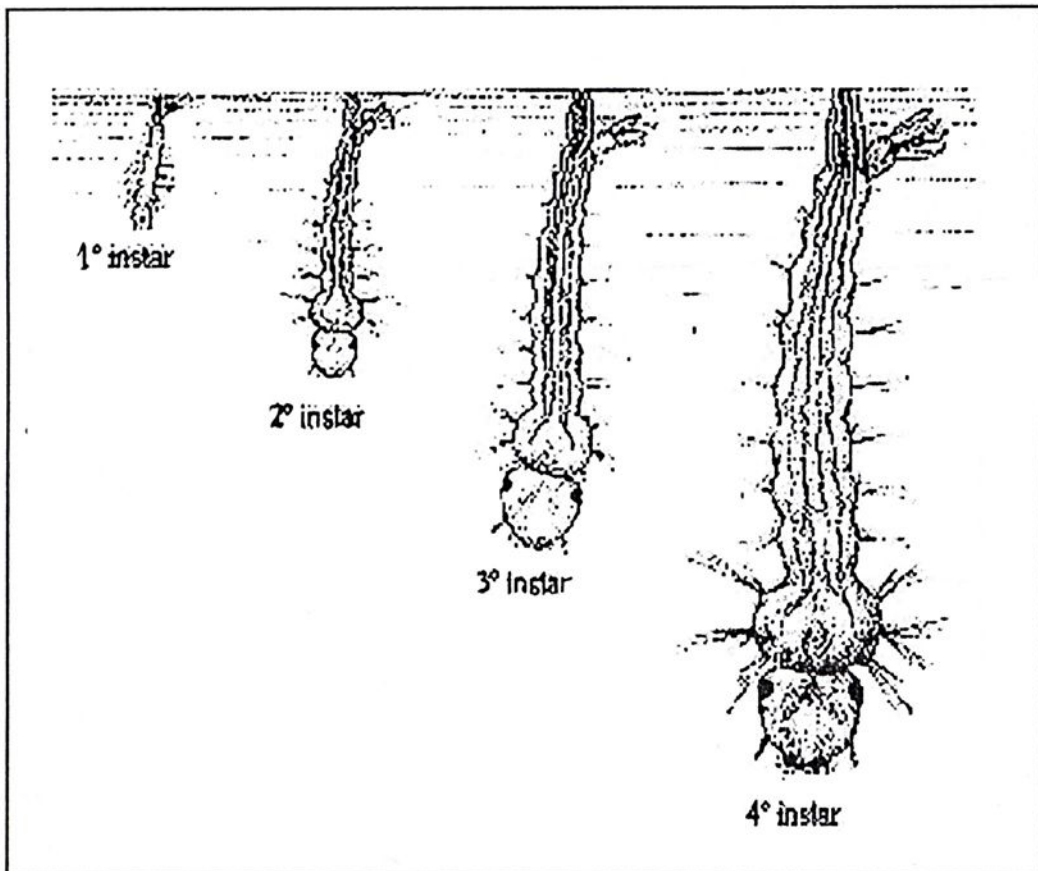


Figura 2. Estádios larvais do mosquito *Aedes aegypti* (Jones, 1978).

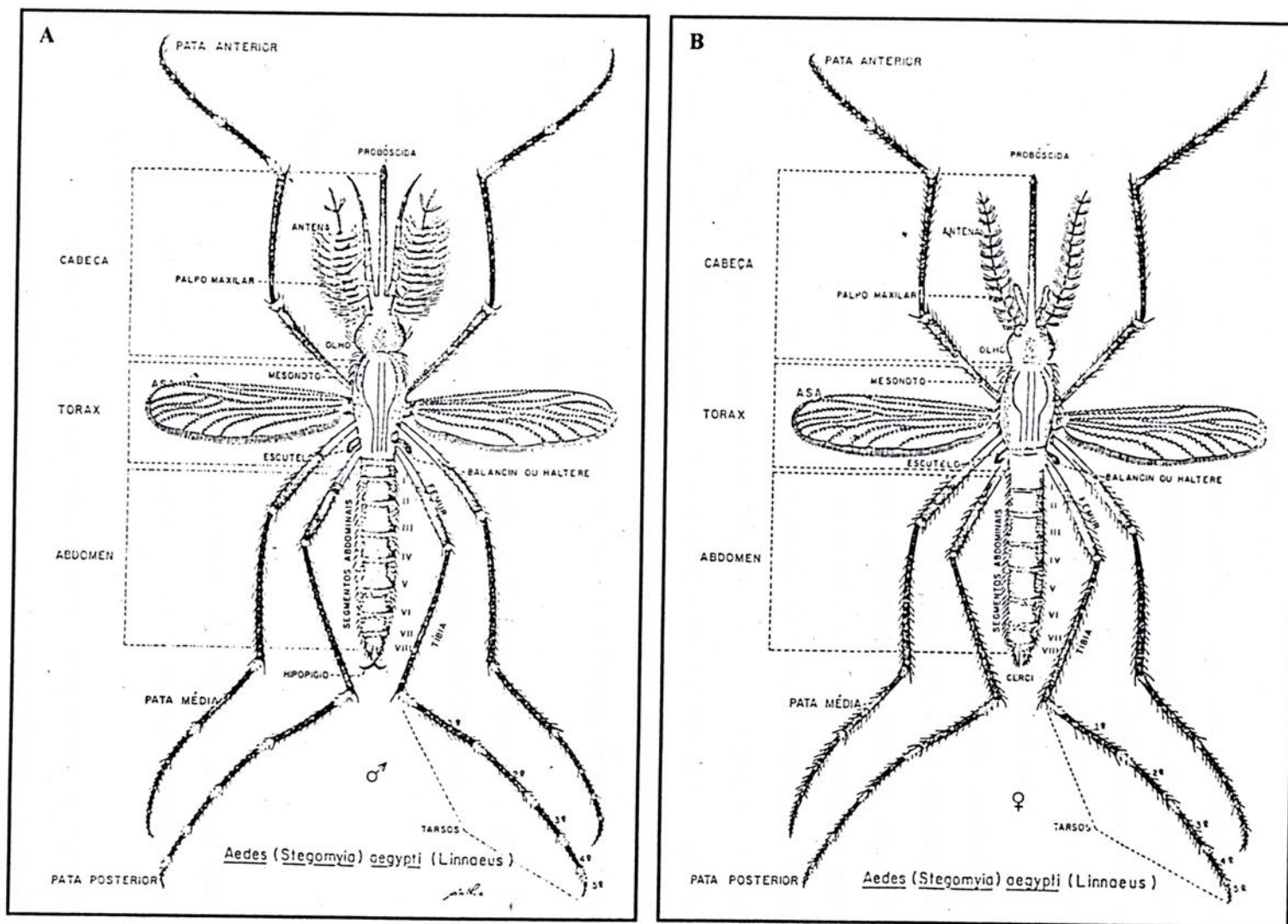


Figura 3 A-B. Adultos de *Aedes aegypti*. A. macho; B. fêmea (SUCAM, 1989).

plásticos e rotulados com o nome da espécie, procedência, data da embalagem e número de ovos por fita. Desta forma, os ovos embalados são estocados para serem utilizados, posteriormente, nos experimentos.

A umidade no interior das gaiolas é mantida por recipientes conhecidos como umidificadores. Estes recipientes constam de um copo contendo água e um cone de papel de filtro que é colocado dentro do copo, absorvendo a água e proporcionando a umidade do ar. Algumas fêmeas colocam seus ovos nestes recipientes, os quais também são recolhidos e colocados para secar.

Quando uma das gaiolas está excessivamente povoada é realizada uma repartição dos mosquitos para outra gaiola. Para isso é utilizado um equipamento conhecido como sugador. Este equipamento consta de um tubo longo de vidro, o qual é aberto em um dos lados e do outro lado é tampado com uma telinha fina de nylon. Este lado tampado do tubo de vidro é conectado através de um outro tubo de borracha grossa a uma “boqueira” de vidro, a qual é utilizada para se fazer a sucção dos mosquitos com a própria boca. Através deste sugador, além de ser possível realizar a transferência de mosquitos de uma gaiola para a outra, também é possível fazer a separação de machos e fêmeas, os quais podem ser visualizados dentro do tubo de vidro.

Durante o dia o laboratório é iluminado pela luz solar e, eventualmente, por luz fluorescente. À noite, a luz permanece desligada.

3. Experimentos

Foram realizados 16 experimentos, utilizando-se os meios água (controle), pó de café usado (também conhecido como borra) e cafeína, em diferentes concentrações.

Os experimentos foram realizados em placas de Petri (10 cm de diâmetro) contendo 40 mL do meio, o qual era trocado semanalmente. O pó de café utilizado em todos os experimentos pertencia à mesma marca e a cafeína utilizada foi a cafeína anidra P.A. (1,3,7-trimetilxantina) da Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S. A. Brasil. Em cada placa de Petri foram colocados 20



ovos, nos experimentos de I a XIII, 15 larvas L3 nos experimentos XIV e XVI e 8 larvas L3 no experimento XV. Nos experimentos I a XIII foram preparadas três réplicas de cada meio, totalizando 60 ovos.

A Tabela 1 apresenta um resumo das condições em que foram realizados os experimentos, abrangendo o estágio dos organismos no início dos experimentos (ovos ou larvas de terceiro estágio), o número de ovos ou larvas por experimento, o número de placas de Petri contendo os experimentos (dezoito, doze ou quatro), com ou sem tampa, a origem da água utilizada (torneira, mineral ou de fonte), a concentração do pó de café usado (0,025; 0,05; 0,1 g/mL), a concentração da cafeína (1000 e 2000; 200 e 500; 100 e 200 µg/mL), na sequência dos experimentos, e o acréscimo ou não de alimento ao meio (0,01 g de ração para peixe, em pó). Todas essas condições foram utilizadas procurando melhor viabilizar os experimentos para atingir os objetivos pretendidos. No que se refere às placas abertas ou fechadas, optou-se, após alguns experimentos, pela primeira condição, embora os dados não tenham sido conclusivos em relação às vantagens de uma ou outra condição.

A concentração de pó de café 0,025 g/mL corresponde, aproximadamente, a uma colher de chá rasa de pó de café para meio copo de água, a de 0,05 g/mL corresponde a cerca de duas colheres e a de 0,1 g/mL a quatro.

A idade dos ovos utilizados foi de, no máximo, 30 dias. Foram utilizados, no total 3392 ovos e larvas para iniciar os experimentos.

A temperatura da sala de manutenção de *Aedes* foi registrada três vezes ao dia, no decorrer dos experimentos (entre 8:00 e 10:00 horas, 12:00 e 14:00 horas e 17:00 e 19:00 horas) (Tabela 2).

O estudo do tempo de desenvolvimento foi realizado acompanhando-se diariamente o aparecimento de cada fase. A taxa de eclosão foi calculada pela contagem do número de larvas de primeiro e segundo estádios. A mortalidade nas diferentes fases foi computada, principalmente, pela diferença entre o número de indivíduos do estágio anterior e o estágio presente.

Para análise da longevidade, os adultos obtidos foram mantidos em gaiolas e alimentados com uma solução aquosa de açúcar a 8% (0,08 g/mL) sendo contados diariamente, por sexo, até que todos morressem. Como os



Tabela 1. Condições de realização dos 16 experimentos. Número de ovos ou larvas L3 que deram início aos experimentos; número de placas, abertas ou fechadas, preparadas em cada caso; concentração do pó de café e da cafeína no meio; origem da água que serviu para o preparo do meio e se este recebeu alimento ou não.

Experi- mentos	Início		Placas		Concentração dos meios		Origem da água	Alimento (0,01 g)
	estádios	nº	nº	condições	Pó de café (g/mL)	Cafeína (µg/mL)		
I	ovos	240	12	abertas	0,025	1000;2000	torneira	sim
II	ovos	240	12	fechadas	0,025	200;500	torneira	não
III	ovos	240	12	fechadas	0,025	200;500	torneira	não
IV	ovos	240	12	4 abertas	0,025	200;500	torneira	não
				8 fechadas				
V	ovos	240	12	fechadas	0,025	200;500	torneira	não
VI	ovos	240	12	fechadas	0,025	200;500	torneira	não
VII	ovos	240	12	fechadas	0,025	200;500	mineral	não
VIII	ovos	240	12	abertas	0,025	200;500	torneira	não
IX	ovos	240	12	abertas	0,025	200;500	torneira	não
X	ovos	240	12	abertas	0,025	200;500	torneira	sim
XI	ovos	240	12	abertas	0,025	200;500	fonte	não
XII	ovos	240	12	abertas	0,025	200;500	torneira	não
XIII	ovos	360	18	abertas	0,025; 0,05; 0,1	200;500	torneira	não
XIV	L3	60	4	abertas	0,025	100;200	torneira	sim
XV	L3	32	4	abertas	0,025	100;200	torneira	sim
XVI	L3	60	4	abertas	0,025	100;200	torneira	sim

Tabela 2. Duração dos experimentos e temperaturas medidas no laboratório de criação de *Aedes*, no decorrer dos mesmos.

Experi- mentos	Duração	Temperaturas (°C)		
		Mínima	Máxima	Média
I	20/04/99 a 20/09/99	19,0	28,0	23,5
II	19/05/99 a 21/07/99	19,0	31,0	25,0
III	21/05/99 a 21/07/99	19,0	31,0	25,0
IV	26/07/99 a 20/10/99	20,0	31,0	25,5
V	22/11/99 a 14/02/00	26,5	32,5	29,5
VI	17/12/99 a 16/03/00	26,5	32,5	29,5
VII	14/02/00 a 04/04/00	26,0	31,0	28,5
VIII	28/02/00 a 31/08/00	16,5	31,0	23,75
IX	29/03/00 a 13/08/00	16,5	31,0	23,75
X	13/04/00 a 28/08/00	16,5	29,5	23,0
XI	18/04/00 a 12/10/00	16,5	31,5	24,0
XII	18/04/00 a 06/10/00	16,5	31,5	24,0
XIII	15/05/00 a 28/08/00	16,5	28,0	22,25
XIV	06/06/00 a 12/10/00	16,5	31,5	24,0
XV	14/06/00 a 02/10/00	16,5	29,0	22,75
XVI	11/07/00 a 07/11/00	16,5	33,5	25,0

mosquitos emergiram em número muito reduzido, geralmente um mosquito por dia, e seria impossível mantê-los isolados em gaiolas, nem sempre foi possível associar a data de nascimento e a de morte dos mosquitos individualmente e assim, tem-se, na maioria dos casos, uma estimativa da longevidade.

4. Eletroforese

A análise do padrão de esterases dos indivíduos tratados pelo pó de café e cafeína e dos indivíduos não tratados, foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese. Para a realização desta técnica é utilizada uma fonte de energia (200 volts) e uma cuba de eletroforese, na qual é colocado o gel polimerizado e, neste, as amostras para corrida pela ação da corrente elétrica.

4.1. Preparo das amostras

Todas as amostras utilizadas para corrida nos géis foram preparadas com larvas individuais no estágio de L4, obtidas na água (controle), no meio contendo o pó de café a 0,025 g/mL, no meio com cafeína a 100 µg/mL e no meio com cafeína a 200 µg/mL. No total foram analisados 99 indivíduos obtidos no meio controle, 124 indivíduos no meio com pó de café, 100 indivíduos no meio com cafeína a 100 e 77 indivíduos no meio com cafeína a 200.

As larvas utilizadas nos géis foram coletadas de cada meio, com o auxílio de um pincel, e colocadas dentro de “eppendorfs”. Esses recipientes foram devidamente rotulados com o meio de cultura utilizado e a data de congelamento. As larvas foram então colocadas no freezer, onde permaneceram até, aproximadamente, um mês antes de serem submetidas à eletroforese.

No dia do preparo do gel, as larvas eram retiradas do freezer e separadas, individualmente, sendo que 20 amostras podiam ser analisadas por gel. Em cada “eppendorf” eram acrescentados 25 µL de tampão para amostra a 10%



(descrito a seguir), macerando-se cada larva, com um bastão de vidro, para serem aplicadas no gel.

4.2. Preparo dos géis

Para o preparo dos géis de corrida montava-se, primeiramente, a cuba de eletroforese, na qual eram colocadas as duas placas de vidro, que comportam o gel polimerizado. Na montagem, após as placas serem bem limpas com álcool, passa-se uma camada bem fina de vaselina em três bordas de uma delas. A vaselina serve para vedar as placas e impedir que o gel escorra enquanto ainda estiver no estado líquido.

Sobre estas camadas de vaselina, colocam-se os “espaçadores” do gel. Em seguida, aplicam-se camadas também muito finas de vaselina sobre os “espaçadores” e coloca-se a outra placa sobre os mesmos, prendendo a seguir, as duas placas com o auxílio de quatro prendedores grandes, dois nas laterais e dois na parte inferior das placas.

Após montadas, as placas são deixadas na posição vertical e procede-se ao preparo do gel.

O gel de poliacrilamida a 8% foi preparado com as seguintes substâncias, na seqüência abaixo:

- | | |
|-----------------------------------|---------|
| 1- acrilamida/bis..... | 7,5 mL |
| 2- tampão do gel (pH = 8,8)..... | 8,0 mL |
| 3- água destilada..... | 14,0 mL |
| 4- persulfato de amônio (2%)..... | 0,45 mL |
| 5- Temed..... | 25 µL |

O preparo de todas estas soluções será descrito a seguir.

Estas substâncias devem ser misturadas em temperatura ambiente. A mistura deve ser despejada, rapidamente, no espaço compreendido entre as duas placas de vidro. Em seguida, deve-se colocar os “pentes”, na parte



superior do gel, previamente limpos com álcool, para que sejam formados os pocinhos, nos quais são aplicadas as amostras. O gel permanece polimerizando durante, aproximadamente, 30 minutos. Assim que o gel estiver polimerizado, retira-se o “pente” com muito cuidado. Também retira-se o “espaçador” que fica na parte inferior das placas. Coloca-se o tampão de corrida (descrito adiante) na cuba, onde são colocadas as placas de vidro. Caso formem-se bolhas de ar embaixo das placas de vidro, as mesmas são retiradas com o auxílio de uma seringa e uma agulha para evitar que se prejudique a corrida das amostras. As amostras já preparadas são, então, aplicadas no gel com o auxílio de uma micropipeta. Foram colocados 10 μ L das amostras e 20 μ L do tampão de corrida em cada pocinho. Após preenchidos todos os pocinhos, colocam-se as tampas nas cubas e liga-se a fonte em 200 volts, por duas horas.

4.3. Coloração

Decorridas as duas horas, o gel era retirado das placas de vidro e colocado em um recipiente contendo 50 mL de tampão fosfato (pH = 6,2) (descrito a seguir) durante 45 minutos. A seguir, o tampão fosfato era descartado e acrescentavam-se 50 mL da solução corante (descrita a seguir). O gel ficava nesta solução, por uma hora, no escuro. Após esse tempo, a solução corante era descartada e acrescentavam-se 70 mL da solução descorante (descrita adiante). O gel permanecia nesta solução por 24 horas, no escuro.

A coloração faz com que as esterases sejam visualizadas nos géis como bandas de coloração preta ou vermelha, indicando, respectivamente, hidrólise preferencial de α -naftil acetato (α -esterases) ou β -naftil acetato (β -esterases). Alfa e β -naftil acetato atuam como substratos.



4.4. Secagem dos géis

Após as 24 horas, descartava-se a solução descorante e o gel era colocado para secar. Na secagem dos géis foram utilizados gelatina incolor a 5%, papel celofane e bastidores (Ceron *et al.*, 1992). As folhas de papel celofane eram bem molhadas com água. Uma das folhas, já molhada, era então colocada sobre uma das partes do bastidor de tal forma que não ficassem bolhas. Logo em seguida, era espalhada uma pequena quantidade de gelatina incolor sobre a folha de papel celofane. O gel era colocado, com muito cuidado, sobre essa folha e espalhava-se mais um pouco de gelatina sobre o gel. A outra folha de papel celofane era então colocada sobre o gel, eliminando-se todas as bolhas formadas. Em seguida, colocava-se a outra parte do bastidor de tal forma que o gel ficava preso no meio das duas folhas. Eram, então, colocados quatro prendedores grandes no bastidor, para que o gel ficasse bem esticado. O tempo de secagem do gel variou de 24 a 48 horas. Por fim, o gel, envolto no papel celofane, era retirado do bastidor e montado em uma folha de papel sulfite para ser analisado.

4.5. Soluções

1. Tampão de amostra a 10%

- tampão do gel9,0 mL
- glicerol.....1,0 mL

2. Tampão do gel

- TRIS (1,5 M).....18,17 g
- completar para 100 mL, com água destilada
- acertar com HCl (6 M) para pH 8,8
- guardar em frasco escuro, na geladeira, até três meses

3. Tampão fosfato (0,1 M) pH 6,2

- Na_2HPO_4 (0,2 M).....46,25 mL



- NaH_2PO_4 (0,2 M).....203,75 mL
- medir o pH, se este for menor que 6,2, adicionar Na_2HPO_4
e se este for maior que 6,2, adicionar NaH_2PO_4
- completar para 500 mL, com água destilada

4. Tampão de corrida pH 8,3

- TRIS (0,012 M).....1,51 g
- glicina (0,096 M).....7,21 g
- completar para 1 L, com água destilada

5. Solução corante para esterases

- Tampão fosfato (0,1 M) pH 6,2.....100 mL
- n-propanol.....10 mL
- Fast blue Rrsalt.....0,12 g
- alfa-naftil acetato.....0,04 g
- beta-naftil acetato.....0,03 g
- acetona.....1 mL

6. Solução descorante

- ácido acético glacial.....100 mL
- álcool etílico.....250 mL
- água destilada.....650 mL

5. Análise de imagem

A análise de imagem foi utilizada para uma avaliação quantitativa do grau de atividade das bandas, baseada na intensidade de coloração. Foi utilizado o programa Global Lab Image (Data Translation) em microcomputador Pentium e “scanner” Genius.

O procedimento envolve a captura da imagem do gel através do “scanner”, transformação das cores do gel em tons de branco a preto e análise pelo



programa, sendo a intensidade de cor dada em pixels. O programa foi empregado para traçar gráficos de perfil nos quais, a ausência de cor (branco) corresponde ao valor 250 pixels e o preto, corresponde ao valor zero, e entre ambos, há os valores correspondentes aos diferentes tons de cinza. O eixo horizontal do gráfico de perfil representa os pontos ao longo do segmento de linha (amostras no gel) e o eixo vertical representa o valor em pixels em cada ponto (amostra).

6. Análise estatística

A análise estatística foi aplicada aos resultados referentes aos padrões de esterases. Na análise estatística dos dados, com o objetivo de fazer comparações entre os tratamentos, considerando cada banda, foi usado o teste Qui-quadrado para comparações de várias proporções independentes (Fleiss, 1981). Quando houve a rejeição da hipótese de igualdade das proporções, comparações múltiplas, duas a duas, para detectar as diferenças, foram realizadas através do teste Z, aproximação normal, para a diferença entre duas proporções (Bussab & Morettin, 1985).



IV. RESULTADOS

Conforme descrito em Material e Métodos, no presente trabalho foi analisado o efeito da cafeína e do pó de café usado sobre parâmetros biológicos e padrões de esterases, em *Aedes aegypti*.

Para testar o efeito dessas substâncias, no desenvolvimento, na mortalidade e na longevidade dos mosquitos, foram realizados 16 experimentos. Desses experimentos, 13 foram iniciados com ovos (experimentos I ao XIII) e três, com larvas L3 (experimentos XIV ao XVI). Os resultados obtidos são descritos a seguir.

1. Experimento I

A Tabela 3 refere-se ao primeiro experimento, que na verdade constituiu um experimento piloto. Nesse experimento, como já descrito, os ovos foram colocados para eclodir em água, pó de café usado na concentração de 0,025 g/mL e cafeína nas concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL. A água utilizada em todos os meios foi a de torneira. Em cada meio foram preparadas três placas com 20 ovos em cada placa. Esse experimento foi o único em que essas concentrações mais elevadas, de cafeína, foram utilizadas.

Nesse experimento, ocorreu a eclosão de 85% dos ovos na água, 88% na cafeína a 1000 µg/mL, 21% na cafeína a 2000 µg/mL e 52% no pó de café. A taxa de mortalidade larva-adulto foi maior do que a de ovo-larva nos experimentos com apenas água e com cafeína.

Mosquitos adultos foram obtidos apenas no meio controle (água) e no meio com pó de café, correspondendo, respectivamente, ao desenvolvimento de 65% e 30% dos ovos utilizados no experimento. A cafeína a 1000 µg/mL produziu apenas larvas que alcançaram os estádios L1 e L2 (49 e 4 larvas, respectivamente), enquanto que na cafeína a 2000 µg/mL, o desenvolvimento não ultrapassou a fase L1 (13 larvas).

Quanto à velocidade do desenvolvimento, a fase L1, apareceu no segundo dia, a partir do início do experimento, na água e na cafeína a



Tabela3. Experimento I. Número e porcentagem de ovos eclodidos, de adultos produzidos, mortalidade ovo-larva (O-L) e larva-adulto (L-A) e tempo de desenvolvimento, nos quatro tipos de testes. L1 e L2 = larvas de primeiro e de segundo estádios, respectivamente; P = pupa; A = adulto; N = número de indivíduos. Cada teste foi realizado com 60 ovos.

Meios	Ovos Eclodidos	Adultos obtidos	Mortalidade		Tempo de desenvolvimento (dias): início da obtenção do estágio
	N (%)	N (%)	O-L (%)	L-A (%)	
Água (controle)	51 (85)	39 (65)	15	24	2 (L1) 4 (L2) 8 (P) 10 (A)
Cafeína 1000	53 (88)	0	12	100	3 (L1) 13 (L2)
Cafeína 2000	13 (21)	0	78	100	2 (L1)
Pó de café	31 (52)	18 (30)	48	42	3 (L1) 5 (L2) 13 (P) 15 (A)

2000 $\mu\text{g/mL}$, e no terceiro dia, na cafeína a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e no pó de café.

A fase L2 iniciou-se no quarto dia, na água, no quinto dia, no pó de café, e no 13º dia, na cafeína a 1000. Pupas foram produzidas na água, a partir do oitavo dia e no pó de café a partir do 13º dia. Adultos foram obtidos, na água, a partir do 10º dia e, no pó de café, a partir do 15º.

Após esse primeiro experimento, foram preparados, seguidamente, outros dois (experimentos II e III), que não tiveram continuidade porque não houve eclosão dos ovos em nenhum dos meios, nem mesmo no controle.

2. Experimentos IV a XIII

2.1. Produtividade

Entende-se aqui, por produtividade, o número de indivíduos produzidos, a partir dos ovos, em cada experimento.

Os dados referentes aos 10 experimentos subseqüentes constam da Tabela 4. Em todos esses experimentos, foram utilizadas doses de cafeína de 200 $\mu\text{g/mL}$ e de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 0,025 g/mL de pó de café em água. Essa tabela apresenta a produtividade de adultos ou do último estágio quando adultos não foram obtidos a partir dos ovos postos a eclodir. Apesar da variação, entre os experimentos, há um padrão predominante em cada meio. Na água, sete dos dez experimentos produziram adultos, enquanto um experimento não apresentou eclosão (experimento IV), outro mostrou desenvolvimento até a fase de larva L4 (experimento VI) e outro ainda, apenas até a fase de larva L2 (experimento VII). Na cafeína a 200, seis dos dez experimentos desenvolveram-se apenas até a fase L4, um até a fase L3 (experimento XI), outro até a fase L2 (experimento VII), um produziu adultos em número reduzido (experimento VI) e em outro, ainda, não ocorreu eclosão (experimento IV).

Na cafeína a 500, cinco dos dez experimentos desenvolveram-se



Tabela 4. Experimentos IV a XIII, iniciados com 60 ovos em cada meio. Produtividade (em porcentagem) de adultos ou do último estágio, quando adultos não foram obtidos, a partir dos ovos postos a eclodir. A = adultos; L2, L3, L4 = fases larvais; N = número de indivíduos.

Experi- mentos	Meios																
	Água				Cafeína 200				Cafeína 500				Pó de café				
	A		Outro estádio		A		Outro estádio		A		Outro estádio		A		Outro estádio		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
IV	0		-		0		-		0		-		17	(28)		-	
V	1	(2)	-		0		L4 13	(22)		0		L4 6	(10)	20	(33)		-
VI	0		L4 5	(8)	3	(5)	-			0		L4 5	(8)	11	(18)		-
VII	0		L2 2	(3)	0		L2 1	(2)		0		L1 4	(7)	0		P 4	(7)
VIII	8	(13)	-		0		L4 16	(27)		0		L3 1	(2)	38	(63)		-
IX	2	(3)	-		0		L4 2	(3)		0		L3 4	(7)	39	(65)		-
X	22	(37)	-		0		L4 32	(53)		0		L3 5	(8)	15	(25)		-
XI	1	(2)	-		0		L3 10	(17)		0		L3 6	(10)	34	(57)		-
XII	10	(17)	-		0		L4 23	(38)		0		L3 1	(2)	37	(62)		-
XIII	3	(5)	-		0		L4 2	(3)		0		L2 2	(3)	4	(7)		-

até a fase L3, um até a fase L1 (experimento VII), um até a fase L2 (experimento XIII), dois até a fase L4 (experimentos V e VI) e um não apresentou eclosão (experimento IV). No pó de café usado, nove dos dez experimentos produziram adultos, geralmente em número superior ao produzido, nos mesmos experimentos, no meio controle; apenas em um experimento não houve produção de adultos, mas o desenvolvimento ocorreu até a fase de pupa (experimento VII).

A produtividade de adultos foi, assim, visivelmente mais elevada no meio com o pó de café do que no controle, enquanto a produtividade de larvas no meio com 500 $\mu\text{g/mL}$ de cafeína foi acentuadamente menor do que na cafeína a 200 $\mu\text{g/mL}$.

Variação na concentração de pó de café usado no meio, foi realizada no experimento XIII. Nesse experimento, além da concentração de 0,025 g/mL de pó de café, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4, foram utilizadas também, outras duas concentrações de pó de café, para comparação: 0,05 g/mL e 0,1 g/mL. Os resultados mostraram produção de adultos apenas no meio com 0,025 g/mL. Na concentração de 0,05 g/mL (duas colheres de chá rasas de pó de café para meio copo de água) foram obtidas apenas larvas no estágio L2, que não prosseguiram no desenvolvimento. No meio com 0,1 g/mL (quatro colheres de chá rasas de pó de café em meio copo de água) também não houve desenvolvimento, porém dada à alta concentração de grãos do pó de café, no meio, não foi possível verificar se ocorreu a produção de larvas L1 apenas, ou também L2, que são formas muito pequenas, confundindo-se com o meio.

2.2. Taxa de eclosão, produtividade de adultos, por sexo, mortalidade e período de emergência

A Tabela 5 contém, para os experimentos IV a XIII, dados de eclosão, número de adultos produzidos por sexo, mortalidade ovo-larva, mortalidade larva-adulto e período de emergência, a partir do início dos experimentos.



Tabela 5. Experimentos IV a XIII. Taxa de eclosão, número (N) de adultos, fêmeas (F) e machos (M) produzidos, mortalidade ovo-larva (O-L) e larva-adulto (L-A), em porcentagem, e período de emergência dos adultos, a partir do início dos experimentos.

Experi- mentos	Meios	Ovos eclodidos N (%)	Adultos N		Mortalidade (%)		Período de emer- gência dos adultos (dias)	
			F	M	O-L	L-A	F	M
IV	Pó de café	33 (55)	5	12	45	48	22-52	22-47
V	Água	22 (37)	1	0	63	95	30	-
	Cafeína 200	48 (80)	0	0	20	100	-	-
	Cafeína 500	34 (57)	0	0	43	100	-	-
	Pó de café	35 (58)	7	13	42	43	12-25	11-24
VI	Água	19 (32)	0	0	68	100	-	-
	Cafeína 200	14 (23)	0	3	77	78	-	25-48
	Cafeína 500	29 (48)	0	0	52	100	-	-
	Pó de café	14 (23)	5	6	77	21	22-27	18-25
VII	Água	2 (3)	0	0	97	100	-	-
	Cafeína 200	5 (8)	0	0	92	100	-	-
	Cafeína 500	4 (7)	0	0	93	100	-	-
	Pó de café	28 (47)	0	0	53	100	-	-
VIII	Água	46 (77)	3	5	23	83	43-104	43-90
	Cafeína 200	39 (65)	0	0	35	100	-	-
	Cafeína 500	39 (65)	0	0	35	100	-	-
	Pó de café	49 (82)	21	17	18	22	22-39	22-44

Tabela 5. Continuação.

IX	Água	52 (87)	1	1	13	96	92	50
	Cafeína 200	35 (58)	0	0	42	100	-	-
	Cafeína 500	46 (77)	0	0	23	100	-	-
	Pó de café	42 (70)	16	23	30	7	14-34	15-56
X	Água	47 (78)	10	12	22	53	13-43	12-52
	Cafeína 200	45 (75)	0	0	25	100	-	-
	Cafeína 500	40 (67)	0	0	33	100	-	-
	Pó de café	29 (48)	8	7	52	48	23-32	21-28
XI	Água	38 (63)	0	1	37	97	-	118
	Cafeína 200	43 (72)	0	0	28	100	-	-
	Cafeína 500	33 (55)	0	0	45	100	-	-
	Pó de café	37 (62)	22	12	38	8	22-34	21-32
XII	Água	51 (85)	5	5	15	80	31-114	64-122
	Cafeína 200	38 (63)	0	0	37	100	-	-
	Cafeína 500	36 (60)	0	0	40	100	-	-
	Pó de café	45 (75)	17	20	25	18	18-29	17-36
XIII	Água	3 (5)	1	2	95	0	23	37-50
	Cafeína 200	7 (12)	0	0	88	100	-	-
	Cafeína 500	19 (32)	0	0	68	100	-	-
	Pó de café	6 (10)	1	3	90	33	32	20-26

Houve uma grande variação quanto à taxa de eclosão, entre os diferentes experimentos. Entre os nove experimentos que mostraram eclosão em todos os meios, as porcentagens foram maiores na cafeína a 200, em dois experimentos (experimentos V e XI), na cafeína a 500 também em dois experimentos (experimentos VI e XIII), na água em três experimentos (experimentos IX, X e XII) e no pó de café em dois (experimentos VII e VIII).

A razão sexual dos adultos também foi variável. Considerando-se o pó de café, que foi o meio de maior produtividade entre os experimentos, predominou, às vezes o número de fêmeas, outras vezes o número de machos, totalizando 102 fêmeas e 113 machos, número que não difere significativamente de 1 : 1.

A mortalidade ovo-larva e larva-adulto foi bastante elevada sendo que, para a última, ocorreram valores de 100% na quase totalidade dos meios de cafeína a 200 e a 500 µg/mL. Em um único caso (experimento VI) houve produtividade de adultos no meio de cafeína a 200. Em oito dos dez experimentos, a produtividade de adultos foi maior no pó de café, conseqüentemente a taxa de mortalidade foi menor nesse meio.

Quanto ao período de emergência dos adultos, em seis, dos sete experimentos em que esse estágio foi obtido nos meios água e pó de café, o período de emergência foi anterior no pó de café, chegando essa diferença ser superior a dez dias. No experimento XI, em que apenas um adulto foi obtido na água, esse adulto emergiu quase 100 dias mais tarde que os adultos obtidos no pó de café.

2.3. Tempo de desenvolvimento

A Tabela 6 apresenta dados sobre os tempos mínimos e máximos de desenvolvimento, em dias, em cada estágio analisado, nos experimentos IV a XIII, nos meios água e pó de café.

No meio de pó de café houve uma variação relativamente



Tabela 6. Experimentos IV a XIII. Tempos mínimo e máximo de desenvolvimento, em dias, nos meios água e pó de café. L3 = larvas de terceiro estágio; L4 = larvas de quarto estágio; P = pupas; F = fêmeas; M = machos.

Experi- mentos	Estádios	Meios		Experi- mentos	Estádios	Meios	
		Água	Pó de café			Água	Pó de café
IV	L3→L4	-	11-29	IX	L3→L4	21-36	6-13
	L4→P	-	17-40		L4→P	47-89	13-36
	P→F	-	22-51		P→F	92	14-34
	P→M	-	22-47		P→M	50	15-34
V	L3→L4	16-50	8-27	X	L3→L4	5-47	12-22
	L4→P	27	10-31		L4→P	9-50	19-22
	P→F	30	12-25		P→F	13-43	23-31
	P→M	-	11-24		P→M	12-49	21-26
VI	L3→L4	13-25	11-27	XI	L3→L4	7-122	11-17
	L4→P	-	14-39		L4→P	116	18-29
	P→F	-	22-27		P→F	-	22-34
	P→M	-	18-25		P→M	118	21-32
VII	L3→L4	-	8-10	XII	L3→L4	7-102	9-15
	L4→P	-	22-29		L4→P	28-133	15-26
	P→F	-	-		P→F	31-121	18-29
	P→M	-	-		P→M	64-122	17-36
VIII	L3→L4	15-95	10-17	XIII	L3→L4	9-10	13-25
	L4→P	39-102	19-40		L4→P	21-47	17-29
	P→F	43-104	22-39		P→F	23	32
	P→M	47-90	22-44		P→M	37-50	20-26

grande nos tempos de desenvolvimento. Essa variação acompanhou, aproximadamente, as variações de temperatura (ver Tabela 2), mas foi a passagem de L4 para pupa a fase do desenvolvimento mais afetada, havendo experimentos em que a diferença em dias, nessa passagem, foi igual a quatro (experimento XIII), a seis (experimentos IV e XII), a sete (experimentos IX, X e XI), a nove (experimento VIII) e a 14 dias (experimento VII) nos períodos de temperatura mais baixa, enquanto nas temperaturas mais elevadas, foi de dois ou três dias (experimentos V e VI). Com relação ao meio água, os tempos de desenvolvimento foram muito maiores nas mesmas fases, havendo entre os tempos iniciais dos estádios, uma diferença de 24 (experimento VIII), 26 (experimento IX) ou até mais dias. Também os intervalos, entre o primeiro dia de aparecimento das fases larvais e adultos, e o último dia, são muito maiores na água do que no meio de pó de café.

Os meios com cafeína a 200 e a 500 não foram considerados, nessa tabela, tendo em vista o pequeno número de indivíduos produzidos e o pequeno número de experimentos que os produziram. Contudo, nos experimentos V e VI, nos quais foram obtidas larvas L4, no meio com cafeína a 200 $\mu\text{g/mL}$ o período de obtenção do mesmo foi do 22º ao 50º dia, no experimento V e do 7º ao 25º, no experimento VI. Já no meio com cafeína a 500 $\mu\text{g/mL}$, o período de obtenção do mesmo estágio foi do 30º ao 50º dia, no experimento V e do 12º ao 29º dia, no experimento VI.

2.4. Longevidade dos adultos

A Tabela 7 contém dados sobre a longevidade dos adultos nos meios água e pó de café, para os experimentos I, IV a VI e VIII a XIII. De modo geral, as fêmeas têm uma longevidade maior do que os machos em ambos os meios. Observa-se também que a longevidade máxima de fêmeas e machos foi maior na água do que no pó de café (ver experimentos I, VIII e X). Como foi mencionado em Material e Métodos, não há uma metodologia desenvolvida para análise individual da longevidade dos mosquitos, trata-se, na maior parte dos



Tabela 7. Experimentos I, IV a VI e VIII a XIII. Número de fêmeas e machos produzidos e sua longevidade mínima e máxima, entre parênteses, em cada experimento, nos meios água e pó de café. Os asteriscos indicam mosquitos cuja longevidade pôde ser verificada individualmente.

Experimentos	Água		Pó de café	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
I	20 (1-140)	19 (2-33)	12 (1-34)	6 (1-19)
IV	-	-	5 (6-58)	12 (1-63)
V	1 (20)*	-	7 (1-59)	13 (1-53)
VI	-	-	5 (1-69)	6 (1-41)
VIII	3 (1-82)*	5 (1-17)*	21 (1-43)	17 (1-14)
IX	1 (46)*	1 (33)*	16 (1-70)	23 (1-41)
X	10 (8-125)	12 (1-85)	8 (1-99)	7 (1-77)
XI	-	1 (59)*	22 (1-124)	12 (1-75)
XII	5 (18-89)	5 (11-108)	17 (1-123)	20 (1-58)
XIII	1 (1)*	2 (1-9)*	1 (74)*	3 (1-86)*

experimentos, de uma estimativa dessa característica, em que se tem a data de nascimento e a data da morte dos mosquitos, sem que nem sempre se possa dizer qual a data de nascimento dos computados mortos. Nos experimentos assinalados com asterisco, porém, essa associação foi possível. Na maioria dos demais, essa determinação foi também possível para alguns dos mosquitos.

3. Experimentos XIV a XVI

3.1. Produtividade, mortalidade e período de emergência

A Tabela 8 refere-se aos experimentos XIV a XVI que diferiram dos anteriores por terem sido iniciados com larvas L3 ao invés de ovos. No experimento XIV, a maior produtividade de adultos ocorreu na água, seguida do pó de café. Nos experimentos XV e XVI porém, a produtividade no pó de café foi baixa, sendo que no experimento XVI foi menor do que na cafeína a 200. No experimento XVI a produtividade na cafeína a 100 não diferiu da produtividade na água.

A mortalidade larva-adulto nesses experimentos também variou, tendo sido maior no meio de cafeína a 200, para os experimentos XIV e XV. No experimento XVI, embora tenha sido elevada nesse meio também, foi ainda maior no pó de café.

Quanto ao período de emergência dos adultos, nos três experimentos e na maioria dos meios, foi mais precoce para machos do que para fêmeas. Nos experimentos XIV e XVI o desenvolvimento no pó de café foi mais rápido do que na água, para fêmeas e machos no experimento XVI, e para fêmeas no experimento XIV.



Tabela 8. Experimentos XIV a XVI, iniciados com larvas L3. Número de fêmeas (F) e machos (M) adultos produzidos, mortalidade larva-adulto e período de emergência dos adultos, em dias, a partir do início de cada experimento. N/meio = número de larvas, em cada meio, que deram início ao experimento.

Experi- mentos	N/meio	Meios	Adultos		Mortalidade (%)	Período de emergência dos adultos (dias)	
			F	M	L-A	F	M
XIV	15	Água	6	8	7	25-37	12-36
		Cafeína 100	5	4	40	25-37	25-38
		Cafeína 200	0	3	80	-	27
		Pó de café	6	8	7	20-24	16-26
XV	8	Água	5	3	0	15	11-23
		Cafeína 100	4	3	12	15-17	14-17
		Cafeína 200	2	1	62	15	18
		Pó de café	3	1	50	18-21	15
XVI	15	Água	8	4	20	30-49	30-49
		Cafeína 100	6	6	33	31-49	16-49
		Cafeína 200	2	3	67	29-38	24-49
		Pó de café	1	2	80	24	25-26

3.2. Tempo de desenvolvimento

A Tabela 9 apresenta os tempos de desenvolvimento observados nos experimentos XIV a XVI, em todos os meios. Nestes experimentos, por terem sido iniciados com larvas ao invés de ovos, há uma redução no tempo de início de aparecimento dos estádios e, conseqüentemente, também do seu término.

O pequeno número de indivíduos analisados dificulta o entendimento desses resultados. Nos três experimentos, o tempo de início de obtenção dos machos é freqüentemente mais curto do que o das fêmeas.

3.3. Mortalidade de larvas e pupas e longevidade de adultos

A Tabela 10 apresenta dados de mortalidade para os experimentos XIV a XVI, abrangendo os quatro meios e as fases L3, L4 e pupa, além dos adultos, em que a mortalidade fornece uma medida da longevidade. É interessante observar que, na cafeína, as larvas chegam a permanecer 51 e 67 dias e as pupas, até 36 dias, nessas fases. Após longo período algumas prosseguem no desenvolvimento. Essa tabela mostra mais uma vez a longevidade maior das fêmeas adultas do que dos machos e que a longevidade das fêmeas e machos é menor na cafeína do que na água, nos três experimentos.

4. Esterases

Os tratamentos mostraram alteração em cinco bandas, numeradas conforme Lima-Catelani (1996): EST-1, EST-3, EST-7, EST-19 e EST-20. As Figuras 4 a 7 mostram a localização dessas bandas e suas características quanto à afinidade pelo substrato α -naftil acetato (bandas de cor preta) ou pelo substrato β -naftil acetato (bandas de cor vermelha) e quanto ao grau de atividade (bandas mais, ou menos espessas e coradas). As bandas EST-1, EST-



Tabela 9. Experimentos XIV a XVI, iniciados com larvas L3. Tempos mínimo e máximo de desenvolvimento, em dias, a partir do início dos experimentos. L3 = larvas de terceiro estágio; L4 = larvas de quarto estágio; P = pupas; F = fêmeas; M = machos.

Experimentos	Estádios	Meios			
		Água	Cafeína 100	Cafeína 200	Pó de café
XIV	L3→L4	5	5	5-8	8-11
	L4→P	10-32	22-36	11-24	14-24
	P→F	25-37	25-37	-	20-24
	P→M	12-36	25-38	26	16-26
XV	L3→L4	4-7	3-7	3-4	7-14
	L4→P	9-20	12-15	12-15	12-18
	P→F	15	15-17	15	18-21
	P→M	11-23	14-17	18	15
XVI	L3→L4	5	5	9-23	5-15
	L4→P	27-38	12-40	19-37	19-25
	P→F	30-49	31-49	29-38	24
	P→M	30-49	16-49	24-49	25-26

Tabela 10. Experimentos XIV a XVI. Número de indivíduos mortos nas diferentes fases do desenvolvimento. Entre parênteses, a idade ou a idade mínima e a máxima, em dias, na época da morte dos mosquitos. L3 = larvas de terceiro estágio; L4 = larvas de quarto estágio; P = pupas; A = adultos; F = fêmeas; M = machos; N/meio = número de larvas em cada meio, no início do experimento. Os asteriscos indicam mosquitos cuja longevidade pôde ser verificada individualmente.

Experi- mentos	N/meio	Estádios	Meios			
			Água	Cafeína 100	Cafeína 200	Pó de café
XIV	15	L3	1 (8)	0	0	0
		L4	0	3 (10-67)	11 (8-51)	1 (11)
		P	0	3 (25-36)	1 (11)	0
		A F	6 (3-101)	5 (1-71)	0	6 (1-85)
		M	8 (1-105)	4 (1-13)*	3 (2-86)*	8 (2-52)
XV	8	L3	0	0	1 (18)	2 (7)
		L4	0	1 (21)	3 (7-19)	0
		P	0	0	1 (14)	2 (18)
		A F	5 (77-96)	4 (12-34)	2 (1-14)*	3 (1-32)*
		M	3 (1-36)	3 (1-3)*	1 (26)*	1 (13)*
XVI	15	L3	0	0	5 (5-34)	11 (11-16)
		L4	2 (31-49)	3 (32-49)	5 (31-61)	1 (11)
		P	1 (31)	0	0	0
		A F	8 (3-90)	6 (15-75)	2 (60-69)*	1 (77)*
		M	4 (2-51)	6 (1-35)	3 (1-49)*	2 (68-82)*

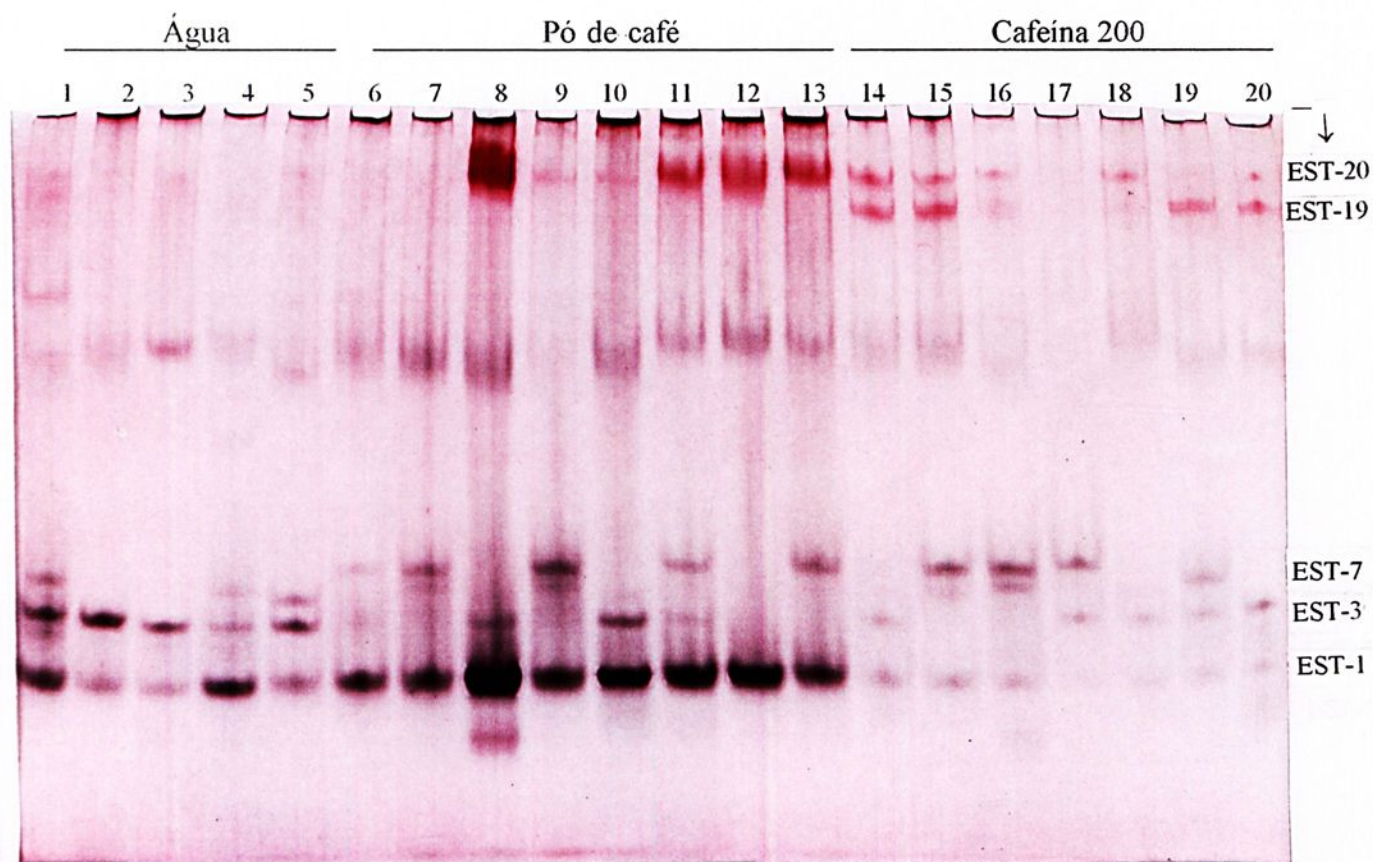


Figura 4. Padrão de esterases de *A. aegypti*, no estágio L4, no meio controle (1 a 5) e nos meios tratados com pó de café usado (6 a 13) e com cafeína a 200µg/mL (14 a 20). As bandas numeradas correspondem às esterases que apresentaram alteração do grau de atividade nos tratamentos.

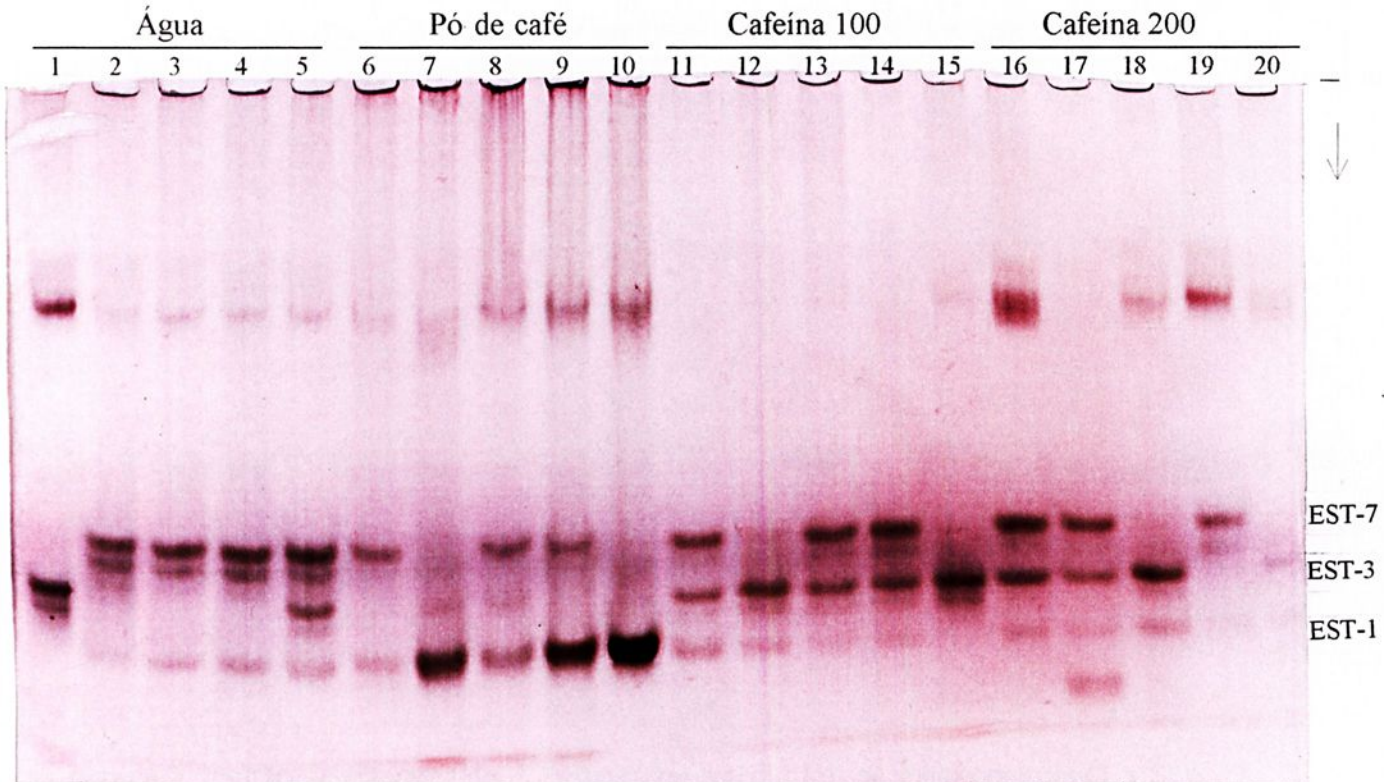


Figura 5. Padrão de esterases de *A. aegypti*, no estágio L4, no meio controle (1 a 5) e nos meios tratados com pó de café usado (6 a 10), com cafeína a 100µg/mL (11 a 15) e com cafeína a 200µg/mL (16 a 20). As bandas numeradas correspondem às esterases que aparentaram alteração do grau de atividade nos tratamentos.

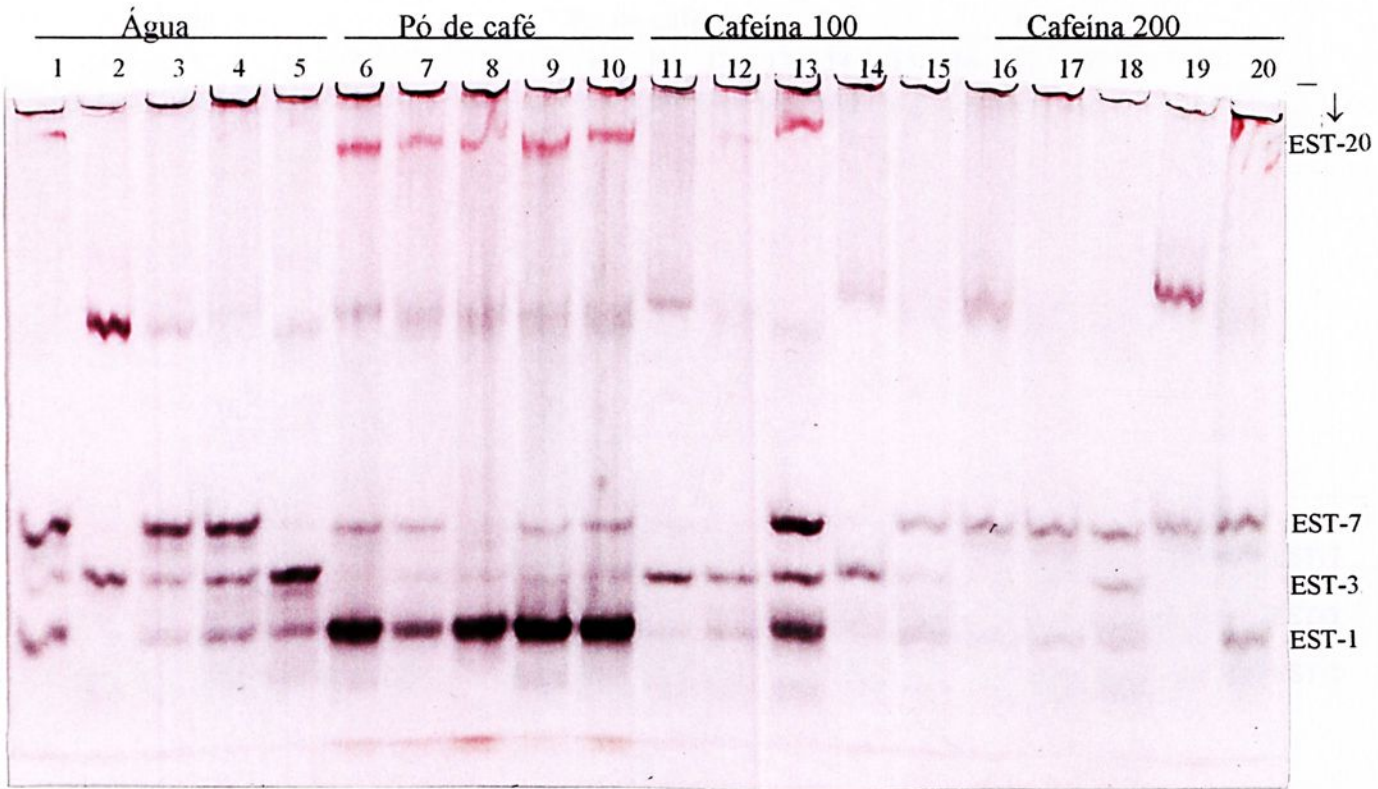


Figura 6. Padrão de esterases de *A. aegypti*, no estágio L4, no meio controle (1 a 5) e nos meios tratados com pó de café usado (6 a 10), com cafeína a 100µg/mL (11 a 15) e com cafeína a 200µg/mL (16 a 20). As bandas numeradas correspondem às esterases que aparentaram alteração do grau de atividade nos tratamentos.

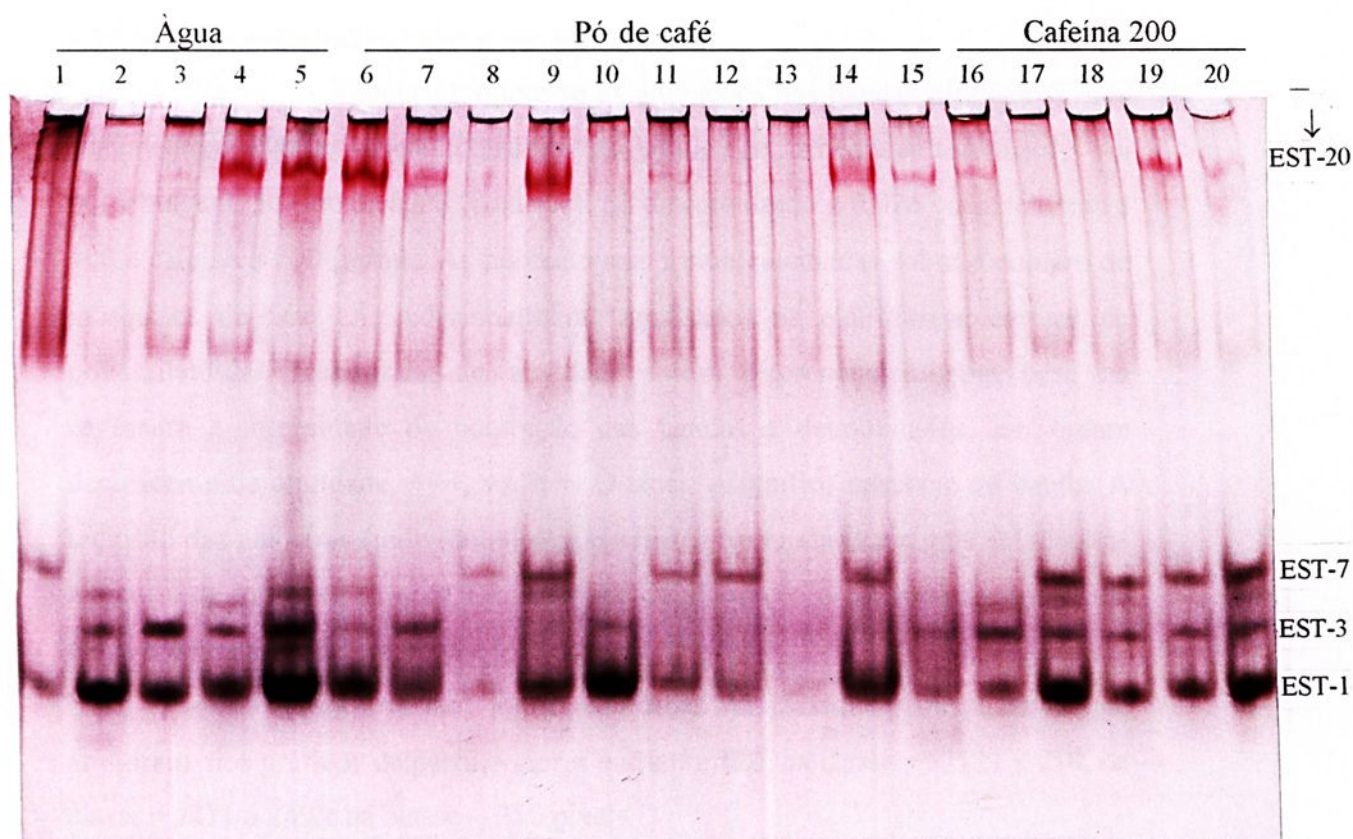


Figura 7. Padrão de esterases de *A. aegypti*, no estágio L4, no meio controle (1 a 5) e nos meios tratados com pó de café usado (6 a 15) e com cafeína a 200µg/mL (16 a 20). As bandas numeradas correspondem às esterases que apresentaram alteração do grau de atividade nos tratamentos.

3 e EST-7 são classificadas como α -esterases, e as bandas EST-19 e EST-20, como β -esterases. As alterações que ocorreram nas bandas mencionadas abrangem frequências de presença ou ausência da banda e alteração do grau de atividade nas amostras tratadas e não tratadas.

A Tabela 11 refere-se às alterações das bandas esterásicas, nos tratamentos. Nessa tabela constam os graus de atividade esterásica, em porcentagem, nos meios água (controle), pó de café usado a 0,025 g/mL, cafeína a 100 e cafeína a 200 μ g/mL. As porcentagens foram calculadas sobre o número de mosquitos da fase L4, individualmente analisados na eletroforese em gel de poliacrilamida. Três graus de atividade foram diferenciados, com base na espessura e intensidade de coloração das bandas e denominados, em ordem decrescente de atividade, +++, ++ e +. O sinal – significa ausência da banda. A inclusão das amostras (indivíduos) nessas classes foi baseada em géis submetidos à análise de imagem, na qual a intensidade de coloração é convertida em tons de cinza e dimensionada em pixels.

Desta forma, foram colocadas na classe +++ as bandas que atingiram, nos gráficos de perfil, valores entre 0 e 120, na classe ++, 121 a 210, na classe +, 211 a 249 e na classe –, 250 pixels.

As Figuras 8 a 12 apresentam os gráficos de perfil que correspondem às bandas dos géis das Figuras 4 a 7, mostrando as variações de intensidade dos tons de cinza que correspondem ao grau de atividade das bandas, em cada larva. Os gráficos de perfil fornecem dados para cada uma das cinco bandas, aparentemente alteradas pelos tratamentos. A Figura 8 refere-se à banda EST-1 que apresentou os maiores graus de atividade, entre as cinco bandas analisadas. As Figuras 9 a 12 correspondem, respectivamente, às bandas esterásicas EST-3, EST-7, EST-19 e EST-20. A banda EST-19 (Figura 11) foi a que apresentou os menores graus de atividade entre as bandas analisadas.

Os dados da Tabela 11 permitiram realizar, estatisticamente, dois tipos de comparação: a) quanto à presença ou ausência das bandas e b) quanto às frequências maiores que + e iguais a + (graus de atividade).

Na comparação quanto às frequências de mosquitos, com e sem atividade esterásica, referente às cinco bandas, foram obtidos os valores de qui-



Tabela 11. Bandas esterásicas, em mosquitos da fase L4, que apresentaram variação entre os meios de tratamento, quanto à presença e grau de atividade. N = número de larvas analisadas.

Bandas	Meios	N	Graus de atividade esterásica (%)			
			+++ (0-120)	++ (121-210)	+ (211-249)	- (250)
EST-1	Água	99	4,04	32,32	53,53	10,10
	Pó de café	124	27,42	25,00	33,87	13,71
	Cafeína 100	100	1,00	2,00	83,00	14,00
	Cafeína 200	77	2,60	10,40	61,04	25,97
EST-3	Água	99	28,28	26,26	25,25	20,20
	Pó de café	124	-	7,26	63,71	29,03
	Cafeína 100	100	7,00	43,00	18,00	32,00
	Cafeína 200	77	12,99	25,97	23,38	37,66
EST-7	Água	99	22,22	26,26	17,17	34,34
	Pó de café	124	1,61	13,71	47,60	37,09
	Cafeína 100	100	16,00	42,00	18,00	24,00
	Cafeína 200	77	19,48	33,76	19,48	27,27
EST-19	Água	99	-	-	12,12	87,87
	Pó de café	124	-	2,42	14,52	83,06
	Cafeína 100	100	-	2,00	6,00	92,00
	Cafeína 200	77	-	-	10,39	89,61
EST-20	Água	99	-	3,03	10,10	86,86
	Pó de café	124	0,81	9,68	21,78	67,74
	Cafeína 100	100	-	1,00	1,00	98,00
	Cafeína 200	77	-	-	15,60	84,41

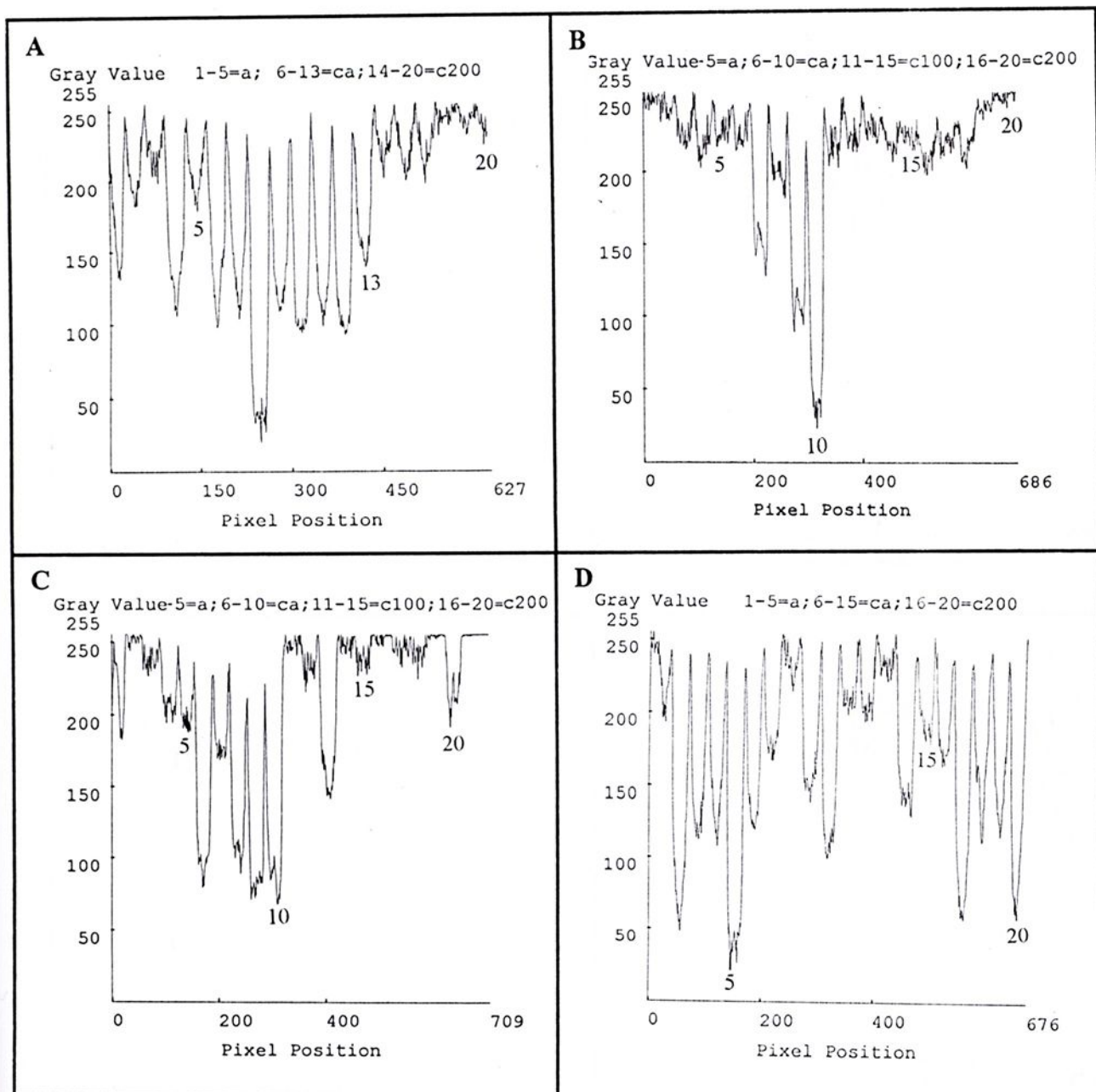


Figura 8 A-D. Gráficos de perfil, obtidos pelo analisador de imagens, mostrando as variações de intensidade de coloração da banda EST-1, nos géis apresentados, respectivamente, nas Figuras 4, 5, 6 e 7. No eixo horizontal são apresentadas as variações entre as amostras analisadas e no eixo vertical constam os valores correspondentes aos graus de coloração cinza. a = água; ca = pó de café; c100 = cafeína 100; c200 = cafeína 200.

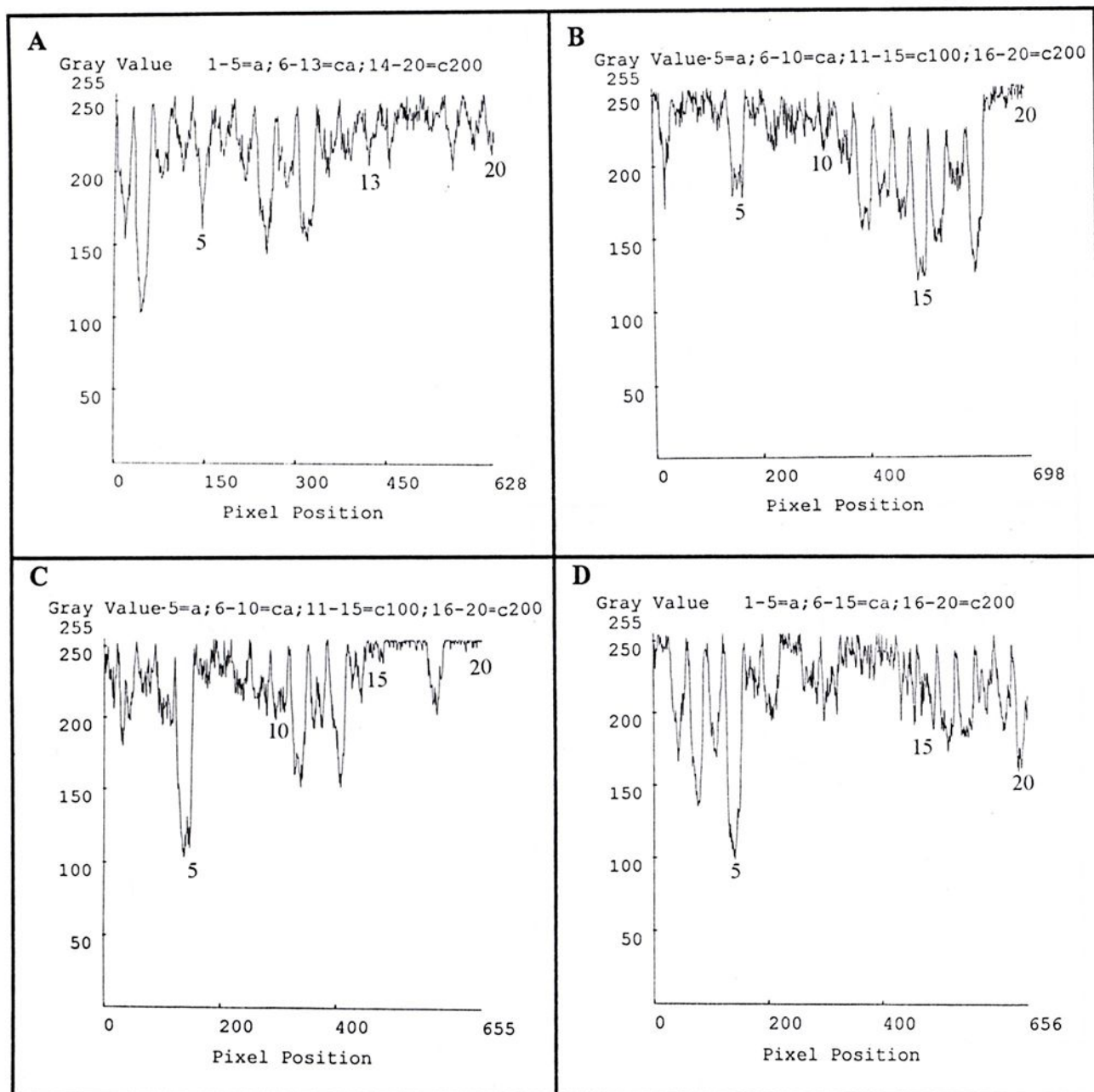


Figura 9 A-D. Gráficos de perfil, obtidos pelo analisador de imagens, mostrando as variações de intensidade de coloração da banda EST-3; nos géis apresentados, respectivamente, nas Figuras 4, 5, 6 e 7. No eixo horizontal são apresentadas as variações entre as amostras analisadas e no eixo vertical constam os valores correspondentes aos graus de coloração cinza. a = água; ca = pó de café; c100 = cafeína 100; c200 = cafeína 200.

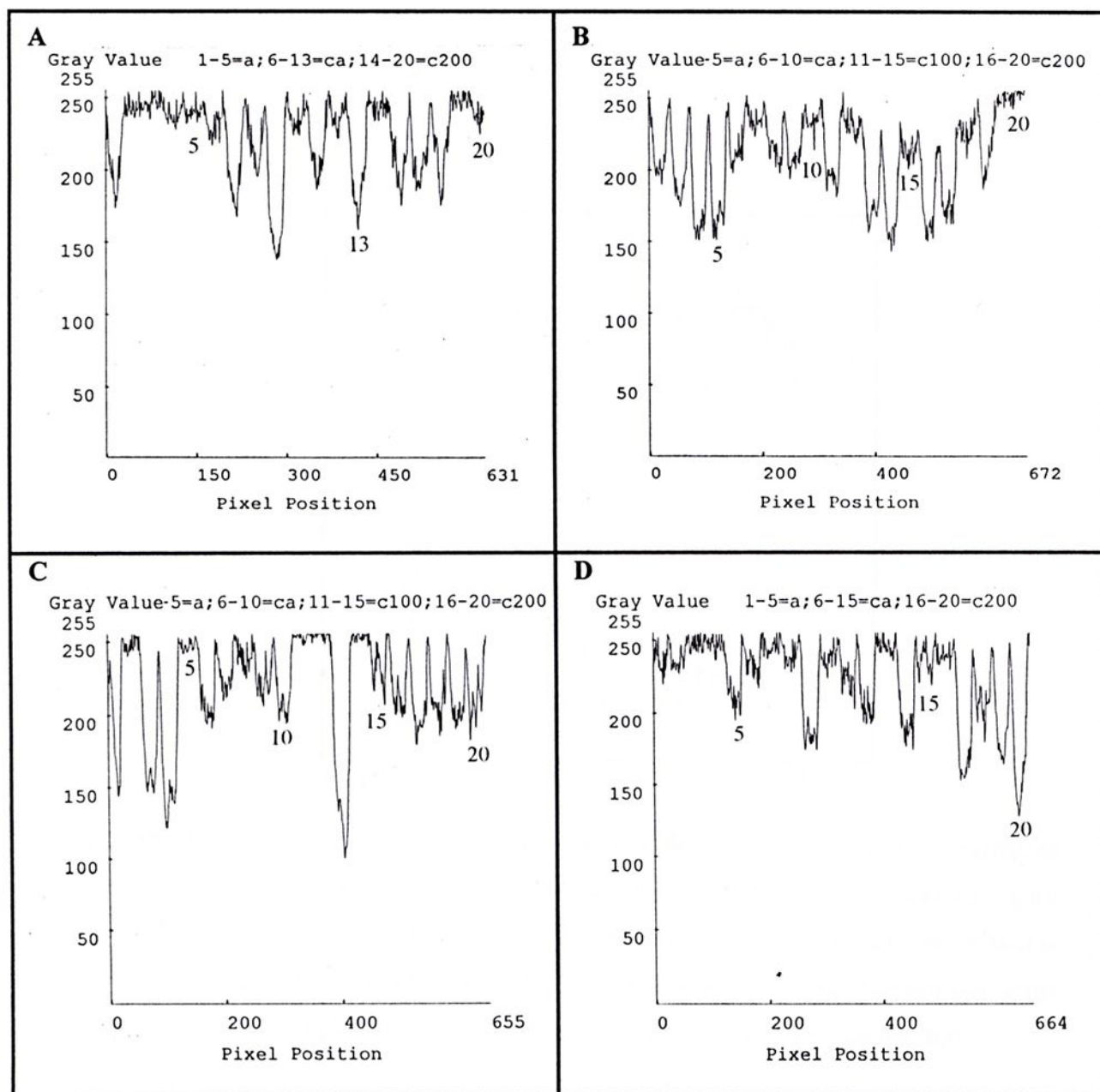


Figura 10 A-D. Gráficos de perfil, obtidos pelo analisador de imagens, mostrando as variações de intensidade de coloração da banda EST-7, nos géis apresentados, respectivamente, nas Figuras 4, 5, 6 e 7. No eixo horizontal são apresentadas as variações entre as amostras analisadas e no eixo vertical constam os valores correspondentes aos graus de coloração cinza. a = água; ca = pó de café; c100 = cafeína 100; c200 = cafeína 200.

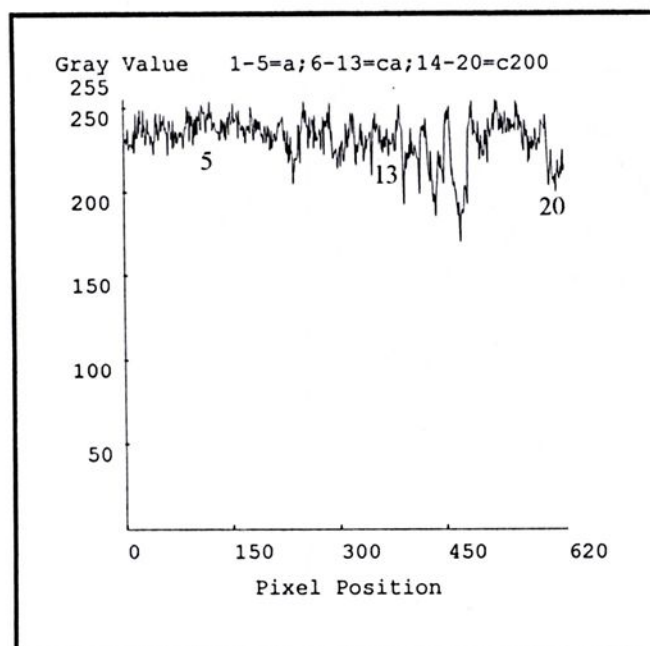


Figura 11. Gráfico de perfil, obtido pelo analisador de imagens, mostrando as variações de intensidade de coloração da banda EST-19, no gel apresentado, na Figura 4. No eixo horizontal são apresentadas as variações entre as amostras analisadas e no eixo vertical constam os valores correspondentes aos graus de coloração cinza. a = água; ca = pó de café; c200 = cafeína 200.

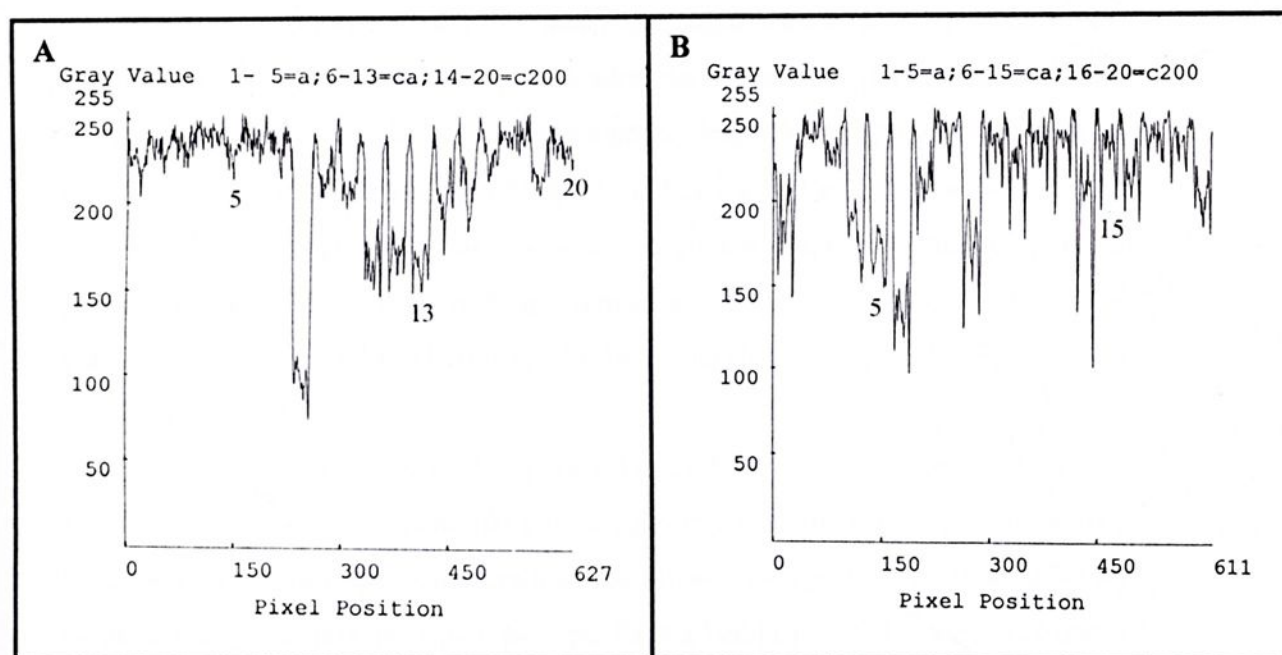


Figura 12 A-B. Gráficos de perfil, obtidos pelo analisador de imagens, mostrando as variações de intensidade de coloração da banda EST-20, nos géis apresentados, respectivamente, nas Figuras 4 e 7. No eixo horizontal são apresentadas as variações entre as amostras analisadas e no eixo vertical constam os valores correspondentes aos graus de coloração cinza. a = água; ca = pó de café; c200 = cafeína 200.

quadrado constantes da Tabela 12 (como foi mencionado em Material e Métodos, foi usado o teste de qui-quadrado para comparação de várias proporções independentes). De acordo com essa tabela, o teste de qui-quadrado mostrou-se estatisticamente significativo somente para as bandas EST-1 e EST-20.

Foram realizados desdobramentos através das comparações múltiplas das proporções, duas a duas, em cada banda em que o teste foi significativo. Os resultados são apresentados na Tabela 13, em forma matricial, sendo que os números 1, 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, aos tratamentos com água, pó de café usado a 0,025 g/mL, cafeína a 100 e cafeína a 200 µg/mL. Abaixo da diagonal estão os valores calculados para as diferenças entre proporções dos tratamentos correspondentes entre linha e coluna, e acima da diagonal, o valor do DMS (Diferença Mínima Significante), $z = 1,96$ para o nível de significância de 5%.

Observou-se que para a banda EST-1 a proporção de ausência da atividade esterásica encontrada para a cafeína a 200 foi maior que nos outros três tratamentos, que são considerados estatisticamente iguais. A relação entre as proporções é dada por: $p_4 > p_1 = p_2 = p_3$. Para a banda EST-20, observa-se que a cafeína a 100 apresentou maior proporção de ausência de atividade esterásica, e o pó de café apresentou a menor proporção de ausência de atividade esterásica. Já para os meios água e cafeína a 200 não houve diferença significativa. Então em termos de proporções pode-se estabelecer a seguinte relação: $p_3 > p_1 = p_4 > p_2$ (ver Tabela 11).

Quanto à comparação do grau de atividade, foi preciso, para fins de análise, a junção das colunas de valores correspondentes às atividades esterásicas +++ com ++. Portanto, a comparação foi de (+++ e ++) com +. Os resultados das proporções correspondentes são apresentados na Tabela 14, com a soma das colunas +++ e ++.

A comparação dessas proporções independentes foi feita pelo qui-quadrado e seus resultados estão apresentados na Tabela 15, mostrando diferenças significantes para as bandas EST-1, EST-3 e EST-7. O teste não pôde ser aplicado à banda EST-20 devido à sua baixa frequência.



Tabela 12. Valores de qui-quadrado e significância ao nível de 5%, para comparação das frequências de mosquitos com e sem atividade esterásica, nos diferentes meios.

Bandas	χ^2_{obs}	$\chi^2_{\text{crítico}}$	Significância
EST-1	9,42	7,81	S
EST-3	7,36	7,81	Ns
EST-7	5,36	7,81	Ns
EST-19	4,52	7,81	Ns
EST-20	36,86	7,81	S

Tabela 13. Comparações múltiplas das proporções, duas a duas, para presença ou ausência das bandas. 1 = água; 2 = pó de café; 3 = cafeína 100; 4 = cafeína 200; * = valores estatisticamente significantes.

Banda EST-1					Banda EST-20				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1			1,96		1			1,96	
2	0,92				2	3,56*			
3	0,87	0			3	3,05*	6,80*		
4	2,76*	2,04*	1,97*		4	0,56	2,71*	3,18*	

Tabela 14. Valores das proporções, considerando as classes + e acima de +.

Bandas	Meios	> +	+	N
EST-1	Água	0,41	0,59	89
	Pó de café	0,61	0,39	107
	Cafeína 100	0,04	0,96	86
	Cafeína 200	0,18	0,82	57
EST-3	Água	0,68	0,32	79
	Pó de café	0,10	0,90	88
	Cafeína 100	0,74	0,26	68
	Cafeína 200	0,63	0,37	48
EST-7	Água	0,74	0,26	65
	Pó de café	0,24	0,76	78
	Cafeína 100	0,76	0,24	76
	Cafeína 200	0,73	0,27	56
EST-19	Água	0,00	1,00	12
	Pó de café	0,14	0,86	21
	Cafeína 100	0,25	0,75	8
	Cafeína 200	0,00	1,00	8
EST-20	Água	0,23	0,77	13
	Pó de café	0,33	0,67	40
	Cafeína 100	0,50	0,50	2
	Cafeína 200	0,00	1,00	12

Tabela 15. Valores de qui-quadrado e significância ao nível de 5%, para comparações quanto ao grau de atividade das bandas, nos diferentes meios.

Bandas	χ^2_{obs}	χ^2_{critico}	Significância
EST-1	77,59	7,81	S
EST-3	85,44	7,81	S
EST-7	59,53	7,81	S
EST-19	4,59	7,81	Ns

Em função da significância estatística observada nessas bandas, as comparações múltiplas, duas a duas, foram realizadas através do teste Z de aproximação normal para comparação de duas proporções independentes, cujos resultados estão descritos na Tabela 16. Observa-se que, para a banda EST-1, todas as comparações foram estatisticamente significantes, sendo que, na seqüência da menor para a maior expressão constam a cafeína a 100, a cafeína a 200, a água e o pó de café ($p_3 < p_4 < p_1 < p_2$). Para as bandas EST-3 e EST-7, apenas o pó de café, de menor atividade esterásica, difere significativamente dos outros três meios, que por sua vez, não diferem entre si ($p_2 < p_1 = p_3 = p_4$). No caso da banda EST-19, não houve diferença estatisticamente significativa entre os meios, que apresentaram percentuais elevados de baixa atividade esterásica (ver Tabela 14). Neste caso, $p_4 = p_3 = p_2 = p_1$.



Tabela 16. Comparações múltiplas das proporções, duas a duas, considerando as classes com atividade esterásica. 1 = água; 2 = pó de café; 3 = cafeína 100; 4 = cafeína 200; * = valores estatisticamente significantes.

Banda EST-1					Banda EST-3				
	1	2	3	4		1	2	3	4
1			1,96		1			1,96	
2	2,86*				2	9,66*			
3	7,40*	11,4*			3	0,86	10,7*		
4	3,28*	6,14*	2,80*		4	0,62	6,97*	1,26	

Banda EST-7				
	1	2	3	4
1			1,96	
2	7,14*			
3	0,28	7,43*		
4	0,12	6,50*	0,37	

V. DISCUSSÃO



O fato do *Aedes aegypti* ser transmissor de doenças graves, ao homem, torna relevante o estudo de suas características biológicas, bem como de suas respostas a alterações do ambiente. O conjunto desses conhecimentos pode contribuir para que surjam novas formas de controle desse organismo, hoje, basicamente, realizado pelo uso de inseticidas. Esse método de controle é preocupante porque, por um lado, sabe-se que os inseticidas são prejudiciais para a vida e o meio ambiente, devido à sua elevada toxicidade e por outro, sabe-se que os organismos desenvolvem resistência a esses compostos, o que, com o tempo, pode tornar inócua, a sua ação.

No presente trabalho analisamos o efeito da cafeína sobre alguns parâmetros biológicos de *A. aegypti*. O objetivo principal foi o de verificar se essa substância causaria os mesmos efeitos observados anteriormente em *Drosophila*, em estudos realizados em nosso laboratório, abrangendo redução de produtividade, aumento do tempo de desenvolvimento e redução da longevidade. Em caso positivo, a cafeína talvez pudesse vir a ser utilizada como um auxiliar no controle de *Aedes*. Por essa razão, foi também testado o pó de café usado, de fácil acesso à população, e que eventualmente poderia vir a ser colocado em pratos de vasos de flores e outros recipientes domésticos no lugar dos organofosforados granulados (abate), presentemente utilizados, com riscos, principalmente, para crianças e animais domésticos.

Os resultados mostraram que a cafeína exerce um efeito dose-dependente sobre o desenvolvimento de *A. aegypti*. Nos experimentos iniciados com ovos, o desenvolvimento foi bloqueado na fase de L1, no meio com cafeína a 2000 µg/mL e em L2, no meio contendo 1000 µg/mL (Tabela 3). Nos dez experimentos em que foram usadas as concentrações de 500 e 200 µg/mL, na primeira concentração, cinco mostraram paralisação do desenvolvimento na fase L3, um na fase L2, um na fase L1 e apenas dois prosseguiram até L4, enquanto na segunda concentração, um experimento produziu poucos adultos, seis prosseguiram até L4, um foi bloqueado em L3 e um em L2. Já os três experimentos iniciados com larvas L3 e concentrações de 100 e 200 µg/mL de cafeína, produziram adultos, em número maior na primeira do que na segunda



concentração. Portanto, quanto maior a concentração de cafeína, mais precoce o bloqueio do desenvolvimento.

A dependência de dose verificada nesses experimentos com *Aedes*, confirma dados da literatura obtidos com outros organismos. Um dos trabalhos que relatam efeito de dose da cafeína é o de Bertrand *et al.* (1965, *apud* Timson, 1977). Esses autores observaram esse efeito na produção de ectrodactilia em descendentes de ratas grávidas, tratadas com cafeína. Também Itoyama (1989), Itoyama & Bicudo (1992) e Itoyama *et al.* (1998) observaram, em *Drosophila prosaltans*, redução significativa da produtividade, da longevidade e da capacidade de oviposição, diretamente proporcional à concentração da cafeína no meio.

Os dados do presente trabalho indicaram que a taxa de eclosão não parece ser afetada pela presença de cafeína no meio de criação, em qualquer das concentrações utilizadas. Apenas no meio a 2000 µg/mL houve uma taxa de eclosão reduzida, quando comparada com o meio de 1000 µg/mL do mesmo experimento, mas como foi realizado apenas um experimento com essas concentrações, não se pode afirmar que a redução seja, de fato, devida à concentração de cafeína utilizada.

Em *Aedes*, o tempo de desenvolvimento também parece ser afetado pela cafeína. Nos dois experimentos em que foram obtidas larvas L4 nas concentrações 200 e 500 µg/mL (experimentos V e VI), o tempo de desenvolvimento foi maior na concentração mais elevada. Nos experimentos iniciados com larvas L3, o fato de terem sido realizados com pequeno número de larvas, dificulta que sejam tiradas conclusões mais amplas. Os resultados obtidos nesses experimentos, nos meios com cafeína a 100 e a 200 µg/mL, são até certo ponto, conflitantes. Apenas no experimento XVI há um atraso no desenvolvimento das larvas L3 para L4, no meio com 200 µg/mL de cafeína em relação ao meio com 100 µg/mL. Pode-se pensar que o período mais importante de atuação da cafeína no desenvolvimento sejam as fases L1 e L2, que nesses experimentos, iniciados com larvas L3, escapam a essa ação. Também os indivíduos em L3, com os quais foram iniciados os experimentos, poderiam estar



em condição assincrônica com relação ao desenvolvimento, sofrendo assim, em tempo e grau variáveis, a ação da cafeína, antes de atingir a fase de L4. Entretanto, quando se observa o período de emergência dos adultos machos, verifica-se que tanto no experimento XIV, como no XV e XVI, aquele inicia-se mais tardiamente na cafeína a 200 $\mu\text{g/mL}$ do que na cafeína a 100 $\mu\text{g/mL}$, o que, ressalvado o número relativamente pequeno de indivíduos, pode estar indicando atraso no desenvolvimento desse sexo.

Os dados obtidos sugerem, ainda, que a cafeína exerce efeito sobre a longevidade máxima das fêmeas adultas. Na água, esta foi maior do que na cafeína a 100 e nesta, maior do que na cafeína a 200, mostrando, assim, efeito dose-dependente. A longevidade dos machos foi maior na água em relação à cafeína.

Os dados permitiram verificar, também, nesses experimentos iniciados com larvas L3, que a mortalidade dos mosquitos, nas fases de larva e pupa, nem sempre acompanha a concentração de cafeína. No experimento XIV, as fases de L4 e pupas apresentaram mortalidade mais precoce no meio com cafeína a 200 $\mu\text{g/mL}$ do que no meio com cafeína a 100 $\mu\text{g/mL}$. Já no experimento XVI a mortalidade de L4 foi aparentemente mais precoce na cafeína a 100 do que na cafeína a 200. Contudo, deve-se lembrar que a maioria desses indivíduos foram bloqueados em seu desenvolvimento nessas fases, e portanto, é difícil avaliar o significado desses efeitos.

Atraso no tempo de desenvolvimento, causado pela cafeína, foi também observado por outros autores, em outros organismos, tais como larvas de *Telmatoscopus albipunctatus* (Diptera) (Sehgal *et al.*, 1977), ratos (Pollard *et al.*, 1987) e *Biomphalaria glabrata* (Kawano & Simões, 1987). Itoyama & Bicudo (1992) também observaram aumento no tempo de desenvolvimento de *Drosophila prosaltans*, criada em meio com cafeína.

Itoyama (1992) obteve indicações de que a cafeína aumenta a duração do processo de divisão celular. De acordo com essa autora, esta poderia ser uma das causas do aumento do tempo de desenvolvimento, observado em estudos anteriores. Vários outros trabalhos têm indicado efeitos da cafeína no processo de divisão celular. Em plantas de centeio, foram observadas a inibição da



citocinese de células germinativas, e fusões nucleares originando tetraplóides mononucleados, por ação da cafeína (La Pena *et al.*, 1981). Também foi demonstrada a ação de inibição, pela cafeína, da formação da placa celular em células vegetais (Hepler & Bonsignore, 1990).

No presente trabalho, a comparação da ação dos meios com cafeína, com os meios contendo apenas água, quanto ao desenvolvimento de *Aedes*, mostrou que, nos experimentos iniciados com ovos, enquanto na maioria dos primeiros o desenvolvimento não ultrapassou a fase de larva, nos segundos, a maioria produziu adultos (Tabelas 3 e 4). Contudo, os meios contendo água foram muito inconstantes e até certo ponto decepcionantes em seus resultados, porque diante da facilidade com que esses mosquitos procriam na natureza, esperávamos obter, nesses meios, em todos os experimentos, altas taxas de eclosão e maior número de indivíduos na fase adulta. Várias condições dos experimentos foram alteradas para encontrar uma explicação sem, contudo, obter melhores resultados. Uma alteração relevante foi quanto ao acréscimo de alimento à água. Os dados indicaram, que a ausência de alimento na água impede quase completamente o desenvolvimento dos mosquitos, do estágio de larvas até a fase adulta. Além disso, nos experimentos em que poucos adultos foram obtidos na água, sem alimento, estes mostraram retardo do desenvolvimento quando comparados com os obtidos nos experimentos nos quais o alimento foi colocado nos meios.

Já os resultados com o uso do pó de café no meio foram de certa forma surpreendentes. No primeiro experimento, a taxa de eclosão foi 33% menor e a produção de adultos foi menos da metade no meio com pó de café comparado com a água (Tabela 3). Esse era o resultado esperado. Nos demais experimentos, porém, os resultados foram variáveis, obtendo-se, às vezes, taxas de eclosão maiores no pó de café, outras vezes na água ou taxas aproximadamente iguais em ambos os meios. Quanto ao número de adultos produzidos a partir dos ovos, em geral o pó de café superou a água (Tabela 7), sugerindo que o pó de café serviu de alimento aos mosquitos.

De fato, o pó de café apresenta aminoácidos, óleos essenciais e outros componentes que devem ser responsáveis por esse resultado. Foi observado



que as larvas ingerem os grãos do pó de café, que podem ser vistos por transparência, no interior do trato digestivo das mesmas.

Dados de Tango (1971) mostram que a porcentagem de proteína bruta nos resíduos da extração do óleo e da cafeína, oscila em torno de 15% e na borra do café, após a extração do café solúvel, em torno de 12% na matéria seca. O autor considera que como fonte de proteína, o café é muito pobre, além de ser deficiente de quase metade dos aminoácidos essenciais, não se prestando adequadamente à alimentação de gado ou frangos. De acordo com Brenes (1979, pequena revisão), o subproduto da indústria do café tem, ainda, o valor nutritivo para alimentar um animal, limitado pela presença de fatores antifisiológicos, tais como, a cafeína, taninos, ácido clorogênico, ácido cafêico e um excesso de potássio.

A cafeína, no grão de café, varia em concentração entre 1,12 a 1,34%, conforme a variedade de *Coffea arabica* considerada (Tango, 1971). Conseqüentemente, a concentração de cafeína deve sofrer algum tipo de variação na borra do café, e também alguma variação em função do processamento, para preparo da bebida, como já foi mencionado.

Se a quantidade de aminoácidos presentes no pó de café é considerada insuficiente para alimentar aves ou mamíferos, poderia, porém, ser suficiente para alimentar um pequeno organismo como a larva de *Aedes*.

No experimento XIII, em que foram utilizadas três concentrações do pó de café, uma, duas ou quatro colheres de chá rasas de pó de café para meio copo de água (concentrações 0,025, 0,05 ou 0,1 g/mL, respectivamente), nas concentrações 0,05 ou 0,1 g/mL não houve produção de adultos. A explicação sugerida é de que o aumento da concentração do pó de café, aumenta também a concentração da cafeína e outros componentes indesejáveis. No primeiro experimento, mas apenas nele, paralelamente a uma menor produção de adultos, observou-se um aumento no tempo de desenvolvimento, no pó de café, utilizando-se a concentração de 0,025 g/mL. Em uma característica, porém, o pó de café mostrou efeito deletério. A comparação da longevidade (ou estimativa da longevidade) dos adultos produzidos nos meios água e pó de café, mostra que ela é maior na água, tanto para fêmeas como para machos (Tabelas 7 e 10). Uma

observação de ordem geral, realizada no presente trabalho, é a de que, independentemente do meio, a produção de machos inicia-se antes de fêmeas e a mortalidade atinge mais precocemente os machos do que as fêmeas.

A análise do padrão de esterases, por eletroforese em gel de poliacrilamida, de larvas tratadas com cafeína a 100 e a 200 $\mu\text{g/mL}$ e com o pó de café a 0,025 g/mL , mostrou alteração com relação à presença e grau de atividade de algumas bandas, quando comparadas com as do meio água. Aparentemente, sofreram efeitos, dessas substâncias, cinco bandas, três das quais são classificadas como α -esterases (bandas EST-1, EST-3 e EST-7) e duas como β -esterases (bandas EST-19 e EST-20).

O padrão de bandas esterásicas de *A. aegypti* de São José do Rio Preto foi descrito por Lima-Catelani (1996). De acordo com essa autora, a banda EST-1 foi a de maior frequência nessa população, estando presente em todas as fases do desenvolvimento e ocorrendo em 100% dos indivíduos analisados, em ambos os sexos. A banda EST-3 mostrou-se restrita à fase de larva (86% de frequência) e a EST-7 foi observada nas três fases do desenvolvimento, com maior frequência na fase de larva (64%). A banda EST-19 também foi exclusiva da fase de larva, ocorrendo em baixa frequência (menos de 1%), enquanto a banda EST-20 foi observada nas fases de larva e pupa, porém, em maior frequência na fase de larva (82%) do que de pupa.

Como já foi mencionado, as esterases são enzimas muito importantes, envolvidas em várias funções básicas dos organismos. Lapenta *et al.* (1995) também mencionaram que, nos insetos há evidências de que as esterases atuam na regulação do hormônio juvenil, na reprodução, no processo digestivo e na degradação de inseticidas.

A literatura mostra que a atividade esterásica, em insetos, é maior na fase de larva. Por exemplo, Khoo *et al.* (1992) verificaram essa predominância na fase L4 de duas espécies de *Aedes*, *A. aegypti* e *A. albopictus*. De fato, na fase larval ocorrem fenômenos importantes da diferenciação, tais como a formação de asas, das patas e do aparelho bucal (Jones, 1978). Na fase larval a alimentação é muito ativa para fazer face à atividade metabólica intensa, exigida pelos processos de desenvolvimento e diferenciação. Segundo Barnes

(1990), o desenvolvimento holometábolo é de grande significado adaptativo na evolução dos táxons superiores, porque as larvas podem utilizar fontes alimentares, habitats e estilos de vida diferentes dos indivíduos adultos. De acordo com Vanderley *et al.* (1987), a alimentação das larvas de *Aedes*, no ambiente natural, é muito variada, pois vivem na água, são onívoras, utilizando-se, principalmente, de detritos orgânicos, bactérias, leveduras vivas e pólen, através da filtração da água. Esses aspectos, em conjunto, parecem justificar o alto nível de esterases presentes nessa fase do desenvolvimento.

De modo geral, consideram-se as bandas esterásicas com alta frequência como estando relacionadas a funções vitais básicas. Em *A. aegypti* a banda EST-1 é uma delas, e seu bloqueio pela cafeína a 200 µg/mL pode ser um evento importante na mortalidade que ocorre no desenvolvimento. Essa é também a banda de maior espessura e intensidade de coloração, o que significa que ela é produzida em altos níveis. Lima-Catelani (1996) admitiu a existência de paralelismo de comportamento entre essa banda e o das esterases, anteriormente descritas em *A. aegypti*, denominadas pelos autores, EST-6 (Trebatoski & Craig, 1969) e EST- α (Townson, 1972) que foram consideradas idênticas pelo segundo autor. A banda EST-6 tem sido relacionada com a resistência a organofosforados nessa espécie (Field & Hitchen, 1981; Field *et al.*, 1984; Dinardo-Miranda, 1994).

A classificação das esterases com base na ação de inibidores, realizada por Lima-Catelani (1996), seguiu Oakeshott *et al.* (1993). De acordo com esses autores, as carboxilesterases são inibidas por organofosfatos e as colinesterases, por organofosfatos e sulfato de eserina. Os dados de Lima-Catelani (1996) mostraram que as bandas EST-1, EST-7 e EST-20 podem ser consideradas incluídas na família das carboxilesterases. Entre as carboxilesterases ocorrem enzimas envolvidas com resistência a inseticidas. As carboxilesterases constituem uma família de enzimas amplamente distribuídas, que hidrolizam éster carboxil, amida e ligações tioéster em uma variedade de compostos. O aumento da atividade de carboxilesterases é o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados em muitas espécies de insetos. No mosquito *Culex quinquefasciatus* e no afídio *Myzus persicae*, esse aumento de atividade é decorrente da amplificação de pelo menos um gene para esterase, atingindo mais

de 250 cópias por genoma, no primeiro organismo (Vaughan & Hemingway, 1995). Em *C. quinquefasciatus* verificou-se que o padrão mais comum de resistência é dado pela elevação conjunta dos níveis de EST- α 2 e EST- β 2. Os genes dessas esterases encontram-se em desequilíbrio de ligação nas populações de mosquitos. Os dados obtidos por vários autores mostraram alta homologia das regiões codificadoras de EST- α 2 e EST- β 2 e sugeriram que os dois genes surgiram por um evento de duplicação (pequena revisão em Vaughan *et al.*, 1997).

A banda EST-3 parece ser uma acetilcolinesterase. Acetilcolinesterases são enzimas importantes, pois terminalizam o impulso nervoso, catalisando a hidrólise da acetilcolina, que é um neurotransmissor. É uma enzima chave no sistema nervoso dos insetos, nos quais o sistema colinérgico é essencial (Pralavorio & Fournier, 1992 *apud* Lima-Catelani, 1996).

A banda EST-19 não foi testada por Lima-Catelani (1996) devido à baixa frequência nos géis, mas possivelmente se enquadra na mesma classificação de EST-18 e EST-20 (carboxilesterases), dada sua localização muito próxima e ao fato de ser também uma β -esterase, como essas enzimas.

Com relação à banda EST-1, os dados mostraram redução da frequência de sua presença em todos os meios, comparados com os dados de Lima-Catelani (1996), de presença da mesma em 100% dos mosquitos analisados, em todas as fases do desenvolvimento e com alto grau de atividade (bandas espessas e fortemente coradas). Os dados do presente trabalho mostraram ainda que a cafeína a 200 apresentou a maior frequência de indivíduos sem atividade dessa enzima e a cafeína a 100, a maior frequência de indivíduos com o grau mínimo de atividade da mesma. Os dados são, assim, indicativos de que a cafeína a 100 e a 200 atuou bloqueando a síntese dessa enzima, reduzindo-a a uma quantidade pequena ou mesmo anulando-a.

Já o pó de café, embora não tenha diferido de forma significativa, dos demais meios, quando se compara presença ou ausência da banda, diferiu de forma significativa pelo predomínio de indivíduos com maior atividade. O pó de café atuou, portanto, diferentemente da cafeína, permitindo que altos níveis de síntese (classes +++ e ++) ocorressem em mais de 50% das larvas analisadas.



Também com relação às bandas EST-3 e EST-7, a ação das duas substâncias foi oposta, agora de forma diferente. Para essas bandas, não foi possível testar os dados estatisticamente quanto à presença ou ausência, mas foi possível testá-los quanto ao grau de atividade. Nessa comparação, tanto para a banda EST-3, quanto para a banda EST-7, apenas o pó de café diferiu significativamente no sentido de aumentar a frequência de indivíduos com nível baixo de produção das enzimas.

Quanto à banda EST-20, o teste para presença ou ausência da banda mostrou que o efeito mais forte foi exercido pela cafeína a 100, no sentido de reduzir sua presença, enquanto a cafeína a 200 não diferiu da água. O pó de café foi o meio que apresentou a menor frequência de indivíduos com ausência da banda. Portanto, também quanto a esta banda, o efeito de ambos os meios foi oposto.

Com relação à banda EST-19, o efeito de presença ou ausência foi semelhante ao da banda EST-20. Apesar de não ter sido aplicado o teste comparativo, à vista dos números observa-se maior frequência de indivíduos com ausência da banda nos meios com cafeína, especialmente, cafeína a 100. No que se refere ao grau de atividade, não houve diferença significativa entre os meios. A atividade esterásica foi baixa em todos.

É interessante observar que Lima-Catelani (1996) encontrou a banda EST-19 nas amostras de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, com frequência extremamente baixa (0,62%) e no presente trabalho essas frequências variaram de 8 a 17%, nos diferentes meios. Essas frequências se aproximam daquelas encontradas, para a população dessa mesma espécie, procedente de Marília – SP (Lima-Catelani, 1996). O oposto ocorreu com relação à banda EST-20 que Lima-Catelani observou com frequência de 83% e que no presente trabalho foi no máximo de 32%.

Assim, a cafeína atuou no presente estudo, como redutora dos níveis de atividade das bandas esterásicas EST-1, EST-19 e EST-20, pertencentes a grupos de esterases que desempenham papéis fisiológicos importantes. Sua alteração, portanto, pode estar envolvida nos problemas causados pela cafeína, nos parâmetros biológicos analisados. A confirmação dessa influência depende de



estudos complementares, mas os indícios são de que a cafeína pode atuar como moduladora da produção enzimática.

O pó de café atuou reduzindo o grau de atividade das bandas EST-3 e EST-7. Pelo fato de estar apresentando efeito diferente da cafeína, o pó de café a 0,025 g/mL pode não estar atuando pelo seu conteúdo dessa substância, mas, pela presença de outros compostos considerados tóxicos, a que já foi feita referência anteriormente.

É interessante ainda observar que as enzimas que sofrem alterações nos tratamentos do presente trabalho são carboxilesterases e acetilcolinesterases, as enzimas envolvidas, basicamente, nos mecanismos de resistência a inseticidas. Isto é indicativo de que essas enzimas estão mais amplamente envolvidas na resposta ao estresse por xenobióticos, podendo apresentar mudanças drásticas de nível sintético na presença dos mesmos. Este é o caso da cafeína.

É interessante lembrar também que o metabolismo da cafeína, no homem, ocorre predominantemente por desmetilação hepática envolvendo o citocromo P₁₋₄₅₀ e que este também está envolvido em resistência a inseticidas (Stegeman & Livingstone, 1998 *apud* Scott, 1999).

Ambas as observações parecem associar os mecanismos de resistência a inseticidas e a resposta à ação da cafeína. A confirmação depende de uma continuidade dos estudos, nesse sentido.



VI. CONCLUSÕES



Os resultados do presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1- A cafeína exerce um efeito dose-dependente sobre o desenvolvimento de *Aedes aegypti*, de modo que quanto maior a concentração de cafeína, mais precoce o bloqueio do desenvolvimento. Nos experimentos iniciados com ovos, o desenvolvimento foi bloqueado na fase L1, no meio com cafeína a 2000 $\mu\text{g/mL}$, em L2 no meio contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$, predominantemente nas fases L3 e L4, respectivamente, nos experimentos em que foram usadas as concentrações de 500 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Nos experimentos iniciados com larvas L3 e concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de cafeína, foram obtidos adultos em número maior na primeira concentração.

2- A presença de cafeína no meio não parece afetar a taxa de eclosão dos ovos, mas parece afetar o tempo de desenvolvimento de *A. aegypti*. Nos dois experimentos em que foram obtidas larvas L4 nas concentrações de 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$, o tempo de desenvolvimento foi maior na concentração mais elevada.

3- A taxa de mortalidade dos mosquitos nas diferentes fases do desenvolvimento nem sempre acompanhou a concentração de cafeína. Em um dos experimentos iniciados com larvas L3, as fases de L4 e pupas apresentaram mortalidade mais precoce no meio com cafeína a 200 $\mu\text{g/mL}$ do que no meio com 100 $\mu\text{g/mL}$. Em outro, a mortalidade de L4 foi aparentemente mais precoce na cafeína a 100 do que na cafeína a 200. Porém, como existe bloqueio do desenvolvimento nas fases mencionadas, é difícil avaliar o significado desses efeitos.

4- A maioria dos experimentos iniciados com ovos produziu adultos no meio contendo água e, nos meios contendo cafeína, o desenvolvimento não ultrapassou a fase de larva, na maioria dos casos. Entretanto, a produtividade



de adultos na água esteve abaixo das expectativas diante da facilidade com que esses mosquitos procriam na natureza. Muitas tentativas de melhoria da técnica foram feitas, sendo que a única realmente relevante foi o acréscimo de alimento à água.

5- Com a devida cautela pelo número reduzido de adultos obtidos nos experimentos iniciados com larvas L3, observou-se que a cafeína afetou a longevidade das fêmeas adultas, reduzindo-a, aparentemente de modo dose-dependente. Para os machos, embora haja redução da longevidade na cafeína, em relação à água, esse parâmetro parece maior na cafeína a 200.

6- O pó de café usado, colocado no meio de criação, na concentração de 0,025 g/mL, em geral, produziu mais adultos do que na própria água, sugerindo que o pó de café serviu de alimento aos mosquitos. O pó de café, de acordo com dados da literatura, apresenta aminoácidos, óleos essenciais e outros componentes que devem ser responsáveis por esse resultado. Um único experimento em que, além da concentração de 0,025 g/mL, foram utilizadas as concentrações 0,05 e 0,1 g/mL de pó de café, não houve produção de adultos em ambas as concentrações. Na concentração 0,05 g/mL o desenvolvimento foi bloqueado em L2.

7- A cafeína altera o padrão de bandas esterásicas dos indivíduos submetidos aos tratamentos, analisados em gel de poliacrilamida. Cinco bandas, sendo quatro carboxilesterases (EST-1, EST-7, EST-19 e EST-20) e uma acetilcolinesterase (EST-3) mostraram variação em larvas L4.

8- Há indicações de que a cafeína pode atuar como moduladora da produção enzimática e de que os efeitos do pó de café a 0,025 g/mL são devidos, não ao seu conteúdo de cafeína, mas aos demais componentes nele presentes. Nos meios com cafeína a 100 e a 200 µg/mL houve aumento de indivíduos com baixos níveis de atividade enzimática ou mesmo ausência de EST-1 e EST-20. Em ambos os casos o pó de café foi o meio que apresentou maior



freqüência de indivíduos com presença da banda e com altos níveis de síntese. Com relação às bandas EST-3 e EST-7, o resultado foi oposto ao das duas bandas mencionadas anteriormente. Para estas bandas apenas o pó de café aumentou a freqüência de indivíduos com nível baixo de produção das enzimas. Quanto à banda EST-19, a cafeína também mostrou o efeito mais forte no sentido de reduzir a freqüência da banda, enquanto no meio com pó de café ocorreu o contrário. Portanto, com relação às cinco bandas, a cafeína e o pó de café tiveram efeitos opostos.

9- A alteração, pela cafeína, em *A. aegypti*, da atividade de bandas correspondentes a carboxilesterases e acetilcolinesterases, que normalmente desempenham papéis fisiológicos importantes nos insetos, pode ser uma das causas dos problemas ocasionados por essa substância, nos parâmetros biológicos analisados.

10- Os presentes dados mostraram que a cafeína atua sobre enzimas envolvidas, basicamente, nos mecanismos de resistência a inseticidas. Além disso, sabe-se que, no homem, a cafeína é metabolizada predominantemente por desmetilação hepática envolvendo o citocromo P₁₋₄₅₀ e que nos insetos este está envolvido na resistência a inseticidas. Ambas as observações associam os mecanismos de resistência a inseticidas e a resposta à ação da cafeína.

11- Uma conclusão central no presente trabalho é a indicação de que a cafeína em concentração igual ou superior a 500 µg/mL pode ser um auxiliar no controle do *Aedes*. Da mesma forma, concentrações de pó de café usado, iguais ou superiores a 0,1 g/mL (quatro colheres de chá rasas de pó de café para meio copo de água), podem ser efetivas como auxiliar no controle, podendo ser usadas no lugar do abate. Para o pó de café o experimento será repetido. A possibilidade de utilizar cafeína e pó de café usado como auxiliares de controle, pelo bloqueio do desenvolvimento em fases precoces, teria como vantagem principal a redução do uso de inseticidas organofosforados e piretróides, sendo



que, no que se refere ao pó de café, acrescenta-se a disponibilidade e a facilidade de uso, pela população.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H. Y.; KARAKI, H.; URAKAWA, N. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 93, p. 267-274, 1988.

ALVES, M. C. G. P.; GURGEL, S. M.; ALMEIDA, M. C. R. R. Plano amostral para cálculo de densidade larvária de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 251-256, 1991.

ANDRADE, C. F. S.; MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var israelensis in integrated control. **Rev. Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 184-187, 1991.

ANDREW, L. E. The mutagenic activity of caffeine in *Drosophila*. **Am. Nat.**, v. 93, p. 135-138, 1959.

ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem.**, v. 25, p. 621-630, 1995.

AUGUSTO, L. G. S.; TORRES, J. P. M.; COSTA, A. M.; PONTES, C.; NOVAES, T. C. P. Programa de erradicação do *Aedes aegypti*: inócuo e perigoso (e ainda perdulário). **Cad. Saúde Pública**, 3 p., 2000.

BARD, M.; NEUHAUSER, J. L.; LEES, N. D. Caffeine resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 141, p. 999-1002, 1980.

BARNES, R. D. Os insetos. In: _____. **Zoologia dos invertebrados**. 4. ed., São Paulo: Roca, 1990. cap. 16, p. 897-930.

BICHARA, H. T.; MENDES, A. Rio Preto tem 1ª morte por febre amarela. **Diário da Região**, São José do Rio Preto, 25 mar. 2000. Cidades, p. 1B.

BLAUSTEIN, M. P.; SCHNEIDERMAN, H. A. A brief survey of the effects of potential antimetabolites and enzymes on the development of giant silkworms. **F. Ins. Physiol.**, v. 5, p. 143-159, 1960.



BOULENGER, J. P.; MARANGOS, P. J. Caffeine withdrawal affects central adenosine receptors but not benzodiazepine receptors. **J. Neural Transm.**, v. 78, p. 9-15, 1989.

BOYES, B. G.; KOVAL, J. J. Clastogenic interactions of γ radiation and caffeine in human peripheral blood cultures. **Mutat. Res.**, v. 108, p. 239-249, 1983.

BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. **Resumo dos principais caracteres morfológicos diferenciais do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus***. Brasília, 1989. 21p.

BRENES, R. A. G. Processing of coffee pulp: chemical treatments. In: _____. **Coffee pulp – Composition, technology, and utilization**. Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1979. p. 72-81.

BURG, A. W.; WERNER, E. Tissue distribution of caffeine and its metabolites in mouse. **Biochem. Pharmacol.**, v. 21, p. 923-936, 1972.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 3. ed., São Paulo: Atual Editora, 1985. 321p.

CANDEIAS, J. A. N. Febres hemorrágicas. In: _____. **Microbiologia**. 2. ed., São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1991. cap. 70, p. 383-386.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in anaembroidering hoop. **Rev. Bras. Genet.**, v. 15, n.1, p. 201-203, 1992.

CHINNICI, J. P.; BETTINGER, D. A. Effects of aflatoxin B₁ and caffeine on viability in natural strains of *Drosophila melanogaster*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 44, p. 263-266, 1984.

CHUNG, W.G.; CHA, Y. N. Oxidation of caffeine to theobromine and theophylline is catalyzed primarily by flavin-containing monooxygenase in liver microsomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 685-688, 1997.



CLARK, G. G. Situación epidemiológica del dengue en América. Desafios para su vigilancia y control. **Salud Publica Mex.**, v. 37, supl. 5-11, 1995.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction.** London: Chapman & Hall, 1992. v. 1, 509p.

CONLISK, A. J.; GALUSKA, D. A. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? **Prev. Med.**, v. 31, p. 562-568, 2000.

DAVID, J. A.; PITMAN, R. M. Cyclic-AMP regulation of calcium-dependent K channels in an insect central neurone. **Neurosci. Lett.**, v. 203, p. 151-154, 1996.

DEBERNARD, S.; COUILLAUD, F. Juvenile hormone degradation in the female locust *Locusta migratoria*: evidence for new catabolites. **J. Insect Physiol.**, v. 40, p. 975-982, 1994.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Variabilidade proteica em populações naturais de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).** Ribeirão Preto, 1994. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

DORRBECKER, S. H.; KRAMER, P. A.; DORRBECKER, B. R.; RAYE, J. R. Caffeine disposition in the pregnant rabbit. II. Fetal distribution of caffeine and paraxanthine during chronic maternal caffeine administration. **Develop. Pharmacol. Therap.**, v. 11, p. 118-124, 1988.

DULOUT, F. N.; LARRAMENDY, M. L.; OLIVERO, O. A. Effect of caffeine on the frequency of chromosome aberrations induced *in vivo* by triethylenemelamine (TEM) and adriamycin (ADR) in mice. **Mutat. Res.**, v. 82, p. 295-304, 1981.

FIELD, W. M.; HITCHEN, J. M. Linkage relationships between an esterase locus and group II markers in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 18, p. 61-64, 1981.

FIELD, W. M.; HITCHEN, J. M.; REES, A. T. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the



organophosphate insecticide Malathion. **J. Med. Entomol.**, v. 21, p. 412-418, 1984.

FLEISS, J. L. **Statistical methods for rates and proportions**. 2. ed., New York: John Wiley & Sons, 1981. 321p.

FRIES, N. The production of mutations by caffeine. **Hereditas**, v. 36, p. 134-149, 1950.

FRYER, M. W.; NEERING, I. R. Actions of caffeine on fast- and slow- twitch muscles of the rat. **J. Physiol**, v. 416, p. 435-454, 1989.

GLAJCHEN, N.; ISMAIL, F.; EPSTEIN, S.; JOWELL, P. S.; FALLON, M. The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. **Calcif. Tissue Int.**, v. 43, p. 277-280, 1988.

GOLE, D.; MUNDAY, L.; KREIMAN, M.; RAM, J. L. Caffeine effects on buccal muscles of *Aplysia*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 88C, n. 2, p. 313-318, 1987.

GRANT, D. M.; CAMPBELL, M. E.; IANG, B. K.; KALOW, W. Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, n. 8, p. 1251-1260, 1987.

GRIFFITHS, R. R.; WOODSON, P. P. Reinforcing properties of caffeine: studies in humans and laboratory animals. **Biochem. Behav.**, v. 29, p. 419-427, 1988.

HANSSON, K.; PALITTI, F.; KIHLMAN, B. A.; KARLSSON, M. B. Potentiation of X-ray and streptonigrin-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes by post-treatments with hydroxyurea and caffeine. **Hereditas**, v. 97, p. 51-58, 1982.

HARSHMAN, L. G.; WARD, V. K.; BEETHAM, J. K.; GRANT, D. F.; GRAHAN, L. J.; ZRAKET, C. A.; HEICKE, D. G.; HAMMOCK, B. D. Cloning, characterization, and genetics of the juvenile hormone esterase gene from *Heliothis virescens*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, p. 671-676, 1994.



- HEPLER, P. K.; BONSIGNORE, C. L. Caffeine inhibition of cytokinesis: ultrastructure of cell plate formation/degradation. **Protoplasma**, v. 157, p. 182-192, 1990.
- HIGASHI-KUBO, R.; HOLLAND, J. M.; ROTI, J. L. R. Comparative effects of caffeine on radiation- and heat- induced alterations in cell cycle progression. **Radiation Res.**, v. 119, p. 246-260, 1989.
- ITOYAMA, M. M. **Efeito da cafeína sobre aspectos reprodutivos e do desenvolvimento em *Drosophila prosaltans***. São José do Rio Preto, 1989. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- ITOYAMA, M. M. **Efeito da cafeína sobre aspectos reprodutivos e, em associação com o íon estanoso, sobre a produtividade em *Drosophila prosaltans***. São José do Rio Preto, 1992. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity, development time and longevity in *Drosophila prosaltans*. **Rev. Bras. Genet.**, v. 15, p. 303-321, 1992.
- ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, A. J. Effects of caffeine on mating frequency and pre-copulation and copulation durations in *Drosophila prosaltans*. **Cytobios**, v. 83, p. 245-248, 1995.
- ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, A. J. The development of resistance to caffeine in *Drosophila prosaltans*: productivity and longevity after ten generations of treatment. **Cytobios**, v. 96, p. 81-93, 1998.
- ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of stannous chloride combined with caffeine on fecundity of *Drosophila prosaltans*. **Genet. Mol. Biol.**, v.23, n. 1, p. 105-107, 2000.
- JANUS, K.; ANTOSZEK, J. The effect of sex and age on caffeine pharmacokinetics in cattle. **Res. Vet. Sci.**, v. 69, p. 33-37, 2000.



JONES, J. C. The feeding behavior of mosquitoes. **Sci. Am.**, v. 238, n. 6, p. 112-120, 1978.

JORDÁ, A.; PORTOLÉS, M.; GUASCH, R.; BERNAL, D.; SAEZ, G. T. Effect of caffeine on urea biosynthesis and some related processes, ketone bodies, ATP and liver amino acids. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, n. 16, p. 2727-2732, 1989.

KAO L. R.; MOTOYAMA, M.; DAUTERMAN, W. C. Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance. **Pesticide Biochem. Physiol.**, v. 22, p. 86-92, 1985a.

KAPIN, M.; AHMAD, S. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): optimum assay conditions, quantification and characterization. **Insect Biochem.**, v.10, p. 331-337, 1980.

KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae). **Dev. Biol.**, v. 90, n. 3, p. 281-301, 1987.

KAWANO, T.; CHAVES, W. R. ; SIMÕES, L. C. G. Effects of caffeine on embryonic development of *Biomphalaria glabrata*. **Ci. Cult.**, v. 31, n. 11, p. 1266-1273, 1979.

KHOO, H. G. N.; WONG, K. P.; SIT, K. H.; HO, B. C. A fluorimetric assay of general esterase activity in individual larva, pupa and adult mosquito. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 227-235, 1992.

KITTS, D. D.; MATHIESON, R. Effects of caffeine on ovine maternal glucose-insulin response and fetal metabolite levels. **Nutr. Rep. Int.**, v. 40, n. 4, p. 673-684, 1989.

KOCZAPSKI, A.; PAREDES, J.; KOGAN, C.; LEDWIDGE, B.; HIGENBOTTAM, J. Effects of caffeine on behavior of schizophrenic inpatients. **Schizophrenia Bull.**, v. 15, n. 2, p. 339-344, 1989.

KOLLER, W.; CONE, S.; HERBSTER, G. Caffeine and tremor. **Neurology**, v. 37, p. 169-172, 1987.



KUHLMANN, W.; FROMME, H. G.; HEEGE, E. M.; OSTERTAG, W. The mutagenic action of caffeine in higher organisms. **Cancer Res.**, v. 28, p. 2375-2389, 1968.

LA PENA, A.; PUERTAS, M. J.; MERINO, F. Bimeiosis induced by caffeine. **Chromosoma**, v. 83, n. 2, p. 241-248, 1981.

LAPENTA, A. S.; BICUDO, H. E. M. C.; CERON, C. R.; CORDEIRO, J. A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, v. 84, p. 13-29, 1995.

LIFE cycle of a mosquito. Disponível em: <<http://www-rci.rutgers.edu/~insects/lcycle.htm>>. Acesso em: 04 dez. 2000.

LIMA-CATELANI, A. R. A.; BICUDO, H. E. M. C. Chromosome studies in two Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Cytobios**, v. 79, p. 241-251, 1994.

LIMA-CATELANI, A. R. A. **Padrão de esterases de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***. São José do Rio Preto, 1996. 126f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

LOGAN, L.; CARNEY, J. M.; HOLLOWAY, F. A.; SEALE, T. W. Effects of caffeine, cocaine and their combination on fixed-interval behavior in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 33, p. 99-104, 1989.

MACNAUGHTON, K. W.; SATHASIVAM, P.; VALLERAND, A. L.; GRAHAM, T. E. Influence of caffeine on metabolic responses of men at rest in 28 and 5°C. **J. Appl. Physiol.**, v. 68, n. 5, p. 1889-1895, 1990.

MANTE, S.; MINNEMAN, K. P. Caffeine inhibits forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 175, p. 203-205, 1990.

MCDANIEL, C. N.; BERRY, S. J. Effects of caffeine and aminophylline on adult development of the *Cecropia silkmoth*. **F. Insect Physiol.**, v. 20, p. 245-252, 1974.

MCDONALD, P. T.; RAI, K. S. Correlation of linkage groups with chromosomes in the mosquito, *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 66, n. 3, p. 475-485, 1970.

MENDELSON, D. The effect of caffeine on repair systems in oocytes of *Drosophila melanogaster*. I. **Mutat. Res.**, v. 22, p. 145-156, 1974.

MORTON, R. A. Evolution of *Drosophila* insecticide resistance. **Genome**, v. 36, p. 1-7, 1993.

NATHANSON, A. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. **Science**, v. 226, n. 4671, p. 184-187, 1984.

NETO, F. C. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 4, p. 279-285, 1997.

OAKESHOTT, J. G.; van PAPENRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSELL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, v. 90, p. 239-268, 1993.

OSTERTAG, W.; DUISBERG, E.; STÜRMANN, M. The mutagenic activity of caffeine in man. **Mutat. Res.**, v. 2, p. 293-296, 1965.

OSTERTAG, W.; HAAKE, J. The mutagenicity in *Drosophila melanogaster* of caffeine and of other compounds which produce chromosome breakage in human cells in culture. **Z. Vererbungsl.**, v. 98, p. 299-308, 1966.

PALADE, P.; DETTBARN, C.; ALDERSON, B.; VOLPE, P. Pharmacologic differentiation between inositol-1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} - or caffeine- induced Ca^{2+} release from intracellular membrane systems. **Molec. Pharmacol.**, v. 36, p. 673-680, 1989.

PANICKER, K. N.; BAI, M. G.; KALYANASUNDARAM, M. Well breeding behaviour of *Aedes aegypti*. **Indian J. Med. Res.**, v. 76, p. 689-691, 1982.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. Família Culicidae – Culicíneos de importância médica. In: _____. **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap. 69, p. 757-768.



POLLARD, I.; JABBOUR, H.; MEHRABANI, P. A. Effects of caffeine administered during pregnancy on fetal development and subsequent function in the adult rat: prolonged effects on a second generation. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 22, p. 1-15, 1987.

PONS, L.; TRENQUE, T.; BIELECKI, M.; MOULIN, M.; POTIER, J. C. Attentional effects of caffeine in man: comparison with drugs acting upon performance. **Psychiatry Res.**, v. 23, p. 329-333, 1988.

RAI, K. S.; HARTBERG, W. K. *Aedes*. In: _____. **Invertebrates of genetic interest**. v. 3. New York and London: King. Plenum Press, 1975. 874p.

REYES-VILLANUEVA, F. El dengue – Binomía del vector, transmisión y opciones para su control em México. **Ciencia**, v. 41, p. 45-55, 1990.

SANDLIE, I.; KLEPPE, K. Effect of caffeine on nucleotide pools in *Escherichia coli*. **Chem. – Biol. Interactions**, v. 40, p. 141-148, 1982.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus infections: scientific contributions of Japan and Brazil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISADORES NIKKEIS, 2, 1994, p. 1-14.

SCOTT, J. A. Cytochromes P₄₅₀ and insecticide resistance. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 29, p. 757-777, 1999.

SCOTT, N. R.; STAMBUK, D.; CHAKRABORTY, J.; MARKS, V.; MORGAN, M. Caffeine clearance and biotransformation in patients with chronic liver disease. **Clin. Sci.**, v. 74, p. 377-384, 1988.

SEHGAL, S. S.; SIMÕES, L. C. G. Preliminary results on the effects of neurotropic drugs on *Drosophila melanogaster*. **Ci. Cult.**, v. 28, n. 8, p. 917-920, 1976.

SEHGAL, S. S.; SIMÕES, L. C. G.; JURAND, A. Effects of caffeine on growth and metamorphosis of moth fly *Telmatoscopus albipunctatus* (Diptera, Psychodidae). **Ent. Exp. Appl.**, v. 21, p. 174-181, 1977.



SERGEEV, P.; YENIKOLOPOV, G. N.; PEUNOVA, N. I.; KUZIN, B. A.; KHECHUMIAN, R. B.; KOROCHKIN, L. I.; GEORGIEV, G. P. Regulation of tissue-specific expression of the esterase S gene in *D. virilis*. **Nucl. Acid. Res.**, v. 21, p. 3545-3551.

SHAMAAN, N. A.; HAMIDAH, R.; JEFFRIES, J.; HASHIM, A. J.; WANGAH, W. Z. Insecticide toxicity, glutathione transferases and carboxylesterase activities in the larva of the *Aedes* mosquito. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 104, n. 1, p. 107-110, 1993.

SHAW, P. J.; CIRELLI, C.; GREENSPAN, R. J.; TONONI, G. Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 1834-1837, 2000.

SIVAK, A.; RUDENKO, L.; TEAGUE, L. G. Variations among species and cell types in the effects of caffeine on mutagen-induced cytotoxicity and postreplication repair of DNA. **Environ. Mutagen.**, v. 4, p. 143-162, 1982.

SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Soc. Sci. Med.**, v. 23, n. 3, p. 249-257, 1986.

SMITH, G. A. Caffeine reduction as an adjunct to anxiety management. **Br. J. Clin. Psychol.**, v. 27, p. 265-266, 1988.

STRICKMAN, D.; KITTAYAPONG, P. Laboratory demonstration of oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in covered water jars. **J. Med. Entomol.**, v. 30, n. 5, p. 947-949, 1993.

SUBRA, R. The regulation of preimaginal populations of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) on the Kenya coast. I. Preimaginal population dynamics and the role of human behaviour. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 77, n. 2, p. 195-201, 1983.

TANGO, J. S. Utilização industrial do café e dos seus subprodutos. **B. Inst. Tecnol. Alim. - ITAL**, n. 28, dez., 1971.



TAVANI, A.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Coffee intake and risk of hip fracture in women in northern Italy. **Prev. Med.**, v.24, p. 396-400, 1995.

TERAOKA, H.; NAKAZATO, Y.; OHGA, A. Sodium ions inhibit the stimulant action of caffeine on catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells of the guinea pig. **Neurosci. Lett.**, v. 108, p. 179-182, 1990.

TIMSON, J. Caffeine. **Mutat. Res.**, v. 47, p. 1-52, 1977.

TOWNSON, H. Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: the genetics and Km values of electrophoretically heterogeneous forms. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 66, p. 255-266, 1972.

TREBATOSKI, A. M.; CRAIG, G. B. Genetics of an esterase in *Aedes aegypti*. **Biochem. Genet.**, v. 3, p. 383-392, 1969.

TSUCHIYA, H.; YASUTAKE, H.; YOKOGAWA, A.; BABA, H.; UEDA, Y.; TOMITA, K. Effect of chemotherapy combined with caffeine for osteosarcoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 118, p. 567-569, 1992.

VANDERLEY, D. M. V.; GUTIERREZ, E. B.; ANDRADE, J. C. R.; SOUZA, L. T. M.; TENORIO, R. M. P.; MELAMED, E.; KATZ, G.; CORTÁS, M. C.; SILVA, M. V.; MOURA, L. C. **Manual de vigilância epidemiológica: dengue**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 1987. 23p.

VARAGNOLO, M.; PLEBANI, M.; MUSSAP, M.; NEMETZ, L.; PALEARI, C. D.; BURLINA, A. Caffeine as indicator of metabolic functions of microsomal liver enzymes. **Clin. Chim. Acta**, v. 183, p. 91-94, 1989.

VAUGHAN, A.; RODRIGUES, M.; HEMINGWAY, J. The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterases from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochem. J.**, v. 305, p. 651-658, 1995.

VAUGHAN, A.; ROCHELEAU, T.; FFRENCH-CONSTANT, R. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. **Exp. Parasitol.**, v. 87, p. 237-244, 1997.



VERLENGIA, F.; RIGITANO, A.; NERY, J. P.; TOSELLO, A. Variações no conteúdo de cafeína nas bebidas de café. **Col. Inst. Tecnol. Alim.**, v. 1, p. 241-257, 1965.

WAJDA, I. J.; BANAY-SCHWARTZ, M.; LAJTHA, A. The effect of caffeine on some mouse brain free amino acid levels. **Neurochem. Res.**, v. 14, n. 4, p. 317-320, 1989.

WARREN, R. N. Metabolism of xanthine alkaloids in man. **J. Chromatog.**, v. 40, p. 468-469, 1969.

ZHANG, Y.; WELLS, J. N. The effects of chronic caffeine administration on peripheral adenosine receptors. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 254, p. 270-276, 1990.



VIII. RESUMO

O efeito da cafeína foi analisado nas concentrações de 100, 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, sobre o desenvolvimento, a taxa de mortalidade e a longevidade de *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram um efeito dose-dependente, dessa substância, no bloqueio do desenvolvimento dos mosquitos, de modo que quanto maior a concentração de cafeína, mais precoce foi o mesmo. A redução da longevidade das fêmeas adultas também acompanhou a concentração de cafeína no meio, mas não a mortalidade de larvas e pupas. Foi também analisado o efeito, nos mesmos parâmetros, do pó de café usado, sendo que a 0,025 g/mL foram produzidos adultos mais numerosos do que na água. O pó de café apresenta na sua composição, aminoácidos, óleos essenciais e outros, de modo que os dados sugeriram que ele serviu como alimento para os mosquitos. Entretanto, a 0,05 e 0,1 g/mL, o desenvolvimento foi bloqueado no início da fase de larva. Foi, ainda, analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, o efeito da cafeína (a 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e do pó de café usado (a 0,025 g/mL) no padrão de esterases de larvas L4. Foi observado que a cafeína e o pó de café alteram o padrão de cinco bandas, quatro carboxilesterases (EST-1, EST-7, EST-19 e EST-20) e uma acetilcolinesterase (EST-3). A cafeína e o pó de café diferiram nos seus efeitos sobre essas bandas. A cafeína causou um aumento do número de indivíduos com baixos níveis de atividade enzimática ou ausência das enzimas EST-1 e EST-20; o oposto ocorreu com o pó de café. Este por sua vez, aumentou a frequência de indivíduos com nível baixo de produção de EST-3 e EST-7. A cafeína mostrou o efeito mais forte no sentido de reduzir a frequência de EST-19; no meio com pó de café ocorreu o contrário. Nos insetos, as carboxilesterases e acetilcolinesterases, enzimas sobre as quais a cafeína atua em *A. aegypti*, estão, basicamente, envolvidas com a resistência a inseticidas, o que indica seu efeito também no metabolismo de xenobióticos. Os dados sugerem, ainda, que a cafeína pode atuar como moduladora da produção enzimática e que os efeitos do pó de café a 0,025 g/mL são devidos, não ao seu conteúdo de cafeína, mas a outros componentes. Sugerem, ainda, que a cafeína (a 500 $\mu\text{g/mL}$ ou mais) e o pó de café usado (a 0,1 g/mL ou mais) podem ser auxiliares no controle de *Aedes*.

Palavras-chaves: cafeína; *Aedes aegypti*; desenvolvimento; mortalidade; longevidade; esterases.



IX. ABSTRACT



The effect of caffeine on *Aedes aegypti* development, mortality rate and longevity, using five concentrations (100, 200, 500, 1000 and 2000 $\mu\text{g/mL}$), was analyzed. The results showed a dose dependent effect of this substance on blockade of the mosquito development, in a way that the greater the caffeine concentration the earlier the blockade of development. The adult female longevity decrease also seems to follow the caffeine dosage, but not the mortality rate. The effect of the ground coffee (at 0.025 g/mL) on the same parameters was also analyzed. The medium containing it produced greater number of adults than the water medium. Because the ground coffee presents in its composition amino acids, essential oils and other components, those data suggested that this substance fed the mosquitoes. However, at 0.05 and 0.1 g/mL concentrations, the development stopped at the beginning of the larval stage. The effect of the caffeine (100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) and of the ground coffee (0.025 g/mL) on the esterase patterns was analyzed in L4 larvae, by polyacrylamide gel electrophoresis. Both the caffeine and the ground coffee changed the pattern of five bands, being four carboxylesterases (EST-1, EST-7, EST-19 and EST-20) and one acetylcholinesterase (EST-3). The caffeine and the ground coffee differed in their effects on these bands. The caffeine caused an increase of the number of individuals with down activity levels or absence of the bands EST-1 and EST-20; the opposite occurred with the ground coffee. This, in its turn, increased the frequency of individuals with down levels of esterase bands EST-3 and EST-7. The caffeine showed the strongest effect in reducing the frequency of EST-19; the contrary occurred in the medium with ground coffee. In insects, carboxylesterases and acetylcholinesterases are involved with the resistance to insecticides. The fact that they are also affected by caffeine indicates a more extensive effect of them on the metabolism of xenobiotics. The data suggest, still, that the caffeine can act modulating the enzyme production and that the effects of the ground coffee at 0.025 g/mL are not due to its contents of caffeine, but to another(s) component(s). Data suggested also, that the caffeine (at 500 $\mu\text{g/mL}$ or more) and the ground coffee (at 0.1 g/mL or more) can be used as auxiliars in the control of *Aedes aegypti*.

Key words: caffeine; *Aedes aegypti*; development; mortality; longevity; esterases.

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho.
São José do Rio Preto, março de 2001.

Alessandra Theodoro Laranja



